

УПРЕЖДАЮЩАЯ СЕЛЕКЦИЯ: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ПРИ СОЗДАНИИ ДОНОРОВ УСТОЙЧИВОСТИ КАРТОФЕЛЯ (*Solanum tuberosum* L.) К ФИТОФТОРОЗУ НА ОСНОВЕ СЛОЖНЫХ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ*

О.А. ФАДИНА¹, М.П. БЕКЕТОВА¹, Е.А. СОКОЛОВА¹, М.А. КУЗНЕЦОВА²,
Т.И. СМЕТАНИНА², Е.В. РОГОЗИНА³, Э.Е. ХАВКИН¹

Наиболее серьезной агрономической и экономической проблемой картофелеводства остается фитофтороз, вызываемый оомицетом *Phytophthora infestans* Mont. de Bary. Уникальная скорость эволюции этого патогена и его миграция — основные препятствия при создании сортов картофеля с долговременной устойчивостью к фитофторозу. Лучший способ противостоять такой угрозе — это упреждающая селекция на основе доноров, которые несут гены устойчивости к широкому спектру рас возбудителя. Объединение нескольких генов устойчивости к фитофторозу в одном растении (пирамидирование генов) делает устойчивость долговременной. Наиболее перспективным подходом при получении таких доноров служит интрогрессивная селекция, то есть создание межвидовых гибридов картофеля с генами устойчивости, перенесенными из его дикорастущих сородичей — клубненосных видов *Solanum* L. Молекулярные маркеры, позволяющие надежно различать гены устойчивости разной специфичности и эффективно контролировать их перенос в процессах скрещивания и отбора, резко повышают эффективность интрогрессивной селекции на устойчивость к фитофторозу. Мы исследовали 39 сложных гибридов, которые были получены во Всероссийском НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (Московская обл.), Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (г. Санкт-Петербург) и Всероссийском НИИ защиты растений (г. Санкт-Петербург) с участием 16 клубненосных видов *Solanum* и поддерживаются в виде клонов. Каждый из этих клонов несет генетический материал, полученный от 2-8 дикорастущих видов — источников устойчивости к фитофторозу. Большинство клонов из года в год проявляют высокую устойчивость к фитофторозу в полевых испытаниях в условиях естественного заражения и в лабораторных исследованиях при инфицировании отделенных листьев высоковирулентным и агрессивным изолятом *P. infestans*. SCAR (sequence-characterized amplified region) маркеры, которые представляют собой фрагменты *R* генов расоспецифичной (вертикальной) устойчивости к фитофторозу, найденных у различных видов *Solanum*, были использованы для изучения клонов межвидовых гибридов. С устойчивостью клонов к фитофторозу сопоставили сведения о присутствии SCAR маркеров шести *R* генов — *R1* (5-я хромосома), *R2/Rpi-blb3* (4-я хромосома), *R3a* и *R3b* (11-я хромосома), *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1* (8-я хромосома) и *Rpi-vnt1.3* (9-я хромосома). Сравнение показателей у клонов межвидовых гибридов и сортов картофеля, не содержащих маркеров *R* генов, свидетельствует о значимом вкладе *R* генов в общую устойчивость растений картофеля к фитофторозу. При этом увеличение числа маркеров *R* генов в одном растении сопровождалось существенным повышением устойчивости к фитофторозу. Можно ожидать, что применение молекулярных маркеров для пирамидирования *R* генов в процессе гибридизации обеспечит направленную интрогрессивную селекцию и ускорит получение сортов картофеля с долговременной устойчивостью к фитофторозу, которые будут способны сохранять продуктивность даже при значительных изменениях в популяциях *P. infestans*.

Ключевые слова: *Phytophthora infestans*, *Solanum* sp., фитофтороз картофеля, межвидовые гибриды картофеля, клоновые коллекции, интрогрессивная селекция, *R* гены устойчивости к фитофторозу, *Avr* гены *P. infestans*.

Фитофтороз (возбудитель — оомицет *Phytophthora infestans* Mont. de Bary) остается важнейшей в экономическом отношении болезнью картофеля: ежегодно с ней связаны потери не менее 15 % урожая, а глобальный экономический ущерб, включая расходы на химическую борьбу с патогеном, оценивается в 10 млрд долларов США (1). Эпидемии фитофтороза,

* Работа выполнена при финансовой поддержке МНТЦ (проект № 3714п), РФФИ (проекты № 13-04-00163/14, № 14-04-31613а и № 16-04-00098) и Министерства образования и науки Российской Федерации (Госконтракт № 16.М04.12.0007). Получение межвидовых гибридов картофеля, фитопатологическая оценка изолятов *Phytophthora infestans*, оценка устойчивости картофеля к фитофторозу и маркерный анализ генотипов картофеля выполнены в рамках Государственных заданий 0662-2014-0018, 0598-2015-0018, 0598-2015-0016 и 0574-2014-0020.

вызванные появлением новых рас *P. infestans* вследствие эволюции и миграции патогена, периодически уничтожают до 70-100 % урожая (2-4). Поэтому для устойчивого картофелеводства требуются сорта с долговременной (durable) высокой устойчивостью к широкому кругу рас *P. infestans*, гарантирующей существенное сохранение продуктивности растений при изменении расового состава патогена в агроценозе. Создание таких сортов можно назвать упреждающей селекцией.

Определяющую роль в этой стратегии играют источники устойчивости к *P. infestans* — виды *Solanum* L. (секция *Petota* Dumort.). Гены устойчивости найдены у многих представителей рода *Solanum* из Северной и Южной Америки (5), но лишь небольшое их число имеется у коммерческих сортов картофеля (<https://www.europotato.org>). Одним из первых примеров интрогрессии таких расоспецифичных генов вертикальной устойчивости (*R* генов) от дикорастущего вида было создание межвидовых гибридов на основе *S. demissum* (6, 7), но достигнутая таким образом устойчивость быстро преодолевалась новыми расами *P. infestans* (8). Горизонтальная устойчивость к фитофторозу (8-10), присущая широкому кругу клубненосных видов *Solanum*, контролируется многочисленными расонеспецифичными генами. В значительной мере они картированы только как локусы количественных признаков (QTL) и исследованы значительно слабее, чем расоспецифичные гены (5, 11, 12). То обстоятельство, что проявление расонеспецифичных генов сильно зависит от внешних факторов, серьезно усложняет работу по селекции на горизонтальную устойчивость к фитофторозу.

Привлечение генетических источников для создания доноров селекционно ценных признаков происходит на этапе предбридинговой селекции. Во Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР, г. Санкт-Петербург) собрана одна из крупнейших мировых коллекций культурных и дикорастущих клубненосных видов *Solanum*, установлены генетические центры формирования фитофтороустойчивых видов (13), разработаны генетические основы получения межвидовых гибридов-доноров (14) и отбора образцов, пригодных для межвидовой гибридизации.

Сложные межвидовые гибриды с генетическим материалом сразу нескольких дикорастущих видов *Solanum* могут стать лучшими донорами для создания устойчивых сортов картофеля (10, 15, 16), а пирамидирование (объединение) разных генов устойчивости к фитофторозу в одном растении делает эту устойчивость долговременной. Как правило, дикорастущие сородичи картофеля и гибриды с их участием содержат по несколько *R* генов разной расоспецифичности (17), для распознавания которых традиционно используют наборы рас *P. infestans*, у которых факторы вирулентности установлены с помощью сортов-дифференциаторов Мастенброка-Блека (7, 18). Эти расы-дифференциаторы выявляют только 11 *R* генов *S. demissum* (причем далеко не все из них клонированы) и не распознают другие гены, которые могут присутствовать у видов *Solanum*. У части таких растений-дифференциаторов имеется более одного *R* гена (19), а у рас-дифференциаторов *P. infestans* ген авирулентности *ipiO*, опознающий ген *RB/Rpi-blb1* у картофеля, характерный для *S. bulbocastanum*, но отсутствующий у *S. demissum* (20), представлен двумя классами.

Многие подобные затруднения были преодолены благодаря созданию моногенных растений-дифференциаторов (21). Но и в этом случае использование рас *P. infestans* с известными генами вирулентности, вероятно, не даст ту же точность идентификации *R* генов, какую обеспечивает их прямое обнаружение с помощью молекулярных маркеров. Таким образом, эффективный поиск генов устойчивости, специфичных в отношении ши-

рокого круга рас *P. infestans*, и их пирамидирование опираются в первую очередь на молекулярное маркирование.

Для обследования больших генетических коллекций и контроля результатов на этапах селекции наиболее удобны маркеры, которые представляют собой фрагменты самих генов устойчивости. Такие SCAR (sequence characterized amplified region) маркеры, в отличие от фланкирующих маркеров, полностью сохраняют информативность даже при значительной рекомбинации генетического материала в геномах гибридов. Основная проблема, возникающая при использовании этих маркеров, заключается в необходимости различать функционально активные гены и их неактивные структурные гомологи. Отметим, что более специфичное распознавание *R* генов устойчивости у растения обеспечивают методы эффектормики (22): индивидуальные гены авирулентности патогена (*Avr* гены) вводят в растение в составе вектора, и хорошо наблюдаемая реакция сверхчувствительности свидетельствует о присутствии соответствующего *R* гена. Этот методический подход тоже имеет ограничения, и лучшие результаты достигаются при сочетании двух взаимодополняющих технологий.

В настоящей работе мы впервые систематизировали данные многолетнего изучения коллекций сложных межвидовых гибридов и сортов картофеля, входящих в родословные таких гибридов либо используемых как стандарты при оценке устойчивости к фитофторозу (частично результаты представлялись ранее на рабочих совещаниях Европейской сети исследователей фитофтороза — EuroBlight Workshops, 2013, 2015; <http://euroblight.net/>). Сделанное обобщение позволило нам предложить новый подход к получению сортов с длительной устойчивостью к фитофторозу. Этот подход основан на создании методами направленной интрогрессивной селекции сложных межвидовых гибридов картофеля, высокая устойчивость которых к фитофторозу достигнута благодаря пирамидированию *R* генов устойчивости под контролем молекулярных маркеров этих генов. Большой пул таких гибридов, используемых в качестве селекционных доноров, позволяет оперативно реагировать на изменения в составе популяции патогена.

Ниже мы проиллюстрируем применение подхода, ориентированного на упреждающую селекцию, и связанные с ним затруднения на примере двух групп межвидовых гибридов.

Методика. Исследовали 10 сортов (Alpha, Desiree, Bintje, Early Rose, Eesterling, Escort, Gloria, Елизавета, Свитанок киевский и Sarpo Mira), дигаплоид сорта Atzimba и 39 клонов сложных межвидовых гибридов картофеля, полученных во Всероссийском НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (Московская обл.), Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР, г. Санкт-Петербург) и Всероссийском НИИ защиты растений (г. Санкт-Петербург) с участием 16 клубненосных видов *Solanum* из разных центров происхождения.

Устойчивость листьев к фитофторозу оценивали в многолетних полевых опытах в двух регионах России — Северо-Западном (ВИР) и Центральном (Всероссийский НИИ фитопатологии, ВНИИФ) при естественном заражении. Стандартами служили сорта Елизавета, Удача, Найда и Петербургский (ВИР) или Alpha, Bintje, Eesterling, Escort, Gloria, Robijn и Sarpo Mira (ВНИИФ). В лабораторных опытах отделенные листья растений, выращенных в теплице, заражали высоковирулентным и агрессивным изолятом *P. infestans* (расы 1-11) из коллекции ВНИИФ, используя в качестве стандарта сорт Santé (23).

Геномную ДНК выделяли из молодых листьев с помощью набора AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep Kit («Axygen Biosciences»),

США). Концентрацию ДНК измеряли при $\lambda = 260$ нм на нанофотометре UV/Vis NanoPhotometer P300 («IMPLEN», Германия). Методы амплификации геномной ДНК, клонирования и секвенирования ампликонов описаны нами ранее (24). ПЦР проводили в амплификаторе DNA Engine PTC-200 («Bio-Rad», США) с 1,0 ед. Taq ДНК-полимеразы («Fermentas», США), а в случае маркера R2-2500 — с 2,5 ед. Pfu ДНК-полимеразы («Fermentas», США). Для элюирования целевых фрагментов ДНК использовали набор QIAquick Gel Extraction Kit («Qiagen N.V.», Германия), для клонирования — pGEM-T Easy Vector System I («Promega», США); в случае маркера R2-2500 применяли набор Thermo Scientific™ CloneJET™ PCR Cloning Kit и вектор pJet («Fermentas», США). Секвенирование выполняли с помощью анализаторов ABI PRISM 3130xl («Applied Biosystems», США) или Нанофор 05 («Институт аналитического приборостроения РАН», Россия). Праймеры были синтезированы ЗАО «Синтол» (Россия). Секвенированные фрагменты собирали с помощью пакета SeqMan, Lasergene 7.0 (доступно по <http://www.dnastar.com>).

Анализ корреляций выполняли в программе Statistica 6.0 («StatSoft Inc.», США; доступна на <http://www.statsoft.com/>), оценивая параметрическую корреляцию по Пирсону, ранговую корреляцию по Спирмену, а также используя непараметрический критерий Вилкоксона. Все коэффициенты корреляции были значимыми на уровне $p < 0,05$.

Результаты. Работа с клоновыми коллекциями гибридов и сортов картофеля (15), которые поддерживаются в ВИР и ВНИИФ, позволяет сравнивать результаты независимых испытаний в нескольких лабораториях и существенно повышает воспроизводимость экспериментов. Каждый из изученных нами межвидовых клонов несет генетический материал разных источников устойчивости к фитофторозу и имеет в родословной от 2 до 8 дикорастущих видов картофеля (их значительная часть представлена ниже).

В полевых условиях при естественном заражении *P. infestans* большинство изученных клонов межвидовых гибридов из года в год проявляли высокую устойчивость к фитофторозу, сопоставимую с таковой у эталонного сорта Sargo Mira (8 баллов). Высокую устойчивость клонов (до 7 баллов) регистрировали и в лабораторных исследованиях.

Различия в результатах полевого испытания и лабораторного теста (1-3 балла) для подавляющего большинства клонов гибридов и сортов картофеля можно объяснить более благоприятными условиями для развития патогена в лабораторном тесте (3) и вкладом других органов растения в общую устойчивость (25). Там, где эти различия особенно велики, можно также ожидать заметной активности раснеспецифичных генов устойчивости. Показатели полевой и лабораторной устойчивости тесно связаны (коэффициент корреляции Пирсона 0,963 значим при $p < 0,01$).

Для скрининга мы отобрали хорошо верифицированные SCAR маркеры шести *R* генов расоспецифичной устойчивости к фитофторозу, которые локализованы на шести из 12 хромосом картофеля: *R1* (5-я хромосома), *R2/Rpi-blb3* (4-я хромосома), *R3a* и *R3b* (11-я хромосома), *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1* (8-я хромосома) и *Rpi-vnt1.3* (9-я хромосома) (табл. 1). Эти маркеры были сконструированы для *R* генов устойчивости к фитофторозу, исходно охарактеризованных у четырех видов *Solanum* — *S. bulbocastanum*, *S. demissum*, *S. stoloniferum* и *S. venturii*.

Для иллюстрации результатов скрининга мы отобрали две контрастные группы генотипов картофеля (табл. 2): гибриды, у которых высокой устойчивости к фитофторозу соответствует присутствие 3-4 маркеров *R* генов устойчивости (такие формы составляют большинство исследован-

ных нами межвидовых гибридов) и гибриды с высокой устойчивостью и малым числом маркеров.

1. Характеристика SCAR (sequence-characterized amplified region) маркеров *R* генов устойчивости картофеля (*Solanum* L.) к фитофторозу, использованных в работе

Ген	Маркер с указанием длины (-п.н.)	Температура отжига, °С	Прямой (F) и обратный (R) праймеры (5'→3')	Ссылка
<i>Rpi-blb1</i>	Rpi-blb1-820	62	F: AACCTGTATGGCAGTGGCATG R: GTCAGAAAAGGGCACTCGTG	(27)
<i>Rpi-sto1 = Rpi-blb1</i>	Rpi-sto1-890	65	F: ACCAAGGCCACAAGATTCTC R: CCTGCGGTTCGGTTAATACA	(28)
<i>R1</i>	R1-1205	65	F: CACTCGTGACATATCCTCACTA R: GTAGTACSTATCTTATTTCTGCAAGAAT	(24)
<i>R2</i>	R2-2500	62	F: ATGGCTGATGCCTTTCTATCATTTGC R: TCACAACATATAATTCCGCTTC	(19)
<i>R3a</i>	R3-1380	64	F: TCCGACATGTATTGATCTCCCTG R: AGCCACTTCAGCTTCTTACAGTAGG	(24)
<i>R3b</i>	R3b-378	64	F: GTCGATGAATGCTATGTTTCTCGAGA R: ACCAGTTTCTTGCAATTCCAGATTG	(29)
<i>Rpi-vnt1.3</i>	Rpi-vnt1.3-612	65	F: CCTTCTCATCCTCACATTTAG R: GCATGCCAACTATTGAAACAAC	(30)

2. Распределение SCAR (sequence-characterized amplified region) маркеров *R* генов в двух группах межвидовых гибридов картофеля (*Solanum* L.) разного происхождения с высокой устойчивостью к фитофторозу

Генотип	Маркер							Число маркеров	Устойчивость, балл		Дикие виды в родословной	
	1	2	3	4	5	6	7		полевая	лабораторная		
Гибриды с известными <i>R</i> генами устойчивости												
2372-60	1	0	1	1	0	0	0	3	8	6,0	adg, chc, dms, sto	
12/1-09	0	1	0	0	1	1	0	3	7	6,0	adg, dms, mcd, plt = sto, pnt, sto, vlm	
15/13-09	0	1	0	1	1	0	0	3	6	6,0	adg, dms, mcd, plt = sto, sto, vlm	
16/27-09	1	0	0	0	1	1	0	3	7	7,0	adg, ber, dms, mcd, phu, plt = sto, sto, vlm	
111 (38 КВА)	0	0	1	1	1	1	0	4	7	6,5	adg, dms, mcd, plt = sto, sto	
39-1-2005	0	0	0	1	1	0	1	3	7	6,0	aln, dms ^{a, б}	
134-6-2006	0	0	1	1	0	0	1	3	6	5,0	aln = brc ^б	
139	1	0	0	0	1	1	0	3	9	6,0	adg, aln, ber, dms, mcd, plt = sto, pnt, sto, vlm	
135-1-2006	0	1	1	1	0	0	1	4	7	5,0	aln = brc ^б	
Гибриды, предположительно несущие неизвестные гены устойчивости												
2585-80	1	0	0	1	0	0	0	2	7	6,0	dms	
2585-67	0	0	1	1	0	0	0	2	7	6,0	dms	
106 (171-3)	0	0	0	1	0	0	0	1	7	6,0	adg, dms, ryb	
113 (50/1 КВА)	0	0	0	0	0	0	0	0	7	6,0	adg, dms, phu, sto, vrn и смесь пыльцы гибридов	
118 (118-5)	0	0	1	1	0	0	0	2	8	6,0	adg, dms, ryb	
24-1	0	0	0	1	0	0	1	2	8	6,5	aln = brc ^б	
134-2-2006	1	0	0	0	0	0	1	2	7	6,0	aln = brc ^б	
Диплоид сорта Atzimba	0	0	0	0	0	0	0	0	7	Нет данных	Не известны	

Примечание. 1 — R1-1205, 2 — R2-2500, 3 — R3a-1380, 4 — R3b-378, 5 — Rpi-blb1-820, 6 — Rpi-sto1, 7 — Rpi-vnt1.3; ^a — неясен источник маркера Rpi-blb1-820, ^б — неясен источник маркера Rpi-vnt1.3; adg — *S. andigenum*, aln — *S. alandiae*, ber — *S. berthaultii*, brc — *S. brevicaulis*, chc — *S. chacoense*, dms — *S. demissum*, mcd — *S. microdontum*, phu — *S. phureja*, plt — *S. polytrichon* = *S. stoloniferum*, pnt — *S. pinatisectum*, ryb — *S. rybinii* = *S. phureja*, sto — *S. stoloniferum*, vlm — *S. vallis-mexici*, vrn — *S. vernei*.

Примененные нами маркеры были сконструированы для *R* генов устойчивости к фитофторозу, исходно охарактеризованных у четырех видов *Solanum* — *S. bulbocastanum*, *S. demissum*, *S. stoloniferum* и *S. venturii*. Сравнение клонов межвидовых гибридов картофеля с дикорастущими видами *Solanum*, использованными при создании этих гибридов (24, 26), подтвердило, что состав *R* генов у гибридов в основном соответствовал их родословным. Маркеры генов *R1*, *R2*, *R3a* и *R3b* с наибольшей вероятностью перенесены из *S. demissum*, однако, как показал скрининг обширной

коллекции дикорастущих видов из секции *Petota* (24), их источником могли быть и другие дикорастущие виды, отмеченные в родословных. Генетический материал *S. bulbocastanum* не использовали в создании исследованных гибридов, и там, где мы находим маркер гена *Rpi-blb1*, он был перенесен из *S. stoloniferum* — тетраплоидного вида, один из геномов которого, по всей видимости, происходит от *S. bulbocastanum* (27). Неплохо согласуются результаты скрининга с маркерами *Rpi-blb1-820* и *Rpi-sto1-890*, которые соответствуют двум далеко отстоящим друг от друга участкам гена *Rpi-blb1 = Rpi-sto1*. Присутствие гена *R1* у *S. stoloniferum* подтверждено подробными исследованиями этого вида (31), в том числе клонированием полноразмерного ортолога *R1* (GenBank accession number KU302613, National Center for Biotechnology Information — NCBI, США); кроме того, присутствие функционального гена *R1* у *S. stoloniferum* засвидетельствовано методом эффекторомики (32).

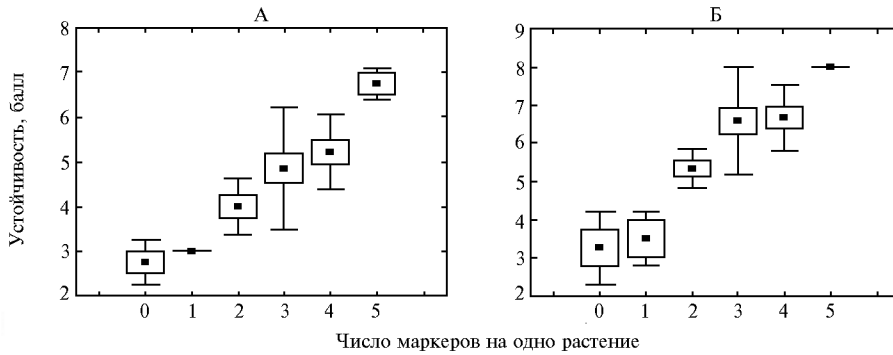
В некоторых случаях мы не можем интерпретировать полученные данные без дальнейших углубленных исследований. Это относится к маркерам *Rpi-blb1-820* и *Rpi-sto1*, присутствовавшим у гибридов, в родословных которых не значился вид *S. stoloniferum*. Мы также обнаружили маркер гена *Rpi-vnt1.3* у большого числа гибридов, происхождение которых не связано с *S. venturii*. Это согласуется с недавним сообщением (30) о присутствии структурных гомологов указанного гена у *S. microdontum* ssp. *gigantophyllum* и *S. phureja* (NCBI GenBank accession numbers GU338312, GU338337). Выполненное нами клонирование SCAR маркеров *R* генов из межвидовых гибридов показало, что по нуклеотидным последовательностям эти маркеры на 98-100 % идентичны генам-прототипам. Там, где наблюдаются расхождения, их можно связать с видовым (аллельным) разнообразием *R* генов в пределах полиморфной секции *Petota* (33). По всей видимости, исследованные *R* гены распространены за пределами видов, в которых они были впервые описаны, то есть шире, чем ранее предполагалось. Это же подтверждали результаты скрининга дикорастущих видов *Solanum*, выполненного нами ранее (17, 24, 26, 33). Аналогичные результаты получены Н. Rietman методом эффекторомики (32).

Самый важный вопрос при маркерном анализе дикорастущих и культурных форм картофеля заключается в том, указывает ли присутствие маркера на наличие функционального *R* гена. Даже полное сходство последовательности маркера с геном-прототипом не служит доказательством функциональной активности: структурные различия могут находиться за границами маркера, а для изменения функции продукта *R* гена — киназы достаточно одной нуклеотидной замены (34). Возможно, более определенный ответ даст использование специфичных *Avr* генов, различающих функциональные *R* гены и их неактивные гомологи (22).

Косвенным доказательством функциональности *R* генов, выявленных при помощи SCAR маркеров, служит взаимосвязь между присутствием этих маркеров и устойчивостью растений к фитофторозу. На рисунке показана зависимость полевой и лабораторной устойчивости 40 гибридов и сортов картофеля от числа маркеров *R* генов устойчивости в одном растении как характеристики пирамидирования генов устойчивости к фитофторозу. Для расчетов были взяты 40 генотипов — 10 сортов с низкой и высокой устойчивостью и все гибриды, кроме форм с предположительно неизвестными генами устойчивости (см. табл. 2, нижняя часть). Действительно, в этом случае устойчивость растений по результатам полевых и лабораторных тестов тесно связана с присутствием маркеров *R* генов: соответствующие коэффициенты параметрической корреля-

ции Пирсона (0,74 и 0,67) и ранговой корреляции Спирмена (0,66 и 0,64) были значимы на уровне $p < 0,01$, а связь по критерию Вилкоксона — при $p < 0,05$. Эти данные свидетельствуют о несомненном вкладе расоспецифичных генов в устойчивость картофеля к фитофторозу (12).

Устойчивость возрастала с увеличением числа маркеров R генов, перенесенных методом гибридизации (рис.). Отсюда следует, что дальнейшие накапливающие скрещивания и отбор лучших сочетаний генов устойчивости под контролем маркеров R генов позволят объединить в одном растении больше генов устойчивости, чем современные технологии генной инженерии (1).



Связь лабораторной (А) и полевой (Б) устойчивости растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) к фитофторозу с числом маркеров R генов: ■ — среднее, □ — среднее ± SEM, I — среднее ± SD.

Особый интерес представляет небольшая группа межвидовых гибридов картофеля, которую мы оставили за пределами описанного выше статистического анализа. Они обладают высокой устойчивостью к фитофторозу, но не содержат ожидаемого большого числа маркеров R генов (см. табл. 2). Как оказалось, к этим формам относятся и дигаплоид сорта Atzimba. Вероятно, такие формы несут расоспецифичные и расонеспецифичные гены устойчивости, не выявляемые с помощью примененных маркеров. В настоящее время нами ведется работа по созданию маркеров этих генов и их валидации для селекционного скрининга.

Таким образом, лучший способ противостоять появлению новых рас *P. infestans* — упреждающая селекция: создание селекционных доноров к фитофторозу на основе межвидовых гибридов с генами устойчивости, перенесенными из дикорастущих сородичей картофеля. Долговременная устойчивость этих гибридов определяется пирамидированием нескольких R генов (в совокупности они обеспечивают распознавание рас патогена с широким спектром специфичности и возможность оперативно реагировать даже на быстрые изменения в популяциях *P. infestans*). Задача решается за счет поиска нового исходного материала среди культурных и дикорастущих форм *Solanum* L. секции *Petota* (особый интерес представляют дикорастущие виды, ранее не вовлекавшиеся в скрещивания) и создания пула межвидовых гибридов-доноров с несколькими генами устойчивости посредством интрогрессивной маркер-опосредованной селекции.

К настоящему времени в этом пуле, который поддерживается в виде клоновых коллекций в ВИР, ВНИИ картофельного хозяйства и ВНИИ фитопатологии, насчитывается более 60 межвидовых гибридов картофеля, охарактеризованных морфофизиологическими, фитопатологическими и молекулярными методами, которые уникальны по составу хозяйственно ценных генов и представляют собой готовый селекционный материал для создания сортов в сжатые сроки. Они получены традиционными методами

гибридизации, что более трудоемко и затратно по времени, чем генетическая трансформация двумя-тремя генами устойчивости с широкой специфичностью. Однако по числу хозяйственно ценных генов в одном растении и способности противостоять большему числу рас *P. infestans* описанные клоны превосходят формы, полученные с помощью генно-инженерных технологий. Еще одно преимущество селекционных доноров на основе межвидовых гибридов — сохранение сложившегося в родительских формах генетического окружения (включая гены горизонтальной устойчивости) для интрогрессированных генов расоспецифичной устойчивости. Это стабилизирует создаваемые сорта и замедляет отбор более приспособленных форм патогена в посадках.

Итак, использование молекулярных маркеров генов устойчивости в интрогрессивной селекции означает переход к принципиально новому конструированию селекционных доноров. На примере гибридов картофеля, несущих генетический материал нескольких дикорастущих видов *Solanum*, нами показан значимый вклад *R* генов в устойчивость картофеля к фитофторозу, которая заметно возрастает при пирамидировании генов разной специфичности. Наши исследования клонов межвидовых гибридов с помощью маркеров шести *R* генов позволили выделить две группы генотипов: уникальные доноры для создания новых сортов и гибриды, которые несут редкие аллели генов устойчивости и поэтому перспективны прежде всего в качестве исходного материала для поиска и выделения не известных ранее *R* генов. Дальнейшее пирамидирование генов устойчивости посредством накапливающих скрещиваний с использованием детально охарактеризованных доноров и молекулярных маркеров позволит в ближайшем будущем создать сорта картофеля, способные сохранять продуктивность даже при значительных изменениях в популяциях *Phytophthora infestans*. Для этого, в свою очередь, требуется изучение специфичности генов устойчивости и конструирование надежных маркеров для массового селекционного скрининга.

Авторы благодарят Центр коллективного использования оборудования «Биотехнология» (Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии) за секвенирование фрагментов геномов Solanum.

ЛИТЕРАТУРА

1. Haverkort A.J., Boonekamp P.M., Hutten R., Jacobsen E., Lotz L.A.P., Kessel G.J.T., Vossen J.H., Visser R.G.F. Durable late blight resistance in potato through dynamic varieties obtained by cisgenesis: Scientific and societal advances in the DuRPh project. *Potato Res.*, 2016, 59(1): 35-66 (doi: 10.1007/s11540-015-9312-6).
2. Cooke D., Cano L., Raffaele S., Bain R., Cooke L., Etherington G.J., Deahl K.L., Farrer R.A., Gilroy E.M., Goss E.M., Grünwald N.J., Hein I., MacLean D., McNicol J.W., Randall E., Oliva R.F., Pel M.A., Shaw D.S., Squires J.N., Taylor M.C., Vleeshouwers V.G., Birch P.R., Lees A.K., Kamoun S. Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen. *PLoS Pathol.*, 2012, 8(10): e1002940 (doi: 10.1371/journal.ppat.1002940).
3. Fry W.E. *Phytophthora infestans*: New tools (and old ones) lead to new understanding and precision management. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2016, 54: 529-547 (doi: 10.1146/annurev-phyto-080615-095951).
4. Lees A.K., Stewart J.A., Lynott J.S., Carnegie S.F., Campbell H., Roberts A.M. The effect of a dominant *Phytophthora infestans* genotype (13_A2) in Great Britain on host resistance to foliar late blight in commercial potato cultivars. *Potato Res.*, 2012, 55(2): 125-134 (doi: 10.1007/s11540-012-9214-9).
5. Śliwka J., Zimnoch-Guzowska E. Resistance to late blight in potato. In: *Translational genomics for crop breeding: biotic stress* /R.K. Varshney, R. Tuberosa (eds.). John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, 2013, V. 1: 221-240 (doi: 10.1002/9781118728475.ch12).
6. Ross H. *Potato breeding: problems and perspectives*. Paul Parey, Berlin, 1986.

7. Bradshaw J. Potato breeding at the Scottish Plant Breeding Station and the Scottish Crop Research Institute: 1920-2008. *Potato Res.*, 2009, 52(2): 141-172 (doi: 10.1007/s11540-009-9126-5).
8. Wastie R.L. Breeding for resistance. *Adv. Plant Pathol.*, 1991, 7: 193-224.
9. Колобаев В.А. Принципы и методы создания высокоэффективных доноров горизонтальной устойчивости картофеля к фитофторозу. СПб, 2001.
10. Яшина И.М., Прохорова О.А., Кукушкина Л.Н. Оценка гибридных популяций картофеля для использования в селекции на полевую устойчивость к фитофторозу. *Достижения науки и техники АПК*, 2010, 12: 17-21.
11. Danan S., Veurier J.-B., Lefebvre V. Construction of a potato consensus map and QTL meta-analysis offer new insights into the genetic architecture of late blight resistance and plant maturity traits. *BMC Plant Biol.*, 2011, 11: 16 (doi: 10.1186/1471-2229-11-16).
12. Gebhardt C. Bridging the gap between genome analysis and precision breeding in potato. *Trends Genet.*, 2013, 29(4): 248-256 (doi: 10.1016/j.tig.2012.11.006).
13. Будин К.З. Внутривидовая изменчивость и генцентры формирования фитофтороустойчивых видов рода *Solanum* секции *Petota*. *Сельскохозяйственная биология*, 1999, 5: 9-14.
14. Будин К.З. Генетические основы создания доноров картофеля. СПб, 1997.
15. Рогозина Е.В., Хавкин Э.Е., Соколова Е.А., Кузнецова М.А., Гавриленко Т.А., Лиманцева Л.А., Бирюкова В.А., Чалая Н.А., Джонс Р.В., Дил К.Л. Клоновая коллекция диких клубненосных видов и межвидовых гибридов картофеля, изученная фитопатологическим методом и с помощью ДНК-маркеров. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции (ВИР)*, 2013, 174: 23-32.
16. Кузнецова М.А., Прохорова О.А., Рогожин А.Н., Сметанина Т.И., Хавкин Э.Е., Яшина И.М. Способ отбора гибридов картофеля с высокой полевой устойчивостью к фитофторозу. Патент RU № 2560725 С2, 2015. Дата приоритета 29.04.2013.
17. Khavkin E.E., Fadina O.A., Sokolova E.A., Beketova M.P., Drobyazina P.E., Rogozina E.V., Kuznetsova M.A., Yashina I.M., Jones R.W., Deahl K.L. Pyramiding *R* genes: genomic and genetic profiles of interspecific potato hybrids and their progenitors. In: PPO-Special Report no. 16 /H.T.A.M. Schepers (ed.). Wageningen, 2014: 215-220.
18. Black W., Mastenbroek C., Mills W.R., Peterson L.C. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. *Euphytica*, 1953, 2(3): 173-179 (doi: 10.1007/BF00053724).
19. Kim H.-J., Lee H.-R., Jo K.-R., Mortazavian S.M.M., Huigen D.J., Evenhuis B., Kessel G., Visser R.G.F., Jacobsen E., Vossen J.H. Broad spectrum of late blight resistance in potato differential set plants MaR8 and MaR9 is conferred by multiple stacked *R* genes. *Theor. Appl. Genet.*, 2012, 124(5): 923-935 (doi: 10.1007/s00122-011-1757-7).
20. Pankin A., Kinash E., Rogozina E., Kozlovskaya I., Kuznetsova M., Khavkin E. Are simple *Phytophthora infestans* races that simple? In: PPO-Special Report. Wageningen, 2012, V. 15: 205-211.
21. Zhu S., Vossen J.H., Bergervoet M., Nijenhuis M., Kodde L., Kessel G.J.T., Vleeshouwers V., Visser R.G.F., Jacobsen E. An updated conventional and a novel GM potato late blight *R* gene differential set for virulence monitoring of *Phytophthora infestans*. *Euphytica*, 2015, 202(2): 219-234 (doi: 10.1007/s10681-014-1276-0).
22. Du J., Vleeshouwers V.G. The do's and don'ts of effectoromics. In: Plant-pathogen interactions: methods and protocols /P. Birch, J. Jones, J. Bos (eds.). Springer, NY, 2014: 257-268 (doi: 10.1007/978-1-62703-986-4_19).
23. Kuznetsova M.A., Spiglazova S.Yu., Rogozhin A.N., Smetanina T.I., Filippov A.V. New approaches for measuring potato susceptibility to *Phytophthora infestans*. In: PPO-Special Report no. 16 /H.T.A.M. Schepers (ed.). Wageningen, 2014: 223-232.
24. 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*, 2011, 9(2): 309-312 (doi: 10.1017/S1479262111000347).
25. Orłowska E., Llorente B., Cvitanich C. Plant integrity: an important factor in plant-pathogen interactions. *Plant Signal. Behav.*, 2013, 8(1): e22513 (doi: 10.4161/psb.22513).
26. Sokolova E.A., Fadina O.A., Khavkin E.E., Rogozina E.V., Kuznetsova M.A., Jones R.W., Deahl K.L. Structural homologues of CC-NBS-LRR genes for potato late blight resistance in wild *Solanum* species. In: PPO-Special Report no. 16 /H.T.A.M. Schepers (ed.). Wageningen, 2014: 247-253.
27. Wang M., Allefs S., van den Berg R.G., Vleeshouwers V.G., van der Vossen E.A., Vosman B. Allele mining in *Solanum*: conserved homologues of *Rpi-blb1* are identified in *Solanum stoloniferum*. *Theor. Appl. Genet.*, 2008, 116(7): 933-943 (doi: 10.1007/s00122-008-0725-3).
28. Haesaert G., Vossen J.H., Custers R., de Loose M., Haverkort A., Heremans B., Hutten R., Kessel G., Landschoot S., Van Droogenbroeck B., Visser R.G.F., Gheysen G. Transformation of the potato variety Desiree

- with single or multiple resistance genes increases resistance to late blight under field conditions. *Crop Protect.*, 2015, 77, 163-175 (doi: 10.1016/j.cropro.2015.07.018).
29. Rietman H., Bijsterbosch G., Cano L.M., Lee H.R., Vossen J.H., Jacobsen E., Visser R.G., Kamoun S., Vleeshouwers V.G. Qualitative and quantitative late blight resistance in the potato cultivar Sarpö Mira is determined by the perception of five distinct RXLR effectors. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2012, 25(7): 910-919 (doi: 10.1094/MPMI-01-12-0010-R).
 30. Pel M.A., Foster S.J., Park T.H., Rietman H., van Arkel G., Jones J.D., Van Eck H.J., Jacobsen E., Visser R.G.F., Van der Vossen E.A. Mapping and cloning of late blight resistance genes from *Solanum venturii* using an interspecific candidate gene approach. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2009, 22(5): 601-615 (doi: 10.1094/MPMI-22-5-0601).
 31. Beketova M., Pankin A., Sokolova E., Rogozina E., Kuznetsova M., Khavkin E. Two orthologues of late blight resistance gene *R1* in wild *Solanum* species and derived potato varieties and hybrids. In: PPO-Special Report no. 17 /H.T.A.M. Schepers (ed.). Wageningen, 2015: 213-220.
 32. Rietman H. Putting the *Phytophthora infestans* genome sequence at work; multiple novel avirulence and potato resistance gene candidates revealed. PhD thesis. Wageningen University, Wageningen, 2011.
 33. Fadina O.A., Beketova M.P., Belyantseva T.V., Kuznetsova M.A., Rogozina E.V., Khavkin E.E. Marker profiles of late blight resistance genes in complex interspecific potato hybrids. In: PPO-Special Report no. 17 /H.T.A.M. Schepers (ed.). Wageningen, 2015: 195-201.
 34. Segretin M.E., Pais M., Franceschetti M., Chaparro-Garcia A., Bos J.I., Banfield M.J., Kamoun S. Single amino acid mutations in the potato immune receptor R3a expand response to *Phytophthora* effectors. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2014, 27(7): 624-637 (doi: 10.1094/MPMI-02-14-0040-R).

¹*ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии,*
127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42,
e-mail: emil.khavkin@gmail.com;

²*ФГБНУ Всероссийский НИИ фитопатологии,*
143050 Россия, Московская обл., Одинцовский р-н,
пос. Большие Вяземы, ул. Институт, вл. 5,
e-mail: kuznetsova@vniif.ru;

³*ФГБНУ ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова,*
190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42-44

Поступила в редакцию
26 сентября 2016 года

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2017, V. 52, № 1, pp. 84-94

ANTICIPATORY BREEDING: MOLECULAR MARKERS AS A TOOL IN DEVELOPING DONORS OF POTATO (*Solanum tuberosum* L.) LATE BLIGHT RESISTANCE FROM COMPLEX INTERSPECIFIC HYBRIDS

O.A. Fadina¹, M.P. Beketova¹, E.A. Sokolova¹, M.A. Kuznetsova², T.I. Smetanina², E.V. Rogozina³, E.E. Khavkin¹

¹*All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Federal Agency of Scientific Organizations, 42, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia, emil.khavkin@gmail.com;*

²*All-Russian Research Institute of Phytopathology, Federal Agency of Scientific Organizations, 5, ul. Institute, pos. Bol'shie Vyazemy, Odintsovskii Region, Moscow Province, 143050 Russia, e-mail kuznetsova@vniif.ru;*

³*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*

ORCID:

Fadina O.A. orcid.org/0000-0002-6600-1693

Beketova M.P. orcid.org/0000-0002-3104-5303

Sokolova E.A. orcid.org/0000-0002-8801-2879

Kuznetsova M.A. orcid.org/0000-0002-9880-5995

Smetanina T.I. orcid.org/0000-0001-5698-7703

Rogozina E.V. orcid.org/0000-0002-2743-068X

Khavkin E.E. orcid.org/0000-0001-9177-3997

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The authors thank the Center for Collective Use of Equipment «Biotechnology» (All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology) for sequencing *Solanum* genome fragments.

Supported by the ISTC—ARS—USDA (project № 3714p), by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (contract № 16.M04.12.0007), and by Russian Foundation for Basic Research (projects № 13-04-00163/14, № 14-04-31613a, and № 16-04-00098). Development of potato interspecific hybrids, phytopathological evaluation of *Phytophthora infestans* isolates, evaluation of potato late blight resistance and marker analysis of potato genotypes were performed in the framework of the State Tasks 0662-2014-0018, 0598-2015-0018, 0598-2015-0016 and 0574-2014-0020, respectively

Abstract

Potato late blight caused by oomycete *Phytophthora infestans* Mont de Bary remains the most significant agronomic and economic problem of potato husbandry. The unique rate of evolution of this pathogen as well as its migration are a major obstacle to producing varieties with durable late blight resistance. The best way to counter this threat is the anticipatory breeding based on donors that carry genes of resistance to a wide range of pathogen races. Combining multiple genes for late blight resistance in the same plant (pyramiding of genes) makes such resistance durable. The most promising way of obtaining such donors is introgression breeding of interspecific potato hybrids with resistance genes transferred from potato wild relatives — the tuber-bearing species of *Solanum* L. Molecular markers allowing to reliably distinguish between resistance genes of diverse specificity and successfully control their transfer in the process of crossing and selecting, dramatically increase the efficiency of introgression breeding for late blight resistance. We examined about 40 complex hybrids bred in the A.G. Lorkh All-Russian Research Institute of Potato Husbandry, the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources and the All-Russian Research Institute of Plant Protection using the germplasm of 16 species of tuber-bearing *Solanum*, and further maintained as clones. Each of these clones carries the genetic material introgressed from two to eight wild species established as the sources of resistance to late blight. Most of these clones have manifested, from year to year, high late blight resistance in field trials under natural infection and in vitro studies when detached leaves were infected with a highly virulent and aggressive isolate of *P. infestans*. SCAR (sequence-characterized amplified region) markers, the fragments of *R* genes of race-specific (vertical) resistance to late blight discerned in various *Solanum* species, were employed to screen the clones of interspecific hybrids. The information on the presence of SCAR markers for six *R* genes, i.e. *R1* (chromosome 5), *R2/Rpi-blb3* (chromosome 4), *R3a* and *R3b* (chromosome 11), *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1* (chromosome 8), and *Rpi-vnt1.3* (chromosome 9), was juxtaposed against the indices of late blight resistance. Comparison of the resistance of the clones of interspecific hybrids and potato varieties devoid of *R* gene marker presumes a significant contribution of these genes to general late blight resistance of potato plants. The higher number of *R* gene markers per plant corresponded to superior late blight resistance. Presumably, future use of these clones for pyramiding resistance genes under the control of molecular markers will enable target introgression breeding. Such approach will streamline developing new potato varieties with durable late blight resistance to maintain high productivity even after significant changes in the populations of *P. infestans*.

Keywords: potato late blight, interspecific potato hybrids, wild *Solanum* species, introgression breeding, *R* genes for late blight resistance, *Avr* genes of *P. infestans*.

Научные собрания
**XI МЕЖДУНАРОДНЫЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ФОРУМ
РОСБИОТЕХ-2017**

(г. Москва, 23-27 мая 2017 года)

**Организаторы:**

Министерство образования и науки Российской Федерации,
Министерство сельского хозяйства Российской Федерации,
Российская академия наук,
РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева,
ВНИИМП им. В.М. Горбатова

Устроитель выставки: ООО «Инноватика Экспо»

Тематика:

- медицинская биотехнология
- биоэнергетика
- промышленная биотехнология
- сельскохозяйственная и пищевая биотехнология
- морская биотехнология
- лесная биотехнология
- природоохранная (экологическая) биотехнология;
- биотопливо
- экологическая безопасность
- геронтология
- зеленая экономика — качество жизни и активное долголетие

Контакты и информация: <http://www.salonexpo.ru>; <http://www.rosbiotech.com>,
info@rosbiotech.com, akimova@rosbiotech.com, makarov@rosbiotech.com