

Генетика и селекция

УДК 635.21:632.4:631.524:577.21

doi: 10.15389/agrobiology.2019.1.19rus

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ РОДИТЕЛЬСКИХ ФОРМ
ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ КАРТОФЕЛЯ, УСТОЙЧИВОГО К БОЛЕЗНЯМ И
ВРЕДИТЕЛЯМ, МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ПЦР-АНАЛИЗА*****Е.В. РОГОЗИНА¹, Е.В. ТЕРЕНТЬЕВА^{2, 3}, Е.К. ПОТОКИНА¹, Е.Н. ЮРКИНА¹,
А.В. НИКУЛИН², Я.И. АЛЕКСЕЕВ^{3, 4}**

Селекция картофеля на основе традиционных технологий гибридизации и отбора индивидуальных растений — длительный и трудоемкий процесс. Использование ДНК маркеров, сцепленных с генами устойчивости к болезням и вредителям, позволяет существенно повысить эффективность отбора ценных генотипов на ранних этапах селекции. В представленной работе чилийские аборигенные сорта картофеля впервые охарактеризованы с использованием ДНК маркеров генов *H1* и *Gro1-4*, контролирурующих устойчивость к золотистой нематоде *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens патотипов Ro1, Ro4, гена *Gpa2*, определяющего устойчивость к бледной нематоде *G. pallida* (Stone) Behrens патотипа Pa2, генов *Ry adg*, *Ry chc* и *Ry sto* (иммунитет к Y-вирусу картофеля), гена *Rx* (иммунитет к X-вирусу картофеля) и гена *Sen1* устойчивости к раку картофеля *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Percival. Получены результаты одновременного тестирования клонов межвидовых гибридов и сортов картофеля по нескольким генам. Нашей целью был молекулярный скрининг сортов и селекционного материала картофеля из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) для идентификации форм с генами устойчивости к цистообразующим нематодам, раку, X- и Y-вирусам картофеля, а также оценка эффективности этого подхода. Исследовали 90 образцов из коллекции ВИР, среди которых были формы культурного картофеля подвидов *Solanum tuberosum* subsp. *chiloense* (A.DC.) Kostina (аборигенные сорта Чили) и *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* (селекционные сорта), а также гибридные клоны — источники и доноры устойчивости картофеля к возбудителям экономически значимых или карантинных заболеваний. Использовали 10 маркеров: TG 689, 57 R, N 195 гена *H1* и Gro1-4-1 гена *Gro1-4*, маркер Gra 2-2 гена *Gpa2*, маркеры RYSC3 гена *Ry adg*, Ry 186 гена *Ry chc* и YES3-3A гена *Ry sto*, маркер PVX гена *Rx* и маркер NL 25 гена *Sen1*. Эффективность мультиплексной ПЦР оценивали посредством сопоставления результатов ДНК-анализа коллекционных образцов с их фенотипической характеристикой по устойчивости к золотистой нематоде, раку и Y-вирусу картофеля. Мультиплексный ПЦР-анализ позволил идентифицировать среди генетически разнообразных форм картофеля генотипы с несколькими (до пяти) генами устойчивости разной специфичности, в том числе обеспечивающими устойчивость к нематоде *G. rostochiensis* Ro1, возбудителю рака *S. endobioticum* и Y-вирусу картофеля. Установлена тесная связь между маркерами гена *H1* и устойчивостью образцов картофеля к нематоде *G. rostochiensis* Ro1 ($r_A = 0,59$, $r_S = 0,72-0,79$), между маркером NL 25 гена *Sen1* и устойчивостью к раку ($r_A = 0,62$). Связь маркеров генов *Ry adg* и *Ry sto* с устойчивостью образцов картофеля к Y-вирусу не выявлена из-за большого числа устойчивых генотипов, у которых маркеры известных генов иммунитета не обнаружены.

Ключевые слова: картофель, *Solanum* ssp., межвидовые гибриды, ДНК маркеры, маркер-опосредованная селекция, рак картофеля, *Synchytrium endobioticum*, нематода, *Globodera rostochiensis* Ro1, Y-вирус картофеля.

Сорта картофеля создают методом гибридизации предварительно отобранных родительских форм, в потомстве которых высока вероятность появления генотипов с оптимальным сочетанием необходимых признаков (1, 2). Высокая гетерозиготность и тетраплоидная природа вовлекаемых в скрещивания форм (сортов и межвидовых гибридов) становится причиной фенотипического разнообразия поколения F₁ гибридов. Сегреганты (потенциально новые сорта картофеля) оценивают по 40-50 признакам продуктивности и качества продукции, а также устойчивости к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам (3-5). Традиционная (conventional) схема селекции картофеля основана на ежегодной фенотипической

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 14.579.21.0012 от 05.06.2014, ID RFMEF157914X0012) с использованием растительного материала, поддерживаемого в рамках темы № 0662-2019-0004 (ВИР).

оценке и отборе лучших генотипов. Индивидуальные генотипы сохраняют посредством вегетативного размножения в виде клонов, количество которых постепенно уменьшается с одновременным возрастанием числа лабораторных и полевых испытаний. Продолжительность селекции от первого этапа, посвященного визуальной оценке и отбору в поколении F₁, до передачи перспективных клонов на государственное сортоиспытание составляет не менее 10 лет (3, 4, 6). Совершенствование этого процесса на основе достижения молекулярной генетики и создание новых технологий селекции — одна из приоритетных задач исследователей.

Многие из селекционно ценные признаки картофеля, в том числе устойчивость к патогенам и вредителям — фитофторозу (возбудитель *Phytophthora infestans* Mont. de Bary), X-вирусу картофеля (ХВК, Potato Virus X), Y-вирусу картофеля (YBK, Potato Virus Y), S-вирусу картофеля (SBK, Potato Virus S), вирусу скручивания листьев картофеля (ВСЛК, Potato Leaf Roll Virus, PLRV), цистообразующим нематодам, раку, вызываемому *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc., — имеют моногенную природу (1). Молекулярные маркеры, сцепленные с генами *Rpi*-устойчивости к фитофторозу, генами *Ry_{sto}*, *Ry_{adg}* и *Ry_{chc}*, контролирующими иммунитет к YBK, маркеры гена *Rx1*, контролирующего иммунитет к ХВК, генов *H1*, *Gro1-4* устойчивости к золотистой нематоде *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens и гена *Sen1* устойчивости к раку, могут стать действенным инструментом для интенсификации селекционной работы. Их применение для идентификации ценных генотипов, в том числе форм с несколькими генами устойчивости, позволяет существенно повысить эффективность отбора на ранних этапах селекции (7-9). Перечень ДНК маркеров, сцепленных с генами устойчивости или являющихся фрагментами генов устойчивости картофеля к вредным организмам, постоянно расширяется (10-12). Новый подход в использовании ДНК маркеров — разработка технологии мультиплексного ПЦР-анализа для одновременного тестирования сортов и селекционных линий по нескольким генам, контролирующим устойчивость к вирусам, нематоде и фитофторозу (9, 13, 14).

Для развития селекции картофеля важное значение имеет скрининг сортов и исходных родительских форм на наличие генов устойчивости к болезням и вредителям (15-17). Постоянным источником ценной гермоплазмы для селекционных учреждений России и ближнего зарубежья служит коллекция картофеля Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР) (18-20). Молекулярно-генетическая характеристика межвидовых гибридов картофеля, предоставляемых селекционерам в качестве источников и доноров признаков устойчивости к вредным организмам, позволит осуществлять более обоснованный подбор родительских пар для скрещивания.

В представленной работе чилийские аборигенные сорта картофеля впервые охарактеризованы с использованием ДНК маркеров генов *H1*, *Gro1-4*, *Gpa2*, *Ry_{sto}*, *Ry_{adg}*, *Ry_{chc}*, *Rx1* и *Sen 1*. Впервые получены результаты одновременного тестирования клонов межвидовых гибридов и сортов картофеля по нескольким генам. Эффективность мультиплексной ПЦР оценивали посредством сопоставления результатов ДНК-анализа коллекционных образцов с их фенотипической характеристикой по устойчивости к золотистой нематоде, раку и Y-вирусу картофеля.

Нашей целью был молекулярный скрининг сортов и селекционного материала картофеля из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) для идентификации форм с генами устойчивости к цистообразующим нематодам, раку, X- и Y-ви-

русам картофеля с использованием технологии мультиплексного ПЦР-анализа, а также оценка его эффективности.

Методика. Исследовали 90 образцов из коллекции картофеля ВИР, представляющих вид *Solanum tuberosum* L. и гибридные клоны, выделенные по комплексу селекционно и хозяйственно ценных признаков в потомстве от межвидовых скрещиваний с участием дикорастущих и культурных видов секции *Petota* Dumort. рода *Solanum* L. В состав исследуемой выборки входили 9 форм подвида *S. tuberosum* subsp. *chiloense* (A.DC.) Kostina (аборигенные сорта из Чили) и 14 форм подвида *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* (5 отечественных и 9 зарубежных сортов). Остальные 67 проанализированных форм были клонами, отобранными в потомствах разных комбинаций от скрещивания или самоопыления гибридов, созданных на основе дикорастущих и культивируемых видов, сортов или селекционных линий картофеля. В их число вошли 12 клонов, созданных в 1990–1997 годах в ВИР К.З. Будиным (21), 3 клона, полученные в 2008 году во Всероссийском НИИ защиты растений В.А. Колобаевым, и 52 клона, отобранные в 1999–2011 годах в ВИР. Среди гибридных клонов 22 были двувидовыми гибридами, включая 16 отобранных в комбинациях *S. tuberosum* с дикорастущими родичами: эндемичным боливийским видом *S. alandiae* Card. (12 клонов), мексиканским видом *S. stoloniferum* Schlecht. (2 клона) или широко распространенным в Южной Америке *S. chacoense* Bitt. (2 клона). Еще 6 клонов представляли собой потомство от скрещивания дикорастущих видов *S. okadae* Hawkes et Hjerting и *S. chacoense*. К трехвидовым гибридам относился 21 клон, полученный в результате скрещивания образцов культурных видов картофеля *S. tuberosum*, *S. andigenum* Juz. et Buk. и *S. rybinii* Juz. et Buk. или *S. phureja* Juz. et Buk. Сложными многовидовыми гибридами были 24 клона, в процессе создания которых скрещивали сорта, селекционные линии, виды культурного и дикорастущего картофеля: *S. acaule* Bitt., *S. stoloniferum*, *S. bulbocastanum* Dun., *S. microdontum* Bitt., *S. polytrichon* Rydb., *S. spegazzinii* Bitt. и *S. vernei* Bitt. et Wittm.

Мультиплексный ПЦР-анализ проводили для определения восьми генов, контролирующих устойчивость картофеля к наиболее опасным патогенам: цистообразующим нематодам — золотистой *G. rostochiensis* патотипа Ro1, Ro4 (гены *H1*, *Gro1-4*) и бледной *Globodera pallida* (Stone) Behrens патотипа Pa2 (ген *Gpa2*); к вирусам YBK (гены *Ry_{sto}*, *Ry_{adg}* и *Ry_{che}*), XBK (ген *Rx1*) и к возбудителю рака картофеля *S. endobioticum* патотипа 1 (ген *Sen 1*). ДНК выделяли из листьев, собранных с растений полевой коллекции картофеля на территории опытного участка Пушкинских лабораторий ВИР (г. Санкт-Петербург—Пушкин).

Чтобы повысить производительность анализа, восемь маркеров, схожих по размерам ампликонов (RYSC3, Ry 186, YES3-3A, TG 689, 57 R, N 195, Gro 1-4-1 и Gpa2-2), объединили в одну мультиплексную реакцию. Для внутреннего положительного контроля при определении маркеров мультиплексной ПЦР в качестве стандартов использовали длину анализируемых фрагментов у сортов Голубизна, Колобок, Уладар, Белоснежка. Еще два маркера с большими размерами ампликонов (NL 25 и PVX) объединили в другую реакцию, для их контроля использовали длину анализируемых фрагментов сорта Метеор. Продукты амплификации исследовали с помощью секвенатора Нанофор 05 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия). Прямые праймеры помечали флуоресцентными красителями 6FAM или 5R6G (ООО «Синтол», Россия).

Реакцию амплификации 8 маркеров мультиплексной ПЦР прово-

дили в приборе Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler («ThermoFisher Scientific», США) по следующей программе: 10 мин при 94 °С (1 цикл); 30 с при 94 °С, 30 с при 68 °С, 1 мин при 72 °С (5 циклов); 30 с при 94 °С, 30 с при 58 °С, 1 мин при 72 °С (35 циклов); 30 с при 94 °С, 5 мин при 72 °С (1 цикл). Реакцию амплификации двух маркеров с большими размерами осуществляли на том же приборе по той же программе, но с увеличением времени элонгации на всех циклах на 30 с.

Устойчивость *S. tuberosum* и гибридных клонов к УВК оценивали методом искусственного заражения (прививки) с последующей ИФА-диагностикой вирусной инфекции. Сведения об устойчивости аборигенных сортов Чили получали в работе Л.И. Костиной (22). Данные об устойчивости селекционных сортов к нематоду *G. rostochiensis* (патотип Ro1) и возбудителю рака картофеля *S. endobioticum* (патотип 1) были основаны на характеристиках отечественных сортов, включенных в Государственный реестр селекционных достижений, и зарубежных сортов, представленных в базе данных <http://www.europotato.org>. Устойчивость селекционных клонов к нематоду оценивали в лабораторных опытах во Всероссийском НИИ защиты растений (ВИЗР, г. Санкт-Петербург—Пушкин), к раку — в лабораторных опытах во Всероссийском НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (ВНИИКХ, Московская обл.) (23).

Наличие связи между выявленной устойчивостью сортов и гибридных клонов к УВК, нематоду или раку и детектированными ДНК маркерами *R*-генов определяли с помощью критерия χ^2 . H_0 -гипотезу отвергали, если $\chi^2_{\Phi} \geq \chi^2_{st} = 10,83$ для уровня значимости $\alpha = 0,1$ %. Тесноту связи между устойчивостью изученных образцов картофеля к УВК, нематоду или раку и детектированными ДНК маркерами *R*-генов оценивали с использованием коэффициента ассоциации γ_A . Значимость коэффициента ассоциации определяли по величине *t*-критерия Стьюдента. H_0 -гипотезу отвергали, если $t_{\Phi} \geq t_{st}$ для уровня значимости $\alpha = 0,1$ % (24).

Результаты. Мы провели скрининг 90 образцов картофеля с использованием 10 ДНК маркеров, рекомендованных для детекции *R*-генов, контролирующих устойчивость сортов и селекционных клонов к разным видам цистообразующих нематод, X-, Y-вирусам и раку картофеля (табл. 1).

1. *R*-гены и ДНК маркеры, использованные для молекулярного скрининга образцов картофеля (*Solanum L.*) из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР)

Ген	Хромосома	Признак	ДНК маркер (размер диагностического фрагмента)	Ссылка
<i>Ry_{adg}</i>	11-я	Иммунитет к Y-вирусу картофеля (УВК)	RYSC3 (321 п.н.)	(25)
<i>Ry_{sto}</i>	12-я	Иммунитет к УВК	YES3-3A (341 п.н.)	(26)
<i>Ry_{chc}</i>	7-я	Иммунитет к УВК	Ry 186 (587 п.н.)	(13)
<i>H1</i>	5-я	Устойчивость к <i>Globodera rostochiensis</i> патотипов Ro1, Ro4	TG 689 (141 п.н.)	(27)
<i>H1</i>	5-я	Устойчивость к <i>G. rostochiensis</i> патотипов Ro1, Ro4	57 R (452 п.н.)	(28)
<i>H1</i>	5-я	Устойчивость к <i>G. rostochiensis</i> патотипов Ro1, Ro4	N 195 (337 п.н.)	(29)
<i>Gro1-4</i>	7-я	Устойчивость к <i>G. rostochiensis</i> патотипов Ro1, Ro4	Gro 1-4-1 (602 п.н.)	(29)
<i>Gpa2</i>	12-я	Устойчивость к <i>G. pallida</i> патотипа Pa2	Gpa 2-2 (452 п.н.)	(29)
<i>Rx</i>	12-я	Иммунитет к X-вирусу картофеля	PVX (1230 п.н.)	(13)
<i>Sen 1</i>	11-я	Устойчивость к раку картофеля (возбудитель <i>Synchytrium endobioticum</i>)	NL 25 (1400 п.н.)	(30)

Скрининг методом мультиплексной ПЦР выявил генотипы с маркерами генов *H1* и *Gpa2*, контролирующих устойчивость к разным видам цистообразующих нематод, гена *Sen1*, обеспечивающего устойчивость к ра-

2. Частота встречаемости генотипов с ДНК маркерами R-генов устойчивости к возбудителям болезней у образцов картофеля (*Solanum* L.) разного происхождения

Группа по родословной	Число генотипов (всего $n = 90$)	Частота маркеров генов							
		<i>H1</i>			<i>Gpa2</i>	<i>Sen 1</i>	<i>Ry_{adg}</i>	<i>Ry_{sto}</i>	<i>Rx</i>
		TG 689	57 R	N 195	Gpa 2-2	NL 25	RYSC3	YES3-3A	PVX
Аборигенные сорта из Чили (<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>chiloense</i>)	9	0	0,22	0	0,11	0,44	0,11	0	0
Селекционные сорта (<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i>)	14	0,14	0,36	0,14	0,14	0,64	0,21	0,14	0,14
Гибриды (<i>S. tuberosum</i> , <i>S. alandiae</i>)	12	0,25	0,58	0,58	0	0,42	0	0	0
Гибриды (<i>S. tuberosum</i> , <i>S. stoloniferum</i>)	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Гибриды (<i>S. tuberosum</i> , <i>S. chacoense</i>)	2	1,0	1,0	1,0	0	0,50	0	0,50	0
Гибриды (<i>S. okadae</i> , <i>S. chacoense</i>)	6	0	1,0	1,0	0	0	1,0	0	0
Гибриды (<i>S. tuberosum</i> , <i>S. andigenum</i> , <i>S. ruginii</i> или <i>S. phureja</i>)	21	0,33	0,33	0,33	0	0,57	0	0,09	0
Сложные многовидовые гибриды	24	0,25	0,17	0,17	0,08	0,21	0,04	0	0

ку картофеля, и генов *Rx* и *Ry_{adg}*, *Ry_{sto}*, обеспечивающих иммунитет к X- и Y-вирусам (табл. 2). В исследованной выборке мы не обнаружили маркеров *Gro1-4-1* гена *Gro1-4* (другой ген устойчивости к золотистой нематоды *G. rostochiensis* патотипов Ro1, Ro4) и *Ry 186* гена *Ry_{che}* (устойчивость к Y-вирусу картофеля).

Частота выявления ДНК маркеров генов устойчивости к вредным организмам была различной (см. табл. 2). Наибольшее число таких маркеров в одном генотипе детектировали у коммерческих сортов картофеля. У сортов Метеор (селекции ВНИИКХ им. А.Г. Лорха) и Нур-Алем (Казахстан) обнаружили маркеры пяти генов — *Ry_{sto}*, *Rx*, *Sen1*, *Gpa2* и *H1*. У сортов Наяда и Невский детектировали маркеры генов *Sen1* и *H1*, у сортов Валерий и Удача — *Sen1* и *Ry_{adg}*. Из 9 исследованных чилийских аборигенных сортов у *Frutilla* выявили маркеры генов *Ry_{adg}* и *Gpa2*, у *Amarilla redonda* — *Sen1* и *H1* (57 R), у *Coraila*, *Magellanes* и *Negra* — *Sen1*, у образца *Negra var. infectum* — маркер 57 R гена *H1*. Следует отметить, что не только в сортах коммерческого картофеля, но и у аборигенных чилийских форм мы обнаружили маркеры генов *H1*, *Ry_{adg}* и *Gpa2*. Источником этих генов в селекционных сортах служит высокогорный андийский картофель, который русские ботаники рассматривают как самостоятельный вид *Solanum andigenum* Juz. et Buk., а зарубежные исследователи определяют в качестве подвида *S. tuberosum* (22). Изолированный ареал, четкое отличие по морфологическим и биологическим признакам от чилийского картофеля — главные аргументы для определения видового статуса *S. andigenum*. Возможной причиной обнаружения ДНК маркеров генов *S. andigenum* у образцов чилийского картофеля в коллекции ВИР может быть воспроизводство части образцов этой коллекции через семенную репродукцию. В этом случае в потомстве от свободного (неконтролируемого) самоопыления часть генотипов может быть гибридогенного происхождения.

У гибридных клонов, отобранных в первом поколении гибридов или беккроссов *S. tuberosum* с эндемичным боливийским видом *S. alandiae*, с высокой частотой обнаруживали маркеры гена *H1* (см. табл. 2). В этой группе у двух генотипов (24-2 и 135-2-2006) выявляли также маркер гена *Sen1*. Маркеры генов *H1* и *Sen1* были детектированы у четырех клонов, в родословной которых присутствовали культурные виды *S. tuberosum*, *S. andigenum* и *S. rybinii* или *S. phureja*, и у клона 94-5 (двувидовой гибрид от скрещивания *Vobg* × *S. chacoense*). В генотипе у клона-сибса 99-10-1 были обнаружены маркеры генов *H1* и *Ry_{sto}*, в генотипах у трехвидовых гибридов 97-155-1 и 138-1-2006 — *Sen1* и *Ry_{sto}*, у 167-1-2008 — *Sen1*, *H1* и *Gpa2*, у всех шести двувидовых гибридов от скрещивания *S. okadae* × *S. chacoense* — *Sen1* и *Ry_{adg}*.

Из 47 генотипов, оцененных по устойчивости к *S. endobioticum* патотипа 1, 14 оказались устойчивыми (табл. 3). Среди них преобладали *S. tuberosum*: 8 современных сортов и 3 аборигенных сорта Чили. Два клона — производные *S. alandiae* и один, отобранный в потомстве от скрещивания *S. okadae* × *S. chacoense*, были отнесены к категории устойчивых по результатам двухлетних лабораторных испытаний. Среди 59 генотипов, оцененных по устойчивости к *G. rostochiensis* патотипа Ro1, было выявлено 24 устойчивых (см. табл. 3). В эту группу входили два сорта (Метеор и Наяда) и 22 гибридных клона, отобранных в потомстве от разных комбинаций скрещивания двух, трех или большего числа культурных и дикорастущих видов *Solanum*. Среди них 4 клона оказались производными *S. alandiae*, 9 — двувидовыми гибридами, производными *S. okadae*, *S. chacoense* или *S. stoloniferum*, а также ранее созданными донорами устойчивости к

нематоды (клоны 190-4, 90-7-7, 90-6-2) (21) и потомством от скрещивания 90-6-2 с сортами.

3. Число образцов картофеля (*Solanum L.*) с идентифицированными ДНК маркерами *R*-генов устойчивости в разных фенотипических классах

Маркер (ген)	Фенотип		$\chi^2\Phi$	Γ_A
	устойчивый	восприимчивый		
	Устойчивость к <i>Synchytrium endobioticum</i>			
NL 25 (<i>Sen I</i>) (+)	13	7		
Не обнаружен (-)	1	26		
Всего	14	33	17,81*	0,62*
	Устойчивость к <i>Globodera rostochiensis</i>			
TG 689 (<i>HI</i>) (+)	0	4		
57 R (<i>HI</i>) (+)	0	2		
57 R + N 195(<i>HI</i>) (+)	8	0		
TG 689+57 R + N 195 (+)	12	2		
Не обнаружены (-)	4	27		
Всего	24	35	18,53*	0,59*
	Устойчивость к Y-вирусу картофеля			
RYSC3 (<i>Ry adg</i>) (+)	6	5		
YES3-3A (<i>Ry sto</i>) (+)	3	0		
Не обнаружены (-)	12	35		
Всего	21	40	5,56	—

Примечание. «+» и «-» — соответственно наличие и отсутствие маркера; $\chi^2\Phi$ — выборочный критерий χ^2 , Γ_A — коэффициент ассоциации. Проверк означает, что коэффициент не определяли, так как связь маркер—признак не была установлена.

* Величина статистически значима при $\alpha = 0,1\%$.

Изучив реакцию 61 генотипа картофеля на инфекцию YВК, мы выявили 21 образец, устойчивый к YВК (см. табл. 3). В исследованном наборе единственным сортом, устойчивым к YВК, оказался Метеор, остальные селекционные и аборигенные образцы поражались вирусом при искусственном заражении. Из 20 гибридных клонов, устойчивых к YВК, 9 были трехвидовыми гибридами, в родословную которых входили *S. tuberosum*, *S. andigenum* и *S. rybinii*. Это ранее созданные в ВИР доноры устойчивости к Y-вирусу — клоны 90-6-2, 97-155-1 (23) и потомство от их скрещивания с сортами. К YВК были устойчивы все двувидовые гибриды с *S. chacoense*: шесть клонов, отобранных в потомстве от скрещивания с *S. okadae*, и два клона — производные *S. tuberosum* × *S. chacoense*. Устойчивыми к вирусу оказались и три сложных многовидовых гибрида.

Для оценки взаимосвязи присутствия ДНК маркеров и устойчивости сортов и гибридных клонов картофеля к нематоды, раку и YВК мы проанализировали четырехпольные таблицы, в которых была представлена численность двух фенотипических классов (устойчивые и восприимчивые образцы) и групп с идентифицированными и не обнаруженными ДНК маркерами соответствующих генов устойчивости (см. табл. 3). Результаты детекции разных маркеров генов устойчивости к нематоды и YВК учитывали как общее число (сумму) всех обнаруженных маркеров. Оценка распределения образцов по фенотипическим классам и группам с использованием критерия χ^2 позволяет сделать вывод о том, что между реакцией картофеля на нематоду *G. rostochiensis* патотипа Ro1 и маркерами гена *HI*, а также между реакцией растений на *S. endobioticum* патотипа 1 и маркером гена *Sen I* имелась статистически доказанная зависимость. Выборочные значения χ^2 значительно превышали критические (см. табл. 3), и H_0 -гипотеза опровергалась на высоком уровне значимости ($p < 0,001$). Также нами установлена связь между устойчивостью к нематоды и раку картофеля и детектированными маркерами соответствующих *R*-генов, о чем свидетельствовали значимые коэффициенты ассоциации Γ_A (см. табл. 3). Среди использованных для молекулярно-генетического скрининга ДНК маркеров гена *HI* наиболее тесную связь маркер—признак имели 57 R и N 195

(коэффициенты корреляции Спирмена $r_s = 0,72$ и $0,79$).

Сопоставление данных детекции маркеров и оценки на устойчивость к нематоды *G. rostochiensis* Ro1 выявило ложноположительные результаты у сортообразцов Atzimba и Невский (обнаружен маркер 57 R), клонов 160-1, 160-17, 159-31, 97-152-8 (маркер TG 689) и клонов 90-7-2, 39-1-2005 (все три маркера гена *HI*). Вероятной причиной присутствия маркерных фрагментов, амплифицируемых с использованными праймерами, у поражаемых нематодой образцов картофеля может быть сложная структура локуса *HI*, для которого характерна многокопийность фрагментов гомологов других *R*-генов или генов, кодирующих структурный белок в составе клеточной стенки растений (28). То, что у нематодоустойчивого клона 99-6-6 не обнаружили маркеров гена *HI*, согласуется с результатами молекулярного скрининга селекционно-генетической коллекции ВНИИКХ, при котором маркеры гена *HI* также не были детектированы у четырех клонов, в том числе у 99-6-6 (31). Расщепление в потомстве от самоопыления и скрещивания клона 99-6-6 с восприимчивыми сортами Загадка Питера и Петербургский указывает на полигенную природу устойчивости клона 99-6-6 к нематоды (32), чем объясняется отсутствие ДНК маркеров гена *HI* при ПЦР-анализе.

При сопоставлении данных детекции маркера NL 25 гена *Sen1* и оценки на устойчивость к *S. endobioticum* были получены ложноположительные результаты у одного клона — производного *S. alandiae*, четырех клонов, в родословной которых присутствовали культурные виды картофеля, и двух многовидовых гибридов. Для объяснения генетической природы устойчивости картофеля к *S. endobioticum* патотипа 1 предлагаются две модели, согласно которым защитный эффект проявляется в результате экспрессии одного доминантного гена *Sen1* или совместного действия двух доминантных генов *Sen1* и *Sen1-4*, локализованных соответственно на 11-й и 4-й хромосомах (30, 33). Возможно, что выявленные различия в эффективности применения маркера NL 25 гена *Sen1* для скрининга гибридных клонов были связаны с различиями в генетическом контроле форм, использованных в качестве источников устойчивости. Ложноотрицательные результаты образцов, устойчивых к *G. rostochiensis* Ro1 или к *S. endobioticum*, могли быть получены вследствие недостаточной точности фенотипической оценки в лабораторных испытаниях или в результате рекомбинации в сайтах, расположенных между маркерным фрагментом и геном. Возможно также, что устойчивость обеспечивают другие гены (7).

В выполненном исследовании для распределений образцов картофеля по признаку устойчивости к YBK и наличию маркеров генов *Ry_{adg}* и *Ry_{sto}* значимость выборочного критерия χ^2 не доказана из-за большого числа устойчивых генотипов, у которых маркеры известных генов иммунитета картофеля к YBK не были обнаружены (см. табл. 3). У четырех образцов, восприимчивых к Y-вирусу, — чилийской формы Frutilla, сортов Валерий, Bintje и клона 97-162-5 детектировали маркер RYSC3 гена *Ry_{adg}*. Рекомендация использовать SCAR маркер RYSC3 для идентификации образцов с геном *Ry_{adg}* была основана на результатах обследования 103 сортов и селекционных клонов, в том числе сорта Bintje, у которого указанный маркер исходно не был детектирован (25). Возможно, различия в условиях проведения ПЦР-реакции привели к ложноположительным результатам в нашем эксперименте. С маркером YES3-3A гена *Ry_{sto}* ложноположительных случаев не фиксировали. Этот маркер был детектирован нами у иммунного к Y-вирусу клона 97-155-1 и не обнаружен у выделенных в его потомстве от самоопыления клонов 160-1 и 160-17. В опыте об-

следовали и другого донора иммунитета к Y-вирусу — клон 90-6-2, а также пять клонов, выделенных в потомстве комбинации 90-6-2 с сортом Hertha или последующих скрещиваний. Признак устойчивости к Y-вирусу унаследовали все изученные гибридные генотипы, но маркеры, рекомендованные для идентификации генов *Ry*, мы у них не обнаружили.

Маркеры RYSC 3 и YES 3A — это участки ДНК, фланкирующие *Ry* гены, полная последовательность которых еще не известна. Многие исследователи оценивали диагностическую ценность ДНК маркеров генов *Ry_{sto}* и *Ry_{adg}* в ПЦР, используя ряд праймеров. Во всех экспериментах по скринингу сортов и селекционных клонов из разных коллекций, а также расщепляющихся популяций обнаружено не полное соответствие данных фенотипической оценки и маркерного анализа (34-36). Очевидно, что необходимы дополнительные исследования генетической природы иммунитета к вирусу Y у разных форм картофеля и разработка более совершенных ДНК маркеров генов устойчивости.

Впервые в мировой практике нами проведен мультиплексный ПЦР-анализ генетически разнообразных сортообразцов и селекционных клонов картофеля с использованием ДНК маркеров восьми *R*-генов. В исследованной выборке из 90 генотипов картофеля максимальное число (пять генов устойчивости) обнаружено у сортов Метеор и Нур-Алем. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, которые при изучении сортов и селекционного материала различного происхождения находили не более 5 % уникальных генотипов — потенциальных источников пяти-шести генов устойчивости одновременно (13, 17). Очевидно, что генотипы с пирамидой генов устойчивости картофеля к разным патогенам мало распространены, но их создание при целенаправленной селекционной работе представляется достижимой задачей. Это подтверждается успешным получением межвидовых гибридов картофеля, у которых идентифицировано от четырех до пяти *R*-генов устойчивости к фитофторозу (37). Проведение молекулярного скрининга, конечно, не означает отказ от фенотипической оценки селекционного материала, в том числе по устойчивости к болезням и вредителям. Однако применение мультиплексного ПЦР-анализа для идентификации генотипов с несколькими генами устойчивости разной специфичности позволит ускорить создание сортов картофеля, устойчивых к комплексу опасных болезней и вредителей. Стоимость мультиплексного ПЦР-анализа по пяти маркерам одного образца картофеля в 28 раз меньше стоимости оценки на устойчивость к одному вредному организму (цистообразующей нематоды или вирусу), и экономическая выгода будет особенно ощутима при массовом анализе на начальных этапах выполнения селекционных программ (9). Необходимо, чтобы мультиплексный ПЦР-анализ был интегрирован в селекцию картофеля, подобно тому, как технология оздоровления картофеля от вирусов методом культуры апикальных меристем и микроклональное размножение включены в современную систему семеноводства.

Таким образом, мультиплексный ПЦР-анализ позволяет идентифицировать среди генетически разнообразных форм картофеля генотипы с несколькими (до пяти) генами устойчивости разной специфичности, в том числе обеспечивающими устойчивость к нематоды *Globodera rostochiensis* Ro1, раку *Synchytrium endobioticum* (патотип 1) и Y-вирусу картофеля. Тесная связь существует между маркерами 57 R и N 195 гена *H1* и устойчивостью образцов картофеля к нематоды *G. rostochiensis* Ro1 (коэффициент ассоциации $\gamma_A = 0,59$, коэффициенты корреляции Спирмена $r_s = 0,72-0,79$) и между маркером NL 25 гена *Sen1* и устойчивостью образцов картофеля к

раку ($r_A = 0,62$). Для проведения маркер-опосредованного отбора (marker-assisted selection, MAS) по генам устойчивости к Y-вирусу необходимо исследование генетической природы иммунитета у разных форм картофеля и разработка новых эффективных ДНК маркеров генов устойчивости.

¹ФГБНУ ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42-44, e-mail: rogozinaelena@gmail.com ✉, e.potokina@yahoo.com, e.yurkina@vir.nw.ru;

Поступила в редакцию
19 февраля 2018 года

²ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии, 127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42, e-mail: elena-terentev@inbox.ru, nikylin_a@list.ru;

³ООО «Синтол», 127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42, e-mail: jalex@syntol.ru;

⁴ФГБУН Институт аналитического приборостроения РАН, 198095 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31-33, e-mail: jalex@syntol.ru

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2019, V. 54, № 1, pp. 19-30

MULTIPLEX PCR-BASED IDENTIFICATION OF POTATO GENOTYPES AS DONORS IN BREEDING FOR RESISTANCE TO DISEASES AND PESTS

E.V. Rogozina¹, E.V. Terentjeva^{2, 3}, E.K. Potokina¹, E.N. Yurkina¹, A.V. Nikulin², Ya.I. Alekseev^{3, 4}

¹Federal Research Center Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42-44, ul. Bol'shaya Morskaya, St. Petersburg, 190000 Russia, e-mail rogozinaelena@gmail.com (✉ corresponding author), e.potokina@yahoo.com,

²All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia, e-mail elena-terentev@inbox.ru, nikylin_a@list.ru;

³LLC Syntol, 42, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia, e-mail jalex@syntol.ru;

⁴Institute for Analytical Instrumentation RAS, 31-33, ul. Ivana Chernyh, St. Petersburg, 198095 Russia, e-mail jalex@syntol.ru

ORCID:

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

Yurkina E.N. orcid.org/0000-0002-4513-194X

Terentjeva E.V. orcid.org/0000-0003-2777-0948

Nikulin A.V. orcid.org/0000-0002-8197-7694

Potokina E.K. orcid.org/0000-0002-2578-6279

Alekseev Ya.I. orcid.org/0000-0002-1696-7684

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (project No. 14.579.21.0012 of June 05, 2014, ID RFMEFI57914X0012), the used plant material is maintained within the framework of theme No. 0662-2019-0004 (VIR)

Received February 19, 2018

doi: 10.15389/agrobiology.2019.1.19eng

Abstract

The breeding of potatoes with the traditional technology of hybridization and selection of individual plants is a time-consuming process. The use of DNA markers linked to genes underlying resistance to diseases and pests can significantly improve the efficiency of the selection of valuable genotypes in the early stages of breeding process. The aims of the work were i) screening of potato genetic resources from the VIR collection (Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg) for the presence of genes encoding resistance to cyst-forming nematodes, potato wart, potato viruses X and Y (PVX and PVY) by the multiplex PCR method; ii) evaluation of the effectiveness of molecular markers for the identification of potato genotypes resistant to the golden nematode, potato wart and PVY. A total of 90 accessions from the VIR collection were studied, among them the cultivated potatoes from two subspecies, the *S. tuberosum* subsp. *chiloense* (native varieties of Chile) and *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* (breeding varieties), as well as hybrid clones have been distinguished as sources and donors of potato resistance to pathogens of the economically significant or quarantine diseases. In this work, several molecular markers that were early recommended for the identification of potato genes responsible for the resistance to cyst nematodes, Y and X viruses, and potato wart were first used for the multiplex PCR analysis of genetically diverse material. Ten markers used were TG 689, 57 R, N 195 of *H1* gene and Gro1-4-1 of *Gro1-4* gene (resistance to the

golden nematode *Globodera rostochiensis* pathotypes Ro1, Ro4), marker Gpa 2-2 of *Gpa2* gene (resistance to the pale nematode *G. pallida* pathotype Pa2), RYSC3 marker of *Ry_{adg}* gene, Ry 186 marker of *Ry_{che}* gene and YES3-3A marker of *Ry_{sto}* gene (all genes provide immunity to the potato virus Y), the PVX marker of the *Rx* gene (immunity to potato virus X) and the NL 25 marker of the *Sen1* for resistance to potato wart caused by *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Percival. The PCR screening results were matched with the phenotypic characteristics of the test potato genotypes for resistance to the golden nematode, wart and potato virus Y. Multiplex PCR analysis allowed us to identify potato genotypes with several (up to five) resistance genes, including those providing resistance to the nematode *G. rostochiensis* patotype Ro1, *S. endobioticum* patotype 1 and potato virus Y. A significant association was established between the molecular markers linked to the *H1* gene and the resistance of potato genotypes to the nematode *G. rostochiensis* Ro1 ($r_A = 0.59$, $r_s = 0.72-0.79$), and between the marker N L25 of *Sen1* gene and potato resistance to wart ($r_A = 0.62$). No association was detected between *Ry_{adg}* and *Ry_{sto}* molecular markers and plant resistance to potato virus Y due to a large number of tested resistant potato genotypes which possibly carry unknown immunity genes.

Keywords: potato, *Solanum* ssp., interspecific hybrids, DNA markers, marker assisted selection, potato wart, *Synchytrium endobioticum*, nematodes, *Globodera rostochiensis* Ro1, potato virus Y.

REFERENCES

1. Ross Kh. *Selektsiya kartofelya — problemy i perspektivy* [Potato breeding - problems and prospects]. Moscow, 1989 (in Russ.).
2. Bradshaw J.E. Potato breeding at the Scottish Plant Breeding Station and the Scottish Crop Research Institute: 1920-2008. *Potato Res.*, 2009, 52(2): 141-172 (doi: 10.1007/s11540-009-9126-5).
3. Simakov E., Sklyarova N., Yashina I. *Metodicheskie ukazaniya po tekhnologii selektsionnogo protsessa kartofelya* [Methodical instructions for potato breeding process technology]. Moscow, 2006 (in Russ.).
4. Carputo D., Frusciante L. Classical genetics and traditional breeding. In: *Genetics, genomics and breeding of potatoes*. J.M. Bradeen, K.G. Haynes (eds.). Science Publishers, Enfield, NH, 2011: 20-40.
5. 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).
6. Slater A., Cogan N., Hayes B., Schultz L., Dale M., Bryan G., Forster J. Improving breeding efficiency in potato using molecular and quantitative genetics. *Theor. Appl. Genet.*, 2014, 127(11): 2279-2292 (doi: 10.1007/s00122-014-2386-8).
7. 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).
8. Simko I., Jansky S., Stephenson S., Spooner D. Genetics of resistance to pests and disease. In: *Potato biology and biotechnology: advances and perspectives*. D. Vreugdenhil, J. Bradshaw, C. Gebhardt, F. Govers, M. Taylor, D. MacKerron, H. Ross (eds.). Elsevier, Amsterdam, 2007, 7: 117-155.
9. Slater A., Cogan N., Forster J. Cost analysis of the application of marker-assisted selection in potato breeding. *Mol. Breeding*, 2013, 32(2): 299-310 (doi: 10.1007/s11032-013-9871-7).
10. Ramakrishnan A., Ritland C., Sevillano B., 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).
11. Tiwari J., Gopal J., Singh B. Marker-assisted selection for virus resistance in potato: options and challenges. *Potato J.*, 2012, 39(2): 101-117.
12. Tiwari J., Siddappa S., Singh B., Kaushik S., Chakrabarti S., Bhardwaj V., Chandel P. Molecular markers for late blight resistance breeding of potato: an update. *Plant Breeding*, 2013, 132(3): 237-245 (doi: 10.1111/pbr.12053).
13. 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).
14. Witek K., Strzelczyk-Zyta D., Hennig J., Marczewski W. A multiplex PCR approach to simultaneously genotype potato towards the resistance alleles *Ry-f_{sto}* and *Ns*. *Mol. Breeding*, 2006, 18(3): 273-275 (doi: 10.1007/s11032-006-9021-6).
15. Antonova O., Shvachko N., Novikova L., Shuvalov O., Kostina L., Klimenko N., Shuvalova A., Gavrilenko T. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii*, 2016, 20(5): 596-606 (doi: 10.18699/VJ16.181) (in Russ.).
16. Biryukova V., Shmyglya I., Abrosimova S., Zapekina T., Meleshin A., Mityushkin A., Mananov V. *Zashchita kartofelya*, 2015, 1: 3-7 (in Russ.).

17. Ermishin A., Svitoch O., Voronkova E., Luksha V., Gukasyan O., Polyukhovich Yu., Zharich V. *Otsenka iskhodnogo materiala kartofelya po sostavu i allel'nomu sostoyaniyu genov ustoichivosti k boleznyam i vreditelyam s tsel'yu optimizatsii podbora roditel'skikh form dlya gibridizatsii: metod. Rekom* [Evaluation of potato source material on the composition and allelic status of disease and pest resistance genes in order to optimize the selection of parental forms for hybridization: Methodical instructions]. Minsk, 2016 (in Russ.).
18. Dorozhkin B., Dergacheva N. *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii*, 2007, 163: 167-179 (in Russ.).
19. Kozlov V., Rogozina E. *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii*, 2014, 17(2): 61-72 (in Russ.).
20. Simakov E., Zharova V., Mityushkin A., Biryukova V., Rogozina E., Kiru S. *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii*, 2017, 178(2): 113-121 (in Russ.).
21. Budin K.Z. *Geneticheskie osnovy sozdaniya donorov kartofelya* [Genetic basis for the creation of potato donors]. St. Petersburg, 1997 (in Russ.).
22. Kostina L.I. *Kartofel' Chili* [Chile Potatoes]. St. Petersburg, 2016 (in Russ.).
23. Rogozina E., Chalaya N., Beketova M., Biryukova V., Kirpicheva T., Kuznetsova M., Manankov V., Fadina O., Khlopyuk M., Khavkin E. *Mezhvidovye gibridy kartofelya, ustoichivye k vzbuditel'yam boleznei. Katalog mirovoi kolleksii VIR*, Vyp. 866 [Interspecific hybrids of potato, resistant to pathogens. Catalog of the World Collection VIR, Iss. 866]. St. Petersburg, 2018 (in Russ.).
24. Lakin G.F. *Biometriya* [Biometrics]. Moscow, 1990 (in Russ.).
25. Kasai K., Morikawa Y., Sorri V., Valkonen J., Gebhardt C., Watanabe K. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene Ryadg based on a common feature of plant disease resistance genes. *Genome*, 2000, 43(1): 1-8 (doi: 10.1139/g99-092).
26. Song Y., Schwarzfischer A. Development of STS markers for selection of extreme resistance (*Ry_{sto}*) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars. *Am. J. Potato Res.*, 2008, 85(5): 392-393 (doi: 10.1007/s12230-008-9044-0).
27. Milczarek D., Flis B., Przetakiewicz A. Suitability of molecular markers for selection of potatoes resistant to *Globodera* spp. *Am. J. Potato Res.*, 2011, 88(3): 245-255 (doi: 10.1007/s12230-011-9189-0).
28. Finkers-Tomczak A., Bakker E., de Boer J., van der Vossen E., Achenbach U., Golas T., Suryaningrat S., Smant G., Bakker J. and Goverse 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(3): 595-608 (doi: 10.1007/s00122-010-1472-9).
29. 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. *Breeding Sci.*, 2012, 62(2): 142-150 (doi: 10.1270/jsbbs.62.142).
30. 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(3-4): 379-386 (doi: 10.1007/s001220051).
31. Biryukova V., Shmyglya I., Abrosimova S., Manankov V., Mityushkin A., Rogozina E., Kiru S., Chalaya N., Meleshin A., Zharova V. *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii*, 2017, 178(1): 92-103 (in Russ.).
32. Rogozina E., Limantseva L., Biryukova V. *Doklady Rossiiskoi akademii sel'skokhozyaistvennykh nauk*, 2012, 3: 16-19 (in Russ.).
33. Brugmans B., Hutten R., Rookmaker A., Visser R., van Eck H. Exploitation of a marker dense linkage map of potato for positional cloning of a wart disease resistance gene. *Theor. Appl. Genet.*, 2006, 112: 269-277 (doi: 10.1007/s00122-005-0125-x).
34. Fulladosa A., Navarro F., Kota R., Severson K., Palta J., Charkowski A. Application of marker assisted selection for Potato Virus Y resistance in the University of Wisconsin potato breeding program. *Am. J. Potato Res.*, 2015, 92(3): 444-450 (doi: 10.1007/s12230-015-9431-2).
35. Nie X., Lalany F., Dickison V., Wilson V., Singh M., De Koeper D., Murphy A. Detection of molecular markers linked to *Ry* genes in potato germplasm for marker-assisted selection for extreme resistance to PVY in AAFCs potato breeding program. *Can. J. Plant Sci.*, 2016, 96(5): 737-742 (doi: 10.1139/cjps-2015-0335).
36. Ottoman R., Hane D., Brown C., Yilma S., James S., Mosley A., Crosslin J., Vales M. Validation and implementation of marker-assisted selection (MAS) for PVY resistance (*Ry adg* gene) in a tetraploid potato breeding program. *Am. J. Potato Res.*, 2009, 86(4): 304-314 (doi: 10.1007/s12230-009-9084-0).
37. Fadina O., Beketova M., Sokolova E., Kuznetsova M., Smetanina T., Rogozina E., Khavkin E. Anticipatory breeding: molecular markers as a tool in developing donors of potato (*Solanum tuberosum* L.) late blight resistance from complex interspecific hybrids. *Agricultural Biology*, 2017, 52(1): 84-94 (doi: 10.15389/agrobiology.2017.1.84eng).