

## РАЗРАБОТКА ХРОМОСОМО-СПЕЦИФИЧНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИНТРОГРЕССИВНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ КАРТОФЕЛЯ С ДИКИМ МЕКСИКАНСКИМ АЛЛОТЕТРАПЛОИДНЫМ ВИДОМ *SOLANUM STOLONIFERUM* SCHLTDL.

Антонова О.Ю.,<sup>1</sup> Ермишин А.П.,<sup>2\*</sup> Левый А.В.,<sup>2</sup>  
Агеева А.С.,<sup>2</sup> Воронкова Е.В.,<sup>2</sup> Гавриленко Т.А.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44;  
✉ \*tatjana9972@yandex.ru

<sup>2</sup> Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 220072 Республика Беларусь, г. Минск, ул. Академическая, 27;  
✉ \*ermishin@igc.by

Для вовлечения в селекцию дикого аллотетраплоидного мексиканского вида картофеля *Solanum stoloniferum* Schldl. (геномный состав AABB) обычно используют пентаплоидные межвидовые гибриды (AAAAB) с культурным картофелем *S. tuberosum* L. (AAAA), которые в дальнейшем включают в программу возвратных скрещиваний. Поскольку у таких гибридов в мейозе ожидается синاپсис гомологичных хромосом А генома, возникает вопрос о перспективах интрогрессивной гибридизации генетического материала суб-генома В *S. stoloniferum*. В связи с этим актуальна разработка различных схем селекционного процесса, позволяющих повысить вероятность интрогрессии генетического материала суб-генома В в геном культурного картофеля. В предыдущих исследованиях были разработаны четыре схемы вовлечения *S. stoloniferum* в селекционный процесс, которые включают возвратные скрещивания с культурным картофелем различных межвидовых гибридов: гексаплоидного (геномный состав AAAABВ, традиционная схема интрогрессии), тетраплоидного гибрида (предполагаемый геномный состав АААВ) и потомства, полученного от его самоопыления, а также пентаплоидного межвидового гибрида (предполагаемый геномный состав АААВВ). В настоящей работе представлены первые результаты исследований по разработке хромосомоспецифичных маркеров для идентификации у межвидовых гибридов генетического материала *S. stoloniferum*. В скрещиваниях был использован перспективный образец *S. stoloniferum* PI 205522, высокоустойчивый к фитофторозу и Y-вирусу картофеля, у которого выявлен ряд ДНК-маркеров генов устойчивости к этим патогенам. Для изучения особенностей интрогрессии генетического материала *S. stoloniferum* был создан набор из 23 SSR- и CAPS-маркеров с известной хромосомной локализацией в геноме А *S. tuberosum*, выявляющих полиморфизм родительских генотипов - диплоидного клона IGC 10/1.21 культурного картофеля *S. tuberosum* и образца PI 205522 *S. stoloniferum*. Все маркеры, специфичные для родительского образца дикого вида, были выявлены как у триплоидного (ААВ), так и у пентаплоидного (АААВВ) гибридов *S. stoloniferum* × *S. tuberosum*. Созданный набор маркеров будет использован для оценки эффективности различных схем интрогрессии генетического материала *S. stoloniferum*, в которых получены гибриды второго и третьего поколений беккроссов межвидовых гибридов с культурным картофелем.

**Ключевые слова:** картофель, *Solanum tuberosum*, межвидовая гибридизация, *S. stoloniferum* интрогрессия, маркеры SSR, CAPS, STS, SCAR.

**Прозрачность финансовой деятельности / Financial transparency** Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. / The authors have no financial interest in the presented materials or methods. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

**Дополнительная информация / Additional information** Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-4-03>

**Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer**

**Все авторы одобрили рукопись / All authors approved the manuscript**

**Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest**

## DEVELOPMENT OF CHROMOSOME-SPECIFIC DNA MARKERS FOR A STUDY ON INTROGRESSIVE HYBRIDIZATION OF POTATO WITH THE WILD MEXICAN ALLOTTETRAPLOID SPECIES *SOLANUM STOLONIFERUM* SCHLTDL.

Antonova O. Yu.,<sup>1</sup> Yermishin A. P.,<sup>2\*</sup> Levy A. V.,<sup>2</sup>  
Ageeva A. S.,<sup>2</sup> Voronkova E. V.,<sup>2</sup> Gavrilenko T. A.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia;  
✉ \*tatjana9972@yandex.ru

<sup>2</sup> Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, 27 Akademicheskaya Street, Minsk 220072, Republic of Belarus;  
✉ \*ermishin@igc.by

In order to involve valuable germplasm of the wild Mexican allotetraploid potato species *Solanum stoloniferum* Schldl. (genomic composition AABB) into breeding, pentaploid interspecific hybrids (AAAAB) with cultivated potato *S. tuberosum* L. (AAAA) and their backcross progenies are usually used. Homologous synapsis in meiosis of such hybrids is expected only between chromosomes of the A subgenome, therefore a question arose about a possibility of introgressing genetic material of the subgenome B into the A genome of cultivated potato. In this connection, development of various schemes for the B subgenome introgression into the genome of cultivated potato is considered as a topical issue. The previous research has yielded four schemes of *S. stoloniferum* involvement into breeding, which imply backcrossing with cultivated potato of the following interspecific hybrids: (1) hexaploids (genomic composition AAAABВ, the conventional introgression scheme), (2) tetraploids (putatively, AAAB), (3) self-pollination progeny of a 4x hybrid and (4) pentaploid hybrids with a putative genome composition of AAAABВ. The present paper presents the first results of the development of chromosome-specific DNA markers for the identification of *S. stoloniferum* chromosomes in interspecific hybrids. An *S. stoloniferum* accession PI 205522 with a high degree of resistance to late blight and PVY had been found to possess several DNA-markers of the R-genes conferring resistance to these pathogens and was used in hybridization as a promising parent. A set of 23 SSR- and CAPS markers with the known chromosome location in *S. tuberosum* was generated. These markers detect polymorphism between parent genotypes, i.e., the diploid clone IGC 10/1.21 of cultivated potatoes *S. tuberosum*, and accession PI 205522 of *S. stoloniferum*. All the markers specific for the wild species were found in triploid (AAB) and pentaploid (AAAABВ) hybrids of *S. stoloniferum* × *S. tuberosum*. This set of markers will be used for efficiency assessment of different schemes for *S. stoloniferum* genetic material introgression into the obtained BC2-BC3 generations after crossing the interspecific hybrids with cultivated potato.

**Key words:** potato, *Solanum tuberosum*, interspecific hybridization, *S. stoloniferum* introgression, SSR, CAPS, STS, SCAR markers.

**Для цитирования:** Антонова О.Ю., Ермишин А.П., Левый А.В., Агеева А.С., Воронкова Е.В., Гавриленко Т.А. Разработка хромосомо-специфичных ДНК-маркеров для изучения интрогрессивной гибридизации картофеля с диким мексиканским аллотетраплоидным видом *Solanum stoloniferum* Schldl. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(4):24-35. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-4-03

**For citation:** Antonova O. Yu., Yermishin A. P., Levy A. V., Ageeva A. S., Voronkova E. V., Gavrilenko T. A. Development of chromosome-specific markers for a study on introgressive hybridization of potato with the wild Mexican allotetraploid species *Solanum stoloniferum* Schldl. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(4):24-35. (In Russ.) DOI: 10.30901/2658-6266-2019-4-03

Antonova O. Yu. <https://orcid.org/0000-0001-8334-8069>

Yermishin A. P. <https://orcid.org/0000-0002-3106-4926>

Voronkova E. V. <https://orcid.org/0000-0001-9747-8622>

Gavrilenko T. A. <https://orcid.org/0000-0002-2605-6569>

УДК 631.524.86:[633.11+635.21]:632.3/4:577.21.08

Поступила в редакцию: 04.11.2019

Принята к публикации: 19.12.2019

## Введение

Мексиканский аллотетраплоидный дикий вид картофеля *Solanum stoloniferum* ( $2n=4x=48$ , геномная формула AABB) представляет значительный интерес для селекции в качестве источника ценных генов устойчивости к фитофторозу, крайней устойчивости к вирусам PVY, PVX и PVA, ряду бактериальных заболеваний, высоким температурам, вредителям картофеля (нескольким видам тлей) (Ross, 1986; Hawkes, 1990; Yermishin, 2014). Из-за ряда межвидовых репродуктивных барьеров, осложняющих интрогрессивную гибридизацию, в практической селекции использовалось сравнительно небольшое число образцов этого вида. Так, при гибридизации *S. stoloniferum* с тетраплоидными сортами культурного картофеля - *S. tuberosum* ( $2n=4x=48$ , геномная формула AAAA) гибридные семена не образуются из-за нарушения развития эндосперма. В соответствии с теорией EBN (Johnston et al., 1980) эти виды относят к разным группам скрещиваемости, так как они имеют разные значения балансового числа эндосперма (соответственно EBN=2 и EBN=4). Однако образцы *S. stoloniferum* могут скрещиваться в качестве материнских форм с дигаплоидами *S. tuberosum* ( $2x$ , 2 EBN) и многими диплоидными ( $2x$ , EBN=2) видами картофеля с образованием триплоидных гибридов (Ramanna, Abdalla, 1970; Adiwilaga, Brown, 1991; Bamberg, 1994). Такие триплоидные гибриды являются жизнеспособными, однако в силу значительных нарушений мега- и микроспоорогенеза полностью стерильны, что не позволяет осуществлять их беккроссирование культурным картофелем.

Для скрещиваний *S. stoloniferum* с культурным картофелем характерна односторонняя несовместимость, при которой гибридные семена удается получить при использовании данного дикого вида в качестве материнской формы, а реципрокные скрещивания оказываются неудачными (Jackson, Hanneman, 1999; Hayes et al., 2005). С цитоплазмой *S. stoloniferum* связана мужская стерильность межвидовых гибридов (Ross, 1986; Lössl et al., 2000; Song, Schwarzfischer, 2008; Gavrilenko et al., 2019).

Одним из существенных факторов, которые могут затруднять интрогрессию ценного генофонда дикого аллотетраплоидного вида картофеля *S. stoloniferum* (геномный состав AABB) в селекционный материал, являются геномные различия с культурным картофелем *S. tuberosum* (геномный состав AAAA). Большинство методов вовлечения *S. stoloniferum* в селекцию основано на увеличении уровня пloidности этого дикого вида или триплоидных межвидовых гибридов [*S. stoloniferum* × дигаплоиды *S. tuberosum* – геномная формула AAB] и на последующем многократном беккроссировании полученных полиплоидных межвидовых гибридов с культурным картофелем (Swaminathan, 1951; Lamm, 1953; von Wangenheim, 1954; Camadro, Espinillo, 1991; Watanabe et al., 1992; Yermishin et al., 2017b; Brown, 1988; Adiwilaga, Brown, 1991; Bamberg et al., 1994). Полученные в результате беккроссирования

(BC<sub>1</sub>) пентаплоидные межвидовые гибриды (AAAAB), имеют субгеном В дикого вида в гаплоидном состоянии. У таких межвидовых гибридов в мейозе ожидается синапсис гомологичных хромосом А генома, а не имеющие гомологов хромосомы субгенома В будут наследоваться случайным образом и в последовательных возвратных скрещиваниях элиминироваться. В связи с этим актуальна разработка различных схем селекционного процесса, позволяющих повысить вероятность гомеологичной рекомбинации и интрогрессии генетического материала субгенома В *S. stoloniferum* в геном А культурного картофеля.

Разрабатывая стратегию интрогрессивной гибридизации отдаленных видов семейства пасленовых, Т.А. Гавриленко с соавторами (Gavrilenko et al., 2015) продемонстрировали возможность существенного повышения частоты синапсиса гомеологичных хромосом у модельных гибридных генотипов, несущих гомеологичные геномы в гаплоидном состоянии. Для повышения вероятности спаривания хромосом субгенома В *S. stoloniferum* и генома А *S. tuberosum*, в настоящей работе предлагается получать тетраплоидные межвидовые гибриды (AAAB), у которых вероятность гомеологичной рекомбинации может быть выше, чем у пентаплоидных гибридов с геномным составом AAAAB (Adiwilaga, Brown, 1991; Watanabe et al., 1992; Bamberg et al., 1994; Spooner et al., 2008). В ряде работ удалось получить тетраплоидные гибриды между аллотетраплоидными дикими видами и культурным картофелем благодаря большому объему скрещиваний и использованию приема «двойного опыления» (rescue pollination) в сочетании с культурой *in vitro* незрелых зародышей или семян (Iwanaga et al., 1991; Singsit, Hanneman, 1991; Watanabe et al., 1992; Janssen et al., 1997; Panahandeh et al., 2008). Следует заметить, что эффективность гибридизации между аллотетраплоидными видами и сортами культурного картофеля очень низкая, прежде всего, из-за различий их эффективной пloidности (EBN). В цитированных выше работах отмечена зависимость успеха гибридизации от генотипа родительских форм и от условий окружающей среды при проведении скрещиваний. В то же время, тетраплоидные межвидовые гибриды имеют эффективную пloidность EBN=3, что затрудняет их дальнейшее беккроссирование с *S. tuberosum* (эффективная пloidность EBN=4). Поскольку в литературе описаны только единичные случаи получения тетраплоидных межвидовых гибридов и успешного их беккроссирования культурным картофелем, эффективность такой схемы интрогрессии генов дикого вида *S. stoloniferum* в селекционный материал не оценивалась, ее сравнение с традиционными схемами интрогрессии не проводилось.

Для идентификации хромосом А и В субгеномов *S. stoloniferum* эффективно использование методов молекулярной цитогенетики (Pendinen et al., 2008). Для решения этой задачи, а также изучения особенностей интрогрессии в селекционный материал генетического материала *S. stoloniferum* также эффективно использование полиморфных

хромосома-специфичных маркеров. В литературе описано большое число монолокусных хромосома-специфичных последовательностей генома картофеля, для которых разработаны различные серии ДНК маркеров (RFLP-, SSR-, STS- и CAPS-маркеры) (Milbourne et al., 1998; Oberhagemann et al., 1999; Chen et al., 2001; Feingold et al., 2005; Ghislain et al., 2009). Также в качестве хромосома-специфичных маркеров можно рассматривать и маркеры картированных генов устойчивости к болезням, интродуцированных в культурный картофель от *S. stoloniferum*, например, маркеры генов *Ry<sub>sto</sub>*, *Ry-f<sub>sto</sub>*, *Rpi-stol* (Song, Schwarzfischer, 2008; Flis et al., 2005; Valkonen et al., 2008; Zhu et al., 2012).

В настоящей работе представлены результаты реализации четырех схем вовлечения в селекцию перспективного образца *S. stoloniferum* PI 205522, а также первые результаты по разработке хромосома-специфичных маркеров, перспективных для идентификации хромосом субгеномов А и В этого дикого вида в гибридном материале.

## Материал и методы

Образец PI 205522 был выделен на основании результатов молекулярного скрининга 26 коллекционных образцов *S. stoloniferum*, полученных из генбанка картофеля США (NRSP 6) с маркерами *R* генов устойчивости к патогенам. У этого образца выявлены ДНК-маркеры генов устойчивости к Y-вирусу картофеля (PVY) - *Ry<sub>adg</sub>*, *Ry<sub>sto</sub>*, *Ry-f<sub>sto</sub>* и к фитофторозу - *Rpi-stol*, *R3b* (Levy et al., 2017; Yermishin et al., 2017a). Растения этого образца практически не поражались фитофторозом в течение четырех лет полевых испытаний (2015-2018 гг., Минск), а также PVY при искусственном заражении.

В исследования по отбору хромосома-специфичных полиморфных маркеров дополнительно был включен и другой образец *S. stoloniferum* – к-17152, полученный из коллекции ВИР.

С участием образца PI 205522 *S. stoloniferum* в 2015 г. были получены гибриды с диплоидными клонами *S. tuberosum* и диплоидными линиями-посредниками (*SvSv*-линиями) (рис. 1) (Yermishin et al., 2017a; Yermishin et al., 2017b), уровень ploидности которых первоначально был определен по числу хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. В рамках настоящей работы у гибридов было определено число хромосом и проведено ДНК-маркирование.

**Определение числа хромосом гибридов.** Бутоны (длиной 2–5 мм) межвидовых гибридов фиксировали в фиксаторе Ньюкомера (Pausheva, 1970). Подсчет числа хромосом проводили в материнских клетках пыльцы на стадиях МI – ранняя АI и МII – ранняя АII (рис. 2) по методике, описанной в руководстве Л.И. Абрамовой (Abramova, 1981), используя микроскоп NU 2E (Carl Zeiss, Jena).

Межвидовые гибриды и их потомство были использованы в реализации различных схем интрогрессии (см. рис. 1):

**Схема 1.** В результате митотического удвоения хромосом триплоидного межвидового гибрида ( $2x SvSv$ -линия *S. tuberosum* × *S. stoloniferum* PI 205522) получен гексаплоидный клон IGC 15/118.3.C6.2016 (предполагаемый геномный состав AAAABB), который был использован в 2016 г. в качестве материнской формы для гибридизации с селекционным сортом картофеля Katahdin (Yermishin et al., 2017b). Для последующего беккроссирования пентаплоидных гибридов (BC<sub>1</sub>, предполагаемый геномный состав AAAAB) в 2017 и 2018 гг. использовали в качестве опылителей сорта: Carlita, Quarta, Satina, Манифест, Свитанок Киевский, Уладар, а в реципрокных скрещиваниях в качестве материнских форм – сорта Katahdin, Весна Белая, Фальварак, Чарауник, Янка. Эта схема – традиционная для вовлечения в селекционный процесс *S. stoloniferum*. Она рассматривается в качестве контрольной (см. рис. 1).

**Схемы 2 и 3.** При опылении гексаплоидного клона IGC 15/118.3.C6.2016 диплоидной линией *S. tuberosum* IGC 10/1.21 в 2015 г. получен тетраплоидный межвидовой гибрид IGC 16/36.1 (Yermishin et al., 2017b) (BC<sub>1</sub>, предполагаемая геномная формула - AAAB) (см. рис. 1). Для беккроссирования этого гибрида и его потомства от самоопыления в 2016-2019 гг. использовали сорта картофеля: Alcmaria, Carlita, Katahdin, Labadia, Lemchi Russet, Quarta, Satina, Манифест, Свитанок Киевский, Уладар, а также диплоидную линию *S. tuberosum* IGC 17n8 (AA,  $2n=24$ , EBN=2). Благодаря образованию нередуцированных гамет диплоидная линия IGC 17n8 ведет себя в скрещиваниях как сорта картофеля ( $2n=4x$ , EBN=4).

**Схема 4.** При получении триплоидных гибридов (*S. stoloniferum* PI 205522 ×  $2x S. tuberosum$  IGC 10/1.21) выделен пентаплоидный гибрид IGC 15/103.53) (Yermishin et al., 2017a) с предполагаемым геномным составом AAABB. Для его беккроссирования были использованы сорта: Alcmaria, Labadia, Lemchi Russet, Quarta, а также линия IGC 17n8.

**Получение поколений BC1-BC3: скрещивания и определение фертильности гибридов.** Для проведения гибридизации растения родительских форм выращивали при естественном освещении в условиях закрытого грунта Биологической опытной станции Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Условия окружающей среды в 2017-2018 гг. были типичными для летнего периода в Беларуси. В 2019 г условия для гибридизации картофеля были оптимальными: температура около 20°C, относительно высокая влажность воздуха из-за частых дождей. Для предотвращения самоопыления проводили кастрацию цветков материнских образцов (нераскрывшиеся бутоны), все неопыленные бутоны и раскрывшиеся неопыленные цветки в соцветии удаляли. Перед проведением гибридизации оценивали функциональную фертильность пыльцы (ФФП) путем определения частоты прорастания пыльце-



<p><u>Схема интрогрессии 1</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. SvSv-линия (2n=2x, геномная формула AA) × <i>S. stoloniferum</i> PI 205522 (2n=4x, sto, AABB) = IGC 15/118.3 (F<sub>1</sub>, 3x, AAB).</li> <li>2. IGC 15/118.3 (2n=3x, AAB) → митотическое удвоение хромосом = IGC 15/118.3.C6.2016 (2n=6x, AAAABB).</li> <li>3. IGC 15/118.3.C6.2016 (2n=6x, AAAABB) × Katahdin (2n=4x, tbr, AAAA) = IGC 16/N.n (BC<sub>1</sub>, 5x, AAAAB).</li> <li>4. IGC 16/N.n (BC<sub>1</sub>, 2n=5x, AAAAB) × Quarta (2n=4x, tbr, AAAA) = BC<sub>2</sub>; Янка (2n=4x, tbr, AAAA) × IGC 16/N.n (BC<sub>1</sub>, 2n=5x, AAAAB) = BC<sub>2</sub>.</li> </ol> <p><u>Схема интрогрессии 2</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. IGC 15/118.3.C6.2016 (2n=6x, AAAABB) × IGC10/1.21 (2n=2x, tbr, AA) = IGC 16/36.1 (BC<sub>1</sub>, 2n=4x, AAAB).</li> <li>2. IGC16/36.1(BC<sub>1</sub>, 2n=4x, AAAB) × Quarta (2n=4x, tbr, AAAA) = BC<sub>2</sub>.</li> </ol> <p><u>Схема интрогрессии 3</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. IGC 16/36.1 (2n=4x, AAAB) → самоопыление = IGC 18/71.1 и IGC 18/71.2 (2n=4x, AAAB).</li> <li>2. IGC 18/71.1(2) (2n=4x, AAAB) × Alcmaria (2n=4x, tbr, AAAA) = BC<sub>2</sub>.</li> </ol> <p><u>Схема интрогрессии 4</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. PI 205522.2 (2n=4x, sto, AABB) × IGC10/1.21 (2n=2x, tbr, AA) = IGC 15/103.53 (F<sub>1</sub>, 2n=5x, AAABB).</li> <li>2. IGC 15/103.53 (F<sub>1</sub>, 5x, AAABB) × Quarta (2n=4x, tbr, AAAA) = BC<sub>1</sub> (IGC 17/192.2, IGC 17/192.4, IGC 17/192.5).</li> <li>3. IGC 17/192.2(4,5) × Quarta (2n=4x, tbr, AAAA) = BC<sub>2</sub>.</li> </ol>
---

**Рис. 1. Схемы интрогрессии *S. stoloniferum* (sto) PI 205522 в селекционный материал с использованием межвидовых гибридов с различным уровнем пloidности и геномным составом. Трехбуквенные обозначения названия видов: *S. stoloniferum* (sto), *S. tuberosum* (tbr).**

**Fig.1. Schemes of *S. stoloniferum* (sto) PI 205522 introgression into breeding stock using interspecific hybrids with different ploidy levels and genomic composition. Designation of species: *S. stoloniferum* (sto), *S. tuberosum* (tbr).**

вых зерен в течение двух часов при 25°C на питательной среде (Pallais et al., 1985). Учитывали по 300 пыльцевых зерен на образец в нескольких полях зрения микроскопа (увеличение 600×).

**Выделение ДНК.** Препараты тотальной ДНК были выделены из листьев тепличных или *in vitro*-растений с использованием модифицированного метода СТАВ-экстракции (Gavrilenko et al., 2013) с последующей очисткой PVPP.

**Отбор полиморфных хромосомо-специфичных ДНК-маркеров.** Хромосомо-специфичные SSR-праймеры были подобраны по литературным источникам (Milbourne et al., 1998; Oberhagemann et al., 1999; Chen et al., 2001; Feingold et al., 2005; Ghislain et al., 2009), ряд CAPS-

маркеров был разработан сотрудниками отдела биотехнологии ВИР на основе информации о картированных монолокусных последовательностях генома А картофеля (<http://www.gabipd.org/database/maps.shtml>). В предварительных экспериментах праймеры апробировали на выборке из 48 генотипов образцов ди- и тетраплоидных культурных видов (*S. ajanhuirii* Juz. & Bukasov, *S. phureja* Juz. & Bukasov и *S. tuberosum*), обладающих ядерным А-геномом, диких диплоидных мексиканских видов картофеля с различным геномным составом: *S. verrucosum* Schltdl. (2n=2x, геном AA); *S. bulbocastanum* Dunal & Poir., *S. cardiophyllum* Lindl., *S. pinnatisectum* Dunal, *S. tarnii* Hawkes & Hjert. (2n=2x, геном BB) и *S. stoloniferum* (2n=4x, геном AABB) (неопубликованные данные). В дальнейший анализ межвидовых гибридов были включены праймеры, генерировав-

шие маркерные фрагменты, подвижность которых у образцов диких видов с геномом ВВ резко отличалась от таковой у образцов А-геномных видов (рис. 3, 4).

В рамках данной работы отбирали праймеры по их способности генерировать ПЦР-продукты, отличающиеся по размеру (непосредственно или после рестрикции) у родительских генотипов, использованных в межвидовой гибридизации. Наряду с микросателлитными и CAPS-маркерами в набор входил маркер blb1F/R гена *Rpi-blb1* (хромосома VIII) (Wang et al., 2008), детерминирующего устойчивость к широкому спектру рас возбудителя фитофтороза, и маркер локуса CP60, который у культурного картофеля сцеплен с геном *Rx1* (хромосома XII), контролирующим устойчивость к вирусу PVX картофеля (Gebhardt et al., 2006).

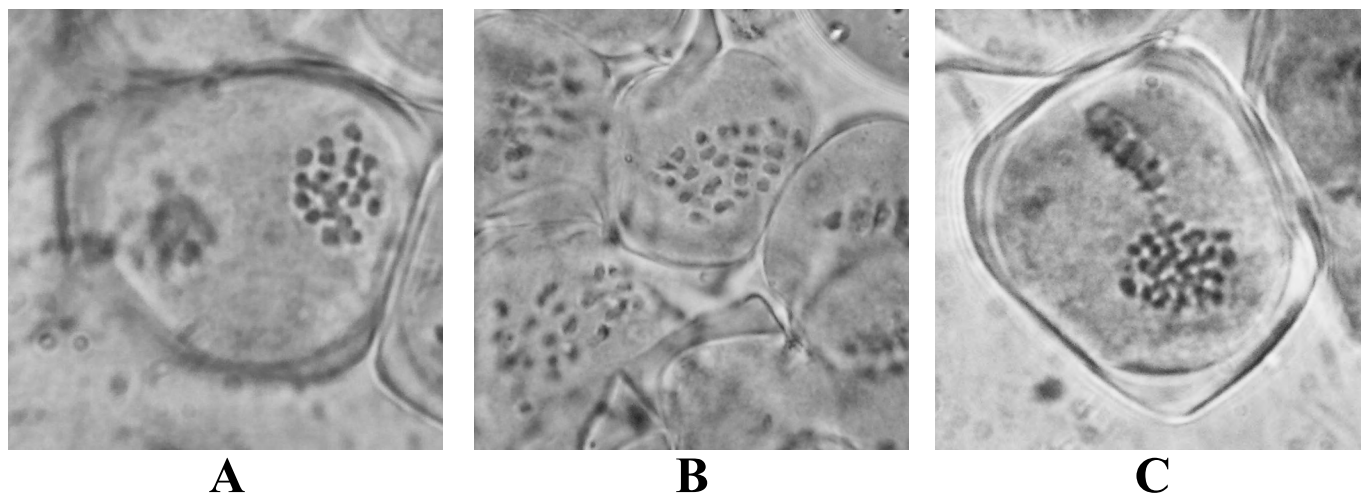
**ПЦР, рестрикция, электрофорез.** Анализ полиморфизма хромосома-специфичных локусов у родительских форм и у гибридов проводили методом ПЦР со специфичными праймерами, в ряде случаев сопряженным с рестрикционным анализом. ПЦР осуществляли в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 нг тотальной ДНК сортов картофеля, 1× реакционный буфер («Диалат», Москва), 3.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6 mM каждого из dNTPs, 0.2 мкМ прямого и обратного праймера и 1 ед. Таq-полимеразы («Диалат»). При анализе микросателлитных маркеров реакционная смесь имела объем 10 мкл и дополнительно включала прямой праймер M13, содержащий флуоресцентную метку IRD700 или IRD800. Соответственно, эта же последовательность была включена в состав каждого прямого праймера на 5'-конце.

В рестрикционном анализе использовали ферменты

фирмы NEB (<https://international.neb.com/products/restriction-endonucleases>). Рестрикцию проводили согласно протоколу фирмы-изготовителя. Фрагменты ДНК в случае CAPS- и SCAR-маркеров разделяли электрофорезом в агарозных гелях с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете. Разделение ампликонов при анализе микросателлитных районов осуществляли путем электрофореза в проточных 6,5% полиакриламидных гелях в системе с лазерной детекцией фрагментов Li-Cor 4300S DNA Analyzer System, фрагменты детектировали по флуоресцентному сигналу IRD700/IRD800. В этом случае для определения размеров амплифицированных фрагментов использовали пакет программ SAGA Generation 2 (<http://www.licor.com/>).

## Результаты

**Определение числа хромосом гибридов.** Подсчет числа хромосом в мейозе триплоидных ( $2n=3x$ ) межвидовых гибридов подтвердил наличие у них 36 хромосом; у гексаплоидного ( $2n=6x$ ) клона IGC 15/118.3.C6.2016, полученного в результате митотического удвоения триплоидного гибрида IGC 15/118.3, – 72 хромосомы и у растений первого беккрасса, полученного от опыления этого гексаплоидного клона культурным картофелем, – 60 хромосом ( $2n=5x$ ). Также 60 хромосом ( $2n=5x$ ) было выявлено у гибрида IGC 15/103.53 (*S. stoloniferum* PI 205522 × 2х *S. tuberosum* IGC 10/1.21), а у гибрида IGC 16/36.1 (6х IGC 15/118.3.C6.2016 × 2х IGC 10.21) было определено 48 хромосом ( $2n=4x$ ) (см. рис. 2).



**Рис. 2.** Уровень ploидности межвидовых гибридов:  
А – Метафаза 2 у тетраплоидного гибрида IGC 16/36.1;  
В – Метафаза 1 у пентаплоидного гибрида IGC 15/103.53;  
С – Метафаза 2 у гексаплоидного гибрида IGC 15/118.3.C6.2016.

**Fig. 2.** Ploidy of interspecific hybrids:  
А – Metaphase 2 in tetraploid hybrid IGC 16/36.1;  
В – Metaphase 1 in pentaploid hybrid IGC 15/103.53;  
С – Metaphase 2 in hexaploid hybrid IGC 15/118.3.C6.2016

Создание набора полиморфных хромосомо-специфичных маркеров ДНК *S. stoloniferum* и *S. tuberosum*, их выявление у межвидовых гибридов.

Задача исследований состояла в создании набора SSR-, STS-, SCAR- и CAPS- маркеров, специфичных к монокусным последовательностям с известной хромосомной локализацией, для изучения интрогрессивных процессов у межвидовых гибридов *S. stoloniferum* (геном AABB) и *S. tuberosum* (геном AAAA). На первом этапе были отобраны праймеры, генерировавшие маркерные фрагменты, подвижность которых у образцов диких видов с геномом BB резко отличалась от таковой у образцов А-геномных видов. У образцов тетраплоидного вида

*S. stoloniferum* (геном AABB) в большинстве случаев наблюдали несколько вариантов ПЦР-продуктов, причем подвижность одних соответствовала подвижности маркерных фрагментов у изученных образцов А-геномных видов (*S. ajanhuirii*, *S. phureja* и *S. tuberosum*), а других – подвижности фрагментов у образцов диплоидных В-геномных видов (*S. bulbocastanum*, *S. cardiophyllum*, *S. pinnatisectum*, *S. tarnii*) (см. рис. 3, 4).

На следующем этапе проводили отбор хромосомо-специфичных маркеров, позволявших различать родительские генотипы – диплоидный клон IGC 10/1.21 культурного картофеля *S. tuberosum* и образец PI 205522 *S. stoloniferum* (см. рис. 3, 4).

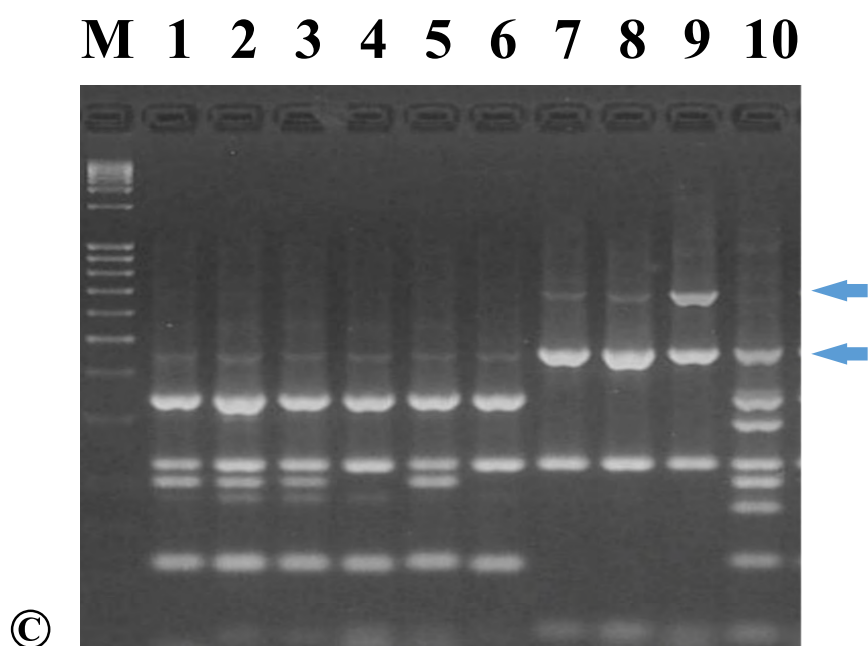


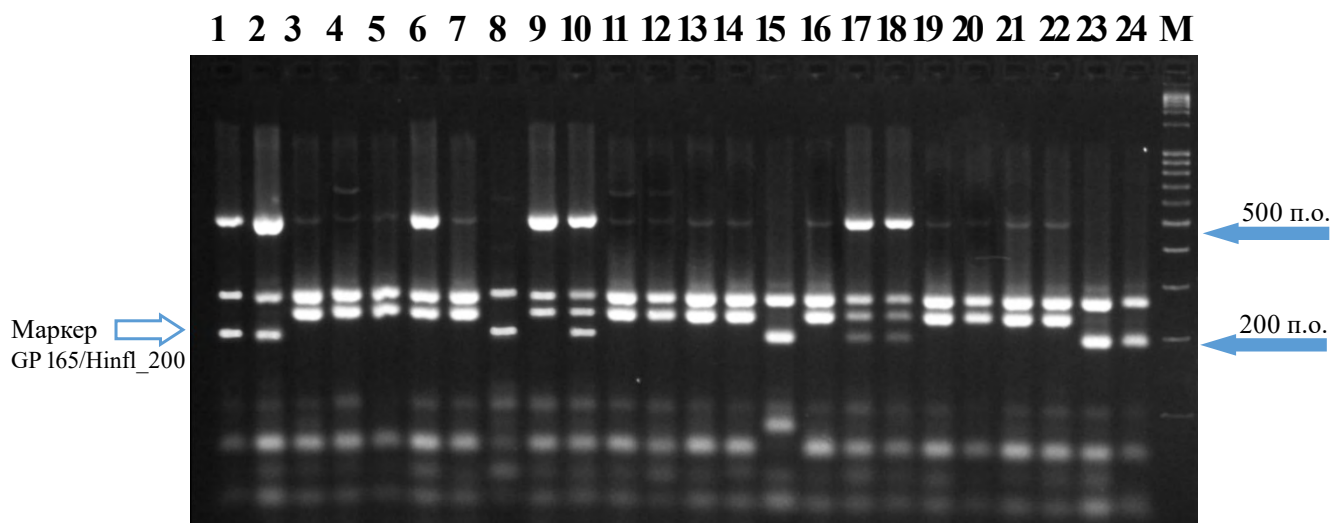
Рис. 3. Пример отбора CAPS-маркера GP83\_HinfI для детекции хромосом субгенома В мексиканского аллотетраплоидного вида *S. stoloniferum* (AABB) и его гибридов.

Дорожки 1-6: образцы диплоидных культурных видов с ядерным А геномом - *S. ajanhuirii* (GLKS 2308), *S. phureja* (k-16530) и селекционных сортов *S. tuberosum* (сорта Atlantic, Rasant, Romanze, Sonate); дорожки 7-9: образцы диплоидных мексиканских видов – носителей генома В: *S. bulbocastanum*, *S. cardiophyllum*, *S. pinnatisectum* соответственно; дорожка 10: *S. stoloniferum*.

Fig. 3. An example of the GP83\_HinfI CAPS marker selection for the detection of chromosomes in the B subgenome of the Mexican allotetraploid species *S. stoloniferum* (AABB) and its hybrids.

Lanes 1-6 – accessions of cultivated species with nuclear genome A - *S. ajanhuirii*, *S. phureja*, and varieties of *S. tuberosum* (cv. Atlantic, Rasant, Romanze, Sonate); lanes 7-9 – accessions of diploid Mexican species with nuclear genome B: *S. bulbocastanum*, *S. cardiophyllum*, *S. pinnatisectum*, respectively; lane 10 – *S. stoloniferum*.





**Рис. 4.** Апробация потенциального маркера GP165\_Hinfl\_200 на выборке селекционных сортов и образцов видов картофеля – носителей ядерных геномов А и В.  
 1) *S. stoloniferum*, PI 205522; 2) *S. stoloniferum*, k-17152; 3) *S. phureja*, k-9836; 4) *S. phureja*, k-11291; 5-7) *S. tuberosum*, селекционный клон 90N; сорта Baltica и Sonate, соответственно; 8) *S. cardiophyllum*, GLKS-108; 9) *S. tuberosum*, 10/1.21; 10) гибрид 2027.53; 11) *S. phureja*, k-12789; 12) *S. phureja*, k-9889; 13-14) *S. tuberosum*, сорта Delikat и Quarta; 15) *S. bulbocastanum*, GLKS-1741; 16) *S. etuberosum*, k-9141; 17) гибрид 2037.1; 18) гибрид 2053.52; 19) *S. phureja*, IVP35; 20-22) *S. tuberosum*, селекционный клон T67, сорта Rasant и Romanze; 23) *S. pinnatisectum*, GLKS-1607; 24) *S. tarnii*, GLKS-2870.

**Fig. 4.** Testing a potential marker using a set of released varieties and potato species with A and B nuclear genomes (GP165\_Hinfl\_200 marker).

- 1) *S. stoloniferum*, PI 205522; 2) *S. stoloniferum*, k-17152; 3) *S. phureja*, k-9836; 4) *S. phureja*, k-11291; 5-7) *S. tuberosum*, breeding clone 90N, cvs. Baltica and Sonate; 8) *S. cardiophyllum*, GLKS-108, 9) *S. tuberosum*, 10/1.21; 10) hybrid 2027.53; 11) *S. phureja*, k-12789; 12) *S. phureja*, k-9889; 13-14) *S. tuberosum*, cvs. Delikat and Quarta; 15) *S. bulbocastanum*, GLKS-1741; 16) *S. etuberosum*, k-9141; 17) hybrid 2037.1; 18) hybrid 2053.52; 19) *S. phureja*, IVP35; 20-22) *S. tuberosum*, breeding clone T67, cvs. Rasant and Romanze; 23) *S. pinnatisectum*, GLKS-1607; 24) *S. tarnii*, GLKS-2870.

В результате проведенных исследований удалось отобрать 23 хромосомо-специфических маркера, выявляющих полиморфизм родительских генотипов *S. tuberosum*, клон IGC 10/1.21, и образец PI 205522 дикого мексиканского вида *S. stoloniferum*; список отобранных маркеров приведен в таблице. Для хромосом V и VI нам пока не удалось подобрать полиморфные маркеры, отличающие исходные родительские генотипы. Отметим, что результаты амплификации отобранных маркеров у двух образцов дикого вида *S. stoloniferum* – PI 205522 и k-17152 – не отличались.

Созданный набор маркеров был использован для изучения хромосомного состава три- и пентаплоидных гибридов (*S. stoloniferum* × 2x *S. tuberosum*), полученных при реализации схем 1 и 4, и идентификации у них генетического материала субгенома В родительского образца PI 205522 дикого вида *S. stoloniferum*. У межвидовых гибридов IGC 15/103.52 (2n=36) и IGC 15/103.53 (2n=60) (*S. stoloniferum* PI 205522.3 × *S. tuberosum* IGC 10/1.21) были выявлены все изученные хромосомо-специфические фрагменты десяти хромосом дикого вида (см. таблицу). Обращают внимание различия

в результатах идентификации отдельных маркеров хромосом II и IX культурного вида *S. tuberosum* у этих гибридов, имеющих полные хромосомные наборы генома А культурного картофеля. Так, например, маркер STM 2022, специфичный к одноименному SSR-локусу хромосомы II генома А культурного картофеля (*tbr* IGC 10/1.21), детектирован у триплоидного межвидового гибрида IGC 15/103.52, но не выявлен у пентаплоидного - IGC 15/103.53; тот же результат получен с CAPS маркером GP 39/Hinfl-250+150, специфичным к фрагменту хромосомы IX генома А (см. таблицу). Можно предположить, что эти маркеры представлены у родительского клона *S. tuberosum* IGC 10/1.21 в гетерозиготном состоянии.

Наряду с хромосомо-специфическими SSR- и CAPS-маркерами в набор входил и аллель-специфичный маркер b1b1F/R гена *Rpi-blb1* (хромосома VIII) диких мексиканских видов, детерминирующего устойчивость к широкому спектру рас возбудителя фитофтороза; этот маркер был выявлен у обоих межвидовых гибридов.

**Таблица. Маркеры хромосом культурного картофеля *S. tuberosum* (клон IGC 10/1.21) и дикого мексиканского вида *S. stoloniferum* (образец PI 205522), выявленные у три- и пентаплоидного межвидовых гибридов IGC 15/103.52 и IGC 15/103.53.**

**Table. Chromosome markers of cultivated potato *S. tuberosum* (clone IGC 10/1.21) and the wild Mexican species *S. stoloniferum* (accession PI 205522) revealed in tri- ( $2n=3x=36$ ) and pentaploid ( $2n=5x=60$ ) interspecific hybrids IGC 15/103.52 and IGC 15/103.53.**

Chromosome	Marker Name	<i>sto</i> * к-17152	<i>sto</i> PI 205522	<i>tbr</i> IGC 10/1.21	3x hybrid <i>sto</i> × <i>tbr</i> IGC 15/103.52	5x hybrid <i>sto</i> × <i>tbr</i> IGC 15/103.53
I	GPI75/MnII_200	1	1	0	1	1
I	GP264/MnII_460	1	1	0	1	1
I	GP264/MnII_400	0	0	1	1	1
II	STM 2022_198	0	0	1	1	0
II	STM 2022_204	1	1	0	1	1
III	Chr3-1/HaeIII_1400	0	0	1	1	1
III	Chr3-1/HaeIII_2500	1	1	0	1	1
III	GP 256/DdeI_250+350	1	1	0	1	1
III	GP 256/DdeI_550	0	0	1	1	1
IV	GP 165/HinfI_250	0	0	1	1	1
IV	GP 165/HinfI_200	1	1	0	1	1
VII	STM3009_106	1	1	0	1	1
VIII	Sti 048_191	1	1	0	1	1
VIII	blb 1 F/R	1	1	0	1	1
IX	GP 101/MnII	1	1	0	1	1
IX	GP 39/HinfI-400+350	1	1	0	1	1
IX	GP 39/HinfI-250+150	0	0	1	1	0
X	GP266-o/HpaII_800	1	1	0	1	1
X	GP218/RsaI_800	1	1	0	1	1
XI	Sti 028_201	1	1	0	1	1
XI	Chr11-2/RsaI_300+180	1	1	0	1	1
XII	CP60/DdeI_180	1	1	0	1	1
XII	Sti063_110	1	1	0	1	1

\* В таблице указаны трехбуквенные коды названий видов: *sto* - *S. stoloniferum*, *tbr* - *S. tuberosum*.

**Реализация схемы интрогрессии 1.** В 2016 г. было получено около ста семян в результате опыления гексаплоидного клона IGC 15/118.3.C6.2016 пыльцой картофеля сорта Katahdin (эффективность гибридизации 33 семян/опыление). Всхожесть семян составила 84%. В 2017 г. 18 гибридов BC<sub>1</sub> вовлекли в гибридизацию в качестве материнских форм с сортом Quarta. В общей сложности получено 3714 семян, эффективность скрещиваний составила 23 семян/опыление. В 2018 г. беккроссирование растений BC<sub>2</sub> в качестве материнских растений оказалось успешным при использовании сортов Свитанок Киевский (75 семян/опыление), Уладар (44 семян/опыление) и Satina (1,6 семян/опыление). Большинство гибридов BC<sub>2</sub> были стерильны (ФФП менее 1 %) и низко фертильны (ФФП 1–10 %), однако у 5 из 14 гибридных генотипов ФФП была более 10 %; среди них был отобран один фертильный сеянец с маркерами генов устойчивости к PVY и фитофторозу, проявляющий агрономически ценные признаки культурного картофеля, который в дальнейших BC скрещиваниях использовался в качестве опы-

лителя. Удачными оказались скрещивания с сортом Янка: получено 148 семян (5,5 семян на опыление).

В 2019г. были получены семена в возвратных скрещиваниях гексаплоидных гибридов из интрогрессивной схемы 1 – SvSv-линия *S. tuberosum* × *S. stoloniferum* PI 205522 и *S. stoloniferum* PI 205522 × 2x *S. tuberosum* IGC 10/1.21 с тестерным сортом Lemchi Russet и с диплоидной линией IGC 17n8, формирующей нередуцированную пыльцу. Следует отметить, что у использованных в скрещиваниях тестерных генотипов маркеры генов *Ry<sub>adg</sub>*, *Ry<sub>sto</sub>*, *Ry<sub>f<sub>sto</sub></sub>*, *Rpi-sto1*, *R3b* устойчивости к PVY и фитофторозу не были выявлены (Yermishin et al., 2016).

**Реализация схемы интрогрессии 2.** Тетраплоидный (EBN=3) гибрид IGC 16/36.1 (BC<sub>1</sub>, предполагаемый геномный состав AAAB) был получен в 2016г. в результате опыления 30 цветков гексаплоидного клона IGC 15/118.3.C6.2016 диплоидной линией IGC 10/1.21 *S. tuberosum*. В общей сложности было получено 14 семян, из которых взошли только два, но жизнеспособным оказался лишь один сеянец. Гибрид IGC 16/36.1



имел пониженную мужскую фертильность (ФФП менее 5%) и не завязывал семян при свободном опылении. Попытки вовлечь его в скрещивания с сортами-опылителями в 2017 и 2018 гг. оказались неудачными. Гибрид IGC 16/36.1 в благоприятных для гибридизации условиях 2019 г. завязал 24 семян от опыления сортом Quarta (6 семян/опыление) и 33 семян от опыления линией IGC 17н8 (4,7 семян/опыление). Ягод от свободного опыления получено не было.

**Реализация схемы интрогрессии 3.** В 2018 г. растения гибрида IGC 16/36.1, выращенные в боксовой теплице в апреле-мае с досветкой лампами ДРИ-2000-6 завязали две ягоды от самоопыления (других цветущих растений картофеля в это время года не было). В одной из ягод оказалось четыре семени, из которых было получено два растения. Один сеянец, IGC 18/71.1 в скрещиваниях 2019 г. завязал семена от опыления сортами Lemchi Russet (56,5 семян/опыление), Labadia (22,6 семян/опыление), Alcmaria (10,8 семян/опыление) и линией IGC 17н8 (73,7 семян/опыление). Скрещивания второго сеянца, IGC 18/71.2, были успешными при опылении сортом Alcmaria (33 семян/опыление) и линией IGC 17н8 (29 семян/опыление). Оба сеянца завязали семена от свободного опыления (соответственно, 138 и 12 семян).

**Реализация схемы интрогрессии 4.** Пентаплоидный гибрид IGC 15/103.53 в 2017 г. удалось скрестить в качестве материнской формы с сортом Quarta: завязалось 20 семян (0,56 семян/опыление), из которых получено три жизнеспособных сеянца – IGC 17/192.2, 17/192.4, 17/192.5. В 2018г. беккроссирование этих гибридов сортами Свитанок Киевский и Carlita оказались неудачным. Однако в 2019г. все три гибрида BC<sub>1</sub> были успешно беккроссированы сортом Quarta (эффективность гибридизации, соответственно: 5,3; 34,3 и 5,5 семян/опыление). Также получены семена от скрещивания гибрида IGC 17/192.4 с сортом Labadia (16,3 семян/опыление) и линией IGC 17н8 (15 семян/опыление), а гибрида IGC 17/192.5 – с сортом Labadia (4,9 семян/опыление). Два последних гибрида завязали семена от свободного опыления (соответственно, 208 и 240 семян).

Гибрид F<sub>1</sub> IGC 15/103.53 в 2017г. завязал 145 семян от свободного опыления. Всхожесть семян была очень низкой – в 2018 г. получено 4 сеянца (2,7%). Эти сеянцы не удалось вовлечь в дальнейшую гибридизацию с сортами картофеля. Один из гибридов П, IGC 17/172.3 формировал функционально фертильную пыльцу и завязал большое количество семян в результате самоопыления, из которых получено 12 растений.

## Обсуждение

Разработанный набор ДНК-маркеров позволил выявить хромосомо-специфические фрагменты десяти хромосом дикого вида у три- и пентаплоидных межвидо-

вых гибридов *S. stoloniferum* PI 205522.3 × *S. tuberosum* IGC 10/1/21. В дополнение к разработанному набору хромосомо-специфичных маркеров также были использованы известные из литературы маркеры генов *Ry<sub>adg</sub>* (XI), *Ry<sub>sto</sub>* и *Ry-f<sub>sto</sub>* (XII) иммунитета к вирусу PVY, гена *R3b* (XI) расоспецифичной устойчивости к фитофторозу и гена *Rpi-stoI* (VIII), детерминирующего устойчивость к широкому спектру рас возбудителя фитофтороза; маркеры этих генов были выявлены у образца PI 205522 и в его потомстве (Yermishin et al., 2017a). Важно отметить, что все отобранные хромосомо-специфичные маркеры были также выявлены у другого образца дикого вида *S. stoloniferum* – к-17152. Не исключено, что данный набор маркеров может быть использован для изучения интрогрессии генетического материала большего числа образцов *S. stoloniferum*.

Реализованная в настоящей работе схема 1 вовлечения в селекцию дикого аллотетраплоидного вида картофеля *S. stoloniferum* отличается от известных схем интрогрессии тем, что в ней применялись оригинальные SvSv-линии, что позволяет преодолеть одностороннюю несовместимость, характерную для скрещиваний этого дикого вида (в качестве опылителя) с культурным картофелем, и позволяет получать потомство, характеризующееся мужской фертильностью (Yermishin et al., 2017b). Как видно из результатов настоящего исследования, реализация схемы интрогрессии 1 не связана со значительными проблемами отдаленной гибридизации картофеля. Эффективность гибридизации на всех этапах беккроссирования с культурным картофелем была относительно высокой, что дало положительный результат при небольшом объеме скрещиваний. Получены фертильные межвидовые гибриды поколений BC<sub>1</sub> и BC<sub>2</sub>, один из них успешно использован в качестве опылителя в дальнейших скрещиваниях с сортами картофеля. Среди растений BC<sub>1</sub> и BC<sub>2</sub> с высокой частотой были представлены генотипы с высокой полевой устойчивостью к фитофторозу. Важно отметить, что большинство гибридов BC<sub>3</sub> имели признаки культурного картофеля (короткие столоны и клубни правильной формы с мелкими глазками (см. на обложке).

В отличие от обычно используемых прямых скрещиваний между диким аллотетраплоидным видом *S. stoloniferum* (2n=4x, EBN=2) и культурным картофелем (2n=4x, EBN=4) в сочетании с культурой *in vitro* незрелых зародышей или семян (Iwanaga et al., 1991; Singsit, Hanneman, 1991; Watanabe et al., 1992; Janssen et al., 1997; Panahandeh et al., 2008), гибрид IGC 16/36.1 (2n=4x, предполагаемый геномный состав AAAB) был получен путем опыления митотически удвоенного триплоидного межвидового гибрида (2n=6x, EBN=4) пыльцой высоко фертильной диплоидной линии IGC 10.21 *S. tuberosum* (2n=2x, EBN=2). Объем скрещиваний (30 опыленных цветков) был значительно меньшим в сравнении с рассмотренным выше методом получения подобных гибридов (несколько сотен опыленных цветков), культура *in vitro* незрелых зародышей или семян не применялась.

Таким образом, использование фертильных диплоидных линий *S. tuberosum* для беккроссирования культурным картофелем гексаплоидных межвидовых гибридов может быть перспективным как для повышения эффективности интрогрессии генов дикого вида (за счет гомеологичной рекомбинации генов), так и ускорения процесса беккроссирования межвидовых гибридов (за счет снижения уровня ploидности с 6х до 4х).

Как и ожидалось, межвидовой гибрид IGC 16/36.1 ( $2n=4x$ , EBN=3) было сложно вовлечь в скрещивания с сортами культурного картофеля ( $2n=4x$ , EBN=4) из-за различий их эффективной ploидности. Данный гибрид удалось скрестить с сортами картофеля лишь на третий год выращивания при оптимальных условиях окружающей среды для гибридизации картофеля, которые сложились летом 2019г.

Предполагалось, что получение самоопыленно-го потомства такого типа межвидовых гибридов позволит повысить эффективность их беккроссирования одним из родительских видов благодаря рекомбинации генов, связанных с контролем EBN (Ehlenfeldt, Hanneman 1988). Однако, выделенный нами тетраплоидный гибрид IGC 16/36.1 формировал пыльцу с низкой функциональной фертильностью и не завязывал семян в результате самоопыления. Потомство от самоопыления этого гибрида удалось получить в настоящем эксперименте благодаря использованию приема выращивания растений в условиях, повышающих пыльцевую продуктивность (досветка лампами ДРИ-2000-6) (Yermishin, 1998). Сеянцы от самоопыления IGC 16/36.1 заметно превосходили исходный межвидовой гибрид по мощности габитуса и интенсивности цветения. При небольшом объеме скрещиваний удалось получить достаточно большое количество семян от опыления их сортами картофеля (в общей сложности 585 семян), что позволяет рассчитывать на успех дальнейшего беккросса и возможность изучения особенностей интрогрессии генов дикого вида при использовании схемы 3. В литературе описаны примеры успешного беккроссирования сортами картофеля тетраплоидных межвидовых гибридов с *S. fendleri* (= *S. stoloniferum*) (эффективность 1,33 семян/опыление; Janssen et al., 1997) и *S. stoloniferum* (25-26 семян/опыление, Panahandeh et al., 2008).

В известной нам литературе нет сведений о получении пентаплоидных гибридов в результате опыления аллотетраплоидных видов картофеля диплоидными линиями *S. tuberosum*. Наиболее вероятный механизм их образования – за счет оплодотворения нередуцированной яйцеклетки ( $2n$ ) дикого вида *S. stoloniferum* нормальной ( $n$ ) пыльцой диплоидной линии культурного картофеля. Предполагаемый геномный состав AAABV пентаплоидного гибрида IGC 15/103.53 отличается от геномного состава пентаплоидных гибридов (AAAAB), которые получают в традиционной схеме интрогрессии (см. рис. 1, схему 1). Можно ожидать, что гибрид IGC 15/103.53 обладает двумя копиями генома В, а из трех его суб-

геномов А два получены от дикого вида. Нормальное спаривание в мейозе хромосом субгенома В у гибрида IGC 15/103.53 обеспечивает их регулярное расхождение, поэтому у гибридов поколения BC<sub>1</sub> - IGC 17/192.2, 17/192.4, 17/192.5 хромосомы субгенома В представлены в полном составе. Это же относится к генетическому материалу генома А *S. stoloniferum*.

Гибрид F<sub>1</sub> IGC 15/103.53 с трудом скрещивался с культурным картофелем: эффективность гибридизации с сортом Quarta – 0,56 семян/опыление, всхожесть семян 20%. Скрещиваемость с сортами картофеля гибридов BC<sub>1</sub> зависела от условий выращивания растений и их физиологического состояния. Сеянцы гибридов BC<sub>1</sub> не удалось вовлечь в гибридизацию в 2018г. Однако эффективность гибридизации растений, выращенных из клубней, в 2019г оказалось относительно высокой при использовании в качестве опылителей нескольких сортов картофеля (5-35 семян/опыление). Использование в скрещиваниях с сортами картофеля самоопыленного потомства пентаплоидного гибрида было не таким успешным, как в случае вышеупомянутого тетраплоидного гибрида. По-видимому, это связано с преобладанием у него генетического материала дикого вида, что проявлялось, в частности, в пониженном клубнеобразовании растений I1 и I2.

## Заключение

Созданный набор хромосомоспецифичных ДНК-маркеров дикого аллотетраплоидного вида картофеля *S. stoloniferum* позволяет изучать особенности их переноса в геном культурного картофеля в процессе беккроссирования межвидовых гибридов в различных схемах интрогрессии. Предложены и реализованы три схемы интрогрессии генетического материала *S. stoloniferum*, повышающие вероятность успешного переноса в геном культурного картофеля генетического материала хромосом субгенома В этого дикого вида. В поколениях беккросса выделены гибридные генотипы с мужской фертильностью, у которых выявлены ДНК-маркеры генов устойчивости к PVY и фитофторозу дикого вида; с высокой полевой устойчивостью к фитофторозу; продуктивные, с признаками культурного картофеля (см. фото на обложке). Анализ потомства межвидовых гибридов поколений BC<sub>2</sub>-BC<sub>3</sub> с использованием созданного набора хромосомо-специфичных ДНК-маркеров предоставляет возможность изучения эффективности переноса в селекционный материал генетического материала *S. stoloniferum* в различных схемах (1-4) интрогрессии.

*Исследование выполнено при поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-54-0020-Бел-а) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проекты Б16Р-103 и Б18М-091).*

## References/Литература

- Abramova L.I. Cytological and cytoembryological technique (for the study of cultivated plants): guidelines (Tsitologicheskaya i tsitoembriologicheskaya tekhnika (dlya issledovaniya kulturnykh rasteniy): metodicheskiye ukazaniya). Leningrad: VIR; 1981 [in Russian]. (Абрамова Л.И. Цитологическая и цитозембриологическая техника (для исследования культурных растений): методические указания. Ленинград: ВИР; 1981).
- Adiwilaga K.D., Brown C.R. Use of 2n pollen-producing triploid hybrids to introduce tetraploid Mexican wild species germplasm to cultivated tetraploid potato gene pool. *Theoretical and Applied Genetics*. 1991;81(5):645-652. DOI: 10.1007/BF00226732
- Bamberg J.B. Allelism of endosperm balance number (EBN) in *Solanum acaule* Bitt. and other wild potato species. *Theoretical and Applied Genetics*. 1994;89(6): 682-686. DOI: 10.1007/BF00223705
- Bamberg J.B., Hanneman R.E. Jr, Palta J.P., Harbage J.F. Using disomic 4x (2EBN) potato species germplasm via bridge species *Solanum commersonii*. *Genome*. 1994;37(5):866-870. DOI: 10.1139/g94-122
- Brown C.R. Characteristics of 2n pollen producing triploid hybrids between *Solanum stoloniferum* and cultivated diploid potatoes. *American potato journal*. 1988;65(2):75-84. DOI: 10.1007/BF02867455
- Camadro E.L., Espinillo J.C. Germplasm transfer from the wild tetraploid species *Solanum acaule* Bitt. to the cultivated potato, *S. tuberosum* L. using 2n eggs // *American potato journal*. 1991;67(11):737-749. DOI: 10.1007/BF03044524
- Chen X., Salamini F., Gebhardt C. A potato molecular-function map for carbohydrate metabolism and transport. *Theoretical and Applied Genetics*. 2001;102(2-3):284-295. DOI: 10.1007/s001220051645
- Feingold S., Lloyd J., Norero N., Bonierbale M., Lorenzen J. Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2005;111(3):456-466. DOI: 10.1007/s00122-005-2028-2
- Flis B., Hennig J., Strzelczyk-Żyta D., Gebhardt C., Marczewski W. The *Ry<sup>f-sto</sup>* gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistant to *Potato virus Y* maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122718 in PVY resistant potato cultivars. *Molecular Breeding*. 2005;15(1):95-101. DOI: 10.1007/s11032-004-2736-3
- Ehlenfeldt M.K., Hanneman R.E.Jr. Genetic control of Endosperm Balance Number (EBN): three additive loci in a threshold-like system. *Theoretical and Applied Genetics*. 1988;75(6):825-832. DOI: 10.1007/BF00258041
- Gavrilenko T., Antonova O., Shuvalova A., Krylova E., Alpatyeva N., Spooner D., Novikova L. Genetic diversity and origin of cultivated potatoes based on plastid microsatellite polymorphism. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2013;60(7):1997-2015. DOI: 10.1007/s10722-013-9968-1
- Gavrilenko T.A., Klimenko N.S., Alpatyeva N.V., Kostina L.I., Lebedeva V.A., Yevdokimova Z.Z. et al. Cytoplasmic genetic diversity of potato varieties bred in Russia and FSU countries. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(6):753-764. [in Russian] (Гавриленко Т.А., Клименко Н.С., Алпатьева Н.В., Костина Л.И., Лебедева В.А., Евдокимова З.З. и др. Генетическое разнообразие сортов картофеля российской селекции и стран ближнего зарубежья по типам цитоплазм. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(6):753-764). DOI: 10.18699/VJ19.534
- Gavrilenko T., Pendinen G., Rokka V.-M., Antonova O., Thieme R. Homeologous chromosome pairing in distant allohaploid hybrids of the genus *Solanum*. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2015;5(3):182-190. DOI: 1134/S2079059715030065
- Gebhardt C., Bellin D., Henselewski H., Lehmann W., Schwarzfischer J., Valkonen J.P.T. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theoretical and Applied Genetics*. 2006;112(8):1458-1464. DOI: 10.1007/s00122-006-0248-8
- Ghislain M., Nunez J., Herera M.delR., Rignataro J., Guzman F., Bonierbale M., Spooner D.M. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Molecular Breeding*. 2009;23(3):377-388. DOI: 10.1007/s11032-008-9240-0
- Hawkes J.G. The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. Washington: Belhaven Press; 1990.
- Hayes R.J., Dinu I.I., Thill C.A. Unilateral and bilateral hybridization barriers in inter-series crosses of 4x 2EBN *Solanum stoloniferum*, *S. pinnatisectum*, *S. cardiophyllum* and 2x 2EBN *S. tuberosum* haploids and haploid-species hybrids. *Sexual Plant Reproduction*. 2005;17(6):303-311. DOI: 10.1007/s00497-005-0244-1
- Iwanaga M., Freyre R., Watanabe K. Breaking the crossability barriers between disomic tetraploid *Solanum acaule* and tetrasomic tetraploid *S. tuberosum*. *Euphytica*. 1991;52(3):183-191. DOI: 10.1007/00029395
- Jackson S.A., Hanneman R.E.Jr. Crossability between cultivated and wild tuber- and non-tuber-bearing *Solanums*. *Euphytica*. 1999;109(1):51-67. DOI: 10.1023/A:1003710817938
- Janssen G.J.W., van Norel A., Verkerk-Bakker B., Janssen R., Hoogendoorn J. Introgression of resistance to root-knot nematodes from wild Central American *Solanum* species into *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 1997;95(3):490-496. DOI: 10.1007/s001220050588
- Johnston S.A., den Nijs T.M., Peloquin S.J., Hanneman R.E.Jr. The significance of genetic balance to endosperm development in inter-specific crosses. *Theoretical and Applied Genetics*. 1980;57(1):5-9. DOI: 10.1007/BF00276002
- Lamm R. Investigation on some tuber-bearing *Solanum* hybrids. *Hereditas*. 1953;39(1-2):97-112. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1953.tb03404.x
- Levy A.V., Voronkova E.V., Polyukhovich Yu.V., Yermishin A.P. Representativeness of DNA-markers of late blight and PVY resistance genes in accessions of wild allotetraploid potato species *Solanum stoloniferum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences Belarus. Biological sciences*. 2017;2:46-54 [in Russian] (Левый А.В., Воронкова Е.В., Полюхович Ю.В., Ермишин А.П. ДНК-маркеры генов устойчивости к фитофторозу и к PVY у образцов дикого аллотетраплоидного вида картофеля *Solanum stoloniferum*. *Вестні нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. 2017;2:46-54).
- Lössl A., Götz M., Braun A., Wenzel G. Molecular markers for cytoplasm in potato: male sterility and contribution of different plastid-mitochondrial configurations to starch production. *Euphytica*. 2000;116(3):221-230. DOI: 10.1023/A:1004039320227
- Milbourne D., Meyer R., Collins A.J., Ramsay L.D., Gebhardt C., Waugh R. Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Molecular and General Genetics*. 1998;259(3):233-245. DOI: 10.1007/s004380050809
- Oberhagemann P., Chatot-Balandras C., Schafer-Pregl R., Wagener D., Palomino C., Salamini F., Bonnel E., Gebhardt C. A genetic analysis of quantitative resistance to starch in potato: towards marker-assisted selection. *Molecular Breeding*. 1999;5(5):399-415. DOI: 10.1023/A:1009623212180
- Pallais N., Fong N., Berrios D. Research on the physiology of potato sexual seed production. In: Innovative methods for propagating potatoes, Rep. 28th Planning Conf.; 1984 December 10-14; CIP, Lima, Peru. Lima: CIP; 1985. p. 149-168.
- Panahandeh J., Valizadeh M., Khosroshhly M., Yermishin A.P. Khoei F.R., Mahna N. Microsporogenesis and crossing behavior of a tetraploid, interspecific inter-EBN hybrid potato. *Scientia Horticulturae*. 2008;116(4):348-353. DOI: 10.1016/j.scienta.2008.02.006
- Pausheva Z.P. Workshop on plant cytology (Praktikum po citologii rasteniy). Moscow: Kolos; 1970 [in Russian] (Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. Москва: Колос; 1970).
- Pendinen G., Gavrilenko T., Jiang J., Spooner D.M. Allopolyploid speciation of the tetraploid Mexican potato species revealed by genomic *in situ* hybridization. *Genome*. 2008;51:714-720. DOI: 10.1139/G08-052
- Ramanna M.S., Abdalla M.M.F. Fertility, late blight resistance and genome relationship in an interspecific hybrid, *Solanum polytrichon* Rydb × *S. phureja* Juz. et Buk. *Euphytica*. 1970;19(3):317-326. DOI: 10.1007/BF01904209
- Ross H. Potato breeding – problems and perspectives. Supplement 13 *Advances in Plant Breeding*. Paul Parey (ed.) Berlin, Hamburg; 1986.
- Singsit C., Hanneman R.E.Jr. Rescuing abortive inter-EBN potato hybrids through double pollination and embryo culture. *Plant Cell Reports*. 1991;9(9):475-478. DOI: 10.1007/BF00232099
- Song Y.S., Schwarzfischer A. Development of STS markers for selection of extreme resistance (*Ry<sup>f-sto</sup>*) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars. *American Journal of Potato Research*. 2008;85(5):159-170. DOI: 10.1007/s12230-008-9044-0



- Spooner D.M., Rodriguez F., Polgar Z., Ballard H.E.Jr., Jansky S.H. Genomic origins of potato polyploids: GBSSI gene sequencing data. *Plant Genome (a Supplement to Crop Science)*. 2008;48(1):S27-S36. DOI: 10.2135/cropsci2007.09.0504tpg
- Swaminathan M.S. Notes on induced polyploids in the tuber-bearing *Solanum* species and their crossability with *S. tuberosum*. *American potato journal*. 1951;28(1):472-489. DOI: 10.1007/BF02854980
- Valkonen J.P.T., Wiegmann K., Hamalainen J.H., Marczewski W., Watanabe K.N. Evidence for utility of the same PCR-based markers for selection of extreme resistance to potato virus Y controlled by *Ry<sup>sta</sup>* of *Solanum stoloniferum* derived from different sources. *Annals of Applied Biology*. 2008;152(1):121-130. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2007.00194.x
- 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*. *Theoretical and Applied Genetics*. 2008;116(7):933-943. DOI: 10.1007/s00122-008-0725-3
- von Wangenheim K.H. Zur Ursache der Kreuzungsschwierigkeiten zwischen *Solanum tuberosum* L. und *S. acaule* Bitt. bzw. *S. stoloniferum* Schlecht et Bouche. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung = Journal of plant breeding*. 1954;34:7-48. [in German].
- Watanabe K., Arbizu C., Schmiediche P. Potato germplasm enhancement with disomic tetraploid *Solanum acaule*. I. Efficiency of introgression. *Genome*. 1992;35(1):53-57. DOI: 10.1139/g92-009
- Yermishin A.P. Genetic basis of breeding potato for heterosis (Geneticheskiye osnovy selektsii kartofelya na geterozis). Minsk: Technologiya; 1998. p.37-40 [in Russian] (Ермишин А.П. Генетические основы селекции картофеля на гетерозис. Минск: Технология. 1998; С.37-40).
- Yermishin A.P. Genetic peculiarities of wild allotetraploid potato (*Solanum*) species as the object of breeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences Belarus. Biological sciences*. 2014;1:23-31 [in Russian] (Ермишин А.П. Генетические особенности аллотетраплоидных диких видов картофеля (*Solanum*) как объекта селекции. *Весті нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. 2014;1:23-31).
- Yermishin A.P., Svitoch O.V., Voronkova E.V., Gukasian O.N., Luksha V.I. Determination of the composition and the allelic state of disease and pest resistance genes in potato parental lines using DNA markers. *Russian Journal of Genetics*. 2016;52(5):498-506. DOI: 10.1134/S1022795416050057
- Yermishin A.P., Levy A.V., Voronkova E.V., Polyukhovich Yu.V. Luksha V.I., Ageeva A.S. Diploid hybrids between wild allotetraploid potato species *Solanum stoloniferum* Schldtl. & Bouchet and diploid clones of cultivated potato having genome B of wild species. *Doklady of the national academy of sciences of Belarus*. 2017a;61(5):80-89 [in Russian] (Ермишин А.П., Левый А.В., Воронкова Е.В., Полюхович Ю.В., Лукша В.И., Агеева А.С. Диплоидные гибриды между диким аллотетраплоидным видом картофеля *Solanum stoloniferum* Schldtl. & Bouchet и диплоидными клонами культурного картофеля *S. tuberosum* L., имеющие геном В дикого вида. *Доклады Национальной академии наук Беларуси*. 2017a;61(5):80-89).
- Yermishin A.P., Levy A.V., Voronkova E.V., Polyukhovich Yu.V., Ageeva A.S. Overcoming unilateral incompatibility in crosses with wild allotetraploid potato species *Solanum stoloniferum* Schldtl. & Bouchet. *Euphytica*. 2017b;213(11):249. DOI: 10.1007/s10681-017-2041-y
- Zhu S., Li Y., Vossen J.H., Visser R.G., Jacobsen E. Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato. *Transgenic Research*. 2012;21(1):89-99. DOI: 10.1007/s11248-011-9510-1