

На правах рукописи

**ШВАЧКО**

**НАТАЛИЯ АЛЬБЕРТОВНА**

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ  
СЕЛЕКЦИОННЫХ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ  
КОЛЛЕКЦИИ ВИР,  
ВЫЯВЛЕННОЕ SSR АНАЛИЗОМ**

Специальность: 03.02.07. – Генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

Санкт – Петербург - 2012

Диссертационная работа выполнена в отделе биотехнологии ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им. Н.И. Вавилова Россельхозакадемии в 2003-2011 гг.

**Научный руководитель:** доктор биологических наук  
**Гавриленко Татьяна Андреевна**  
заведующий отделом биотехнологии  
ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им. Н.И. Вавилова  
Россельхозакадемии

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук  
**Радченко Евгений Евгеньевич**  
заведующий отделом генетики  
ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им. Н.И. Вавилова  
Россельхозакадемии,

кандидат биологических наук  
**Баранова Ольга Александровна**  
старший научный сотрудник лаборатории  
иммунитета растений к болезням  
ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии

Ведущее учреждение: Санкт-Петербургский Государственный  
Университет

**Защита диссертации состоится «18» апреля 2012 г. в «14» часов** на Диссертационном совете Д 006.041.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте растениеводства им. Н.И. Вавилова по адресу: 190000 С-Петербург, Б.Морская 42, ВИР.  
E-mail: [y.gavrilova@vir.nw.ru](mailto:y.gavrilova@vir.nw.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им. Н.И. Вавилова, с авторефератом на сайтах института: <http://vir.nw.ru> и Министерства образования и науки РФ.

Автореферат размещен в интернете и разослан «16» марта 2012 г.

**Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук**

**Вера Алексеевна Гаврилова**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** В настоящее время в мире насчитывается более 7300 селекционных сортов картофеля (Verloo et al, 2007). Разработка методов изучения генетического разнообразия и генотипирования сортов существенно расширяет возможности регистрации, систематизации и сохранения сортового генофонда в генбанках, и его рационального использования в селекции и семеноводстве.

Методы идентификации сортов картофеля традиционно базировались на оценке морфологических и агрономических признаков (Klapp, 1933; Stuart, 1937; Salaman, 1926, Зайцева Н.Д., 1935, 1965; Костина Л.И., 1971). Использование этих методов актуально и сегодня для полевых коллекций, однако имеет определенное ограничение для идентификации сортового генофонда, сохраняемого в контролируемых условиях *in vitro* и криоконсервации. Использование белков клубней и изоферментов для идентификации сортов картофеля ограничено, поскольку белки клубней характеризуются невысоким полиморфизмом (Оглуздин, 1980), а на состав изоферментных спектров может оказывать влияние физиологическое состояние растений (Яаска, Яаска, 1971). Данные ограничения снимаются при использовании ДНК маркеров. В последние десятилетия для изучения генетического разнообразия и генотипирования сортов картофеля широко применяются ДНК-маркеры, основанные на использовании полимеразной цепной реакции: RAPD, ISSR, AFLP, SSR (Hosaka et al., 1994; Бирюкова, 2006; Braun, Wenzel, 2004; Moisan-Thierry et al., 2005 и др.), из которых наиболее эффективными являются микросателлитные или SSR (Simple Sequence Repeats) маркеры.

Ядерные микросателлиты (nSSR маркеры) успешно и широко применяют в самых разных направлениях – для конструирования генетических карт (Ghislain et al., 2004; 2009), изучения дифференциации культурных видов (Raker, Spooner, 2002; Spooner et al., 2007; Gavrilenko et al., 2010), оценки генетического разнообразия сортового генофонда и генотипирования сортов (Feingold et al., 2005; Moisan-Thierry et al., 2005), и реконструкции родословных селекционных сортов (Braun, Wenzel, 2004; Антонова и др., 2004). Между тем, для изучения генетического разнообразия и генотипирования сортов картофеля отечественной селекции SSR анализ использован ограниченно (Антонова и др., 2004; Рыжова и др., 2010).

В коллекции ВИР сохраняется около 2100 селекционных сортов картофеля, в основном – в полевых коллекциях. Образцы из полевых коллекций подвержены воздействию патогенов и вредителей, а также экстремальных абиотических факторов. Для надежного сохранения сортового генофонда необходимо создавать дублетные *in vitro* и криоколлекции, для эффективной систематизации которых необходимо использовать ДНК маркеры.

**Цель работы** заключалась в изучении генетического разнообразия селекционных сортов картофеля из коллекции ВИР и их генотипировании с использованием ядерных SSR маркеров.

### **Задачи работы:**

1. Провести оценку полиморфизма 14 ядерных микросателлитных (nSSR) локусов у селекционных сортов картофеля из коллекции ВИР.
2. Изучить генетическое разнообразие выборки селекционных сортов картофеля.

3. Провести генотипирование выборки селекционных сортов из коллекции ВИР и изучить их генетические взаимосвязи.
4. Оценить идентичность ДНК спектров микрорастений сортов картофеля после длительного *in vitro* и криохранения в сравнении с соответствующими спектрами исходных генотипов.

### **Научная новизна**

Впервые охарактеризовано генетическое разнообразие селекционных сортов картофеля из коллекции ВИР с использованием монолокусных nSSR маркеров из набора PGI (potato genetic identification) (Ghislain et al., 2009). Получены новые данные о генетическом разнообразии сортов в зависимости от времени их создания. Выделены сорта с редкими и уникальными аллелями исследованных nSSR локусов. Проведена модификация метода Droplet vitrification, продемонстрирована возможность использования пазушных почек микрорастений в качестве эксплантов для криоконсервации сортов картофеля.

### **Практическая ценность работы**

С применением 14 nSSR маркеров генотипированы 118 сортов российской, украинской и белорусской селекции из коллекции ВИР. Проведена оценка степени их гетерозиготности по изученным микросателлитным локусам.

На основании данных SSR анализа определен минимальный набор из трех пар праймеров, пригодных для однозначного различения 185 сортов отечественной и зарубежной селекции.

Произведена закладка 22 селекционных и местных тетраплоидных сортов картофеля на длительное криохранение. Показана идентичность ДНК спектров регенерантов после криохранения и микрорастений после длительного *in vitro* хранения соответствующим спектрам исходных генотипов (сортов) из полевой коллекции.

**Апробация работы** Основные результаты представлены на III (Москва, 2003) и V (Москва, 2009) съездах ВОГиС; 17th Triennial Conference of the European Association of Potato Research, - Brasov, Romania, 2008; Всероссийской конференции «Ориентированные фундаментальные исследования и их реализация в АПК России», СПб, 2008; Пятом московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития». М., 2009; Всеросс. конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика К.З. Будина. СПб, 2009; Международной конференции «Роль Вавиловской коллекции генетических ресурсов растений в меняющемся мире», СПб, 2009; COST Action-871 CryoPlaNet, Final meeting, Angers–France (2011); 18<sup>th</sup> Triennial Conference of the European Association of Potato Research, Oulu, Finland, 2011; Molecular Ecology Conference, Vienna, Austria, 2012.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 25 печатных работ, из них - 9 статей, 4 из которых опубликованы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, а также 16 тезисов.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, приложение, список литературы. Работа изложена на 157 страницах и содержит 28 таблиц и 21 рисунок. Список литературы включает 218 источников, в том числе 52 на русском и 166 на иностранных языках.

Автор выражает огромную благодарность своему научному руководителю за постоянное внимание к работе; всем коллегам, способствовавшим реализации

данного исследования. Автор глубоко признателен за практическую и теоретическую помощь в проведении SSR анализа в.н.с. отдела биотехнологии ВИР О.Ю. Антоновой. Автор благодарен зав. отд. ИТО ВИР к.т.н. Л.Ю. Новиковой за помощь в проведении статистической обработки результатов. Автор выражает благодарность за помощь гл.н.с. отдела генетических ресурсов картофеля ВИР д.б.н. Л.И. Костиной.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве материала исследования использовали 185 отечественных и зарубежных сортов различных периодов селекции, сохраняемые в полевой коллекции картофеля ВИР. В изученную выборку входили 118 сортов отечественной селекции, из них 77 российских сортов и 41 сорт ближнего зарубежья, в том числе 23 белорусских, 13 украинских и 5 сортов из пяти бывших республик СССР (итого 118 сортов). Кроме того, была изучена выборка из 67 сортов зарубежной селекции, из них - 28 сортов селекции Германии, 27 – Нидерландов, 5 - селекции Англии, 4 польских сорта и 3 сорта селекции США. Значительная часть выборки (79 сортов или 43%) входила в «Государственный реестр сортов и селекционных достижений Российской Федерации» 2011 года ([http://www.gosort.com/ree\\_cont.html](http://www.gosort.com/ree_cont.html)). Часть изученной выборки включала группы сортов, созданные на основе одного и того же родительского сорта.

ДНК выделяли из листьев растений с использованием модифицированной методики Винанда и Файкса (Wienand, Feix, 1980). Очистку препаратов ДНК проводили с помощью поливинилполипирролидона.

Анализ полиморфизма монолокусных хромосомспецифичных микросателлитов проводили с использованием ПЦР с флуоресцентно-мечеными праймерами. Праймеры для индивидуальных картированных ядерных микросателлитов были отобраны по литературным источникам (Ghislain et al., 2004, Feingold et al., 2005; Milbourne et al., 1998; <http://www.tigr.org>). Условия ПЦР соответствовали рекомендациям разработчиков праймеров, в ряде случаев условия ПЦР были оптимизированы. Электрофорез выполняли в 6,5% денатурирующем полиакриламидном геле на приборе Li-Cor 4300S DNA Analyzer с лазерной детекцией фрагментов с использованием методики, предложенной фирмой – изготовителем (Li-Cor).

Для генотипирования использовали пакет программ Saga2. Информация об аллельном составе nSSR локусов у изученных образцов была занесена в электронную базу данных в формате Microsoft Excel-2003. Наличие определенного амплифицированного фрагмента ДНК у данного генотипа обозначали цифрой «1», отсутствие – цифрой «0». Для оценки полиморфизма микросателлитных локусов использован индекс PIC (Polymorphic Index Content)/  $PIC = 1 - \sum(pi^2)$ , где  $pi$  – частота  $i$  аллели, выявленной в данной выборке (Nei, 1973). Поскольку нельзя исключить возможность того, что используемый метод кластерного анализа может оказывать некоторое влияние на состав группировок сортов, кластерный анализ проводили с помощью нескольких методов: Neighbor Joining (NJ), Simple linkage, UPGMA, WPGMA, Ward в программе DARwin5 (версия 5.0.158, <http://darwin.cirad.fr/darwin>). Расстояния рассчитывались по Дайсу (Dice), по Жаккарду (Jaccard), использовали также среднее евклидово расстояние (Euclidean).

Для сравнения групп сортов различных периодов селекции по показателям полиморфизма (PIC; среднее число аллелей на сорт, число редких и уникальных аллелей; показатели гетерозиготности) была использована методика размножения выборок методом «бутстреп» (Дубров и др., 2003). Для оценки достоверности различий перечисленных выше показателей полиморфизма у разных групп сортов использовали *t* критерий Стьюдента.

В работе использовали общепринятые методы *in vitro* культивирования растений (Дунаева и др., 2010). Микро растения выращивали при температуре 20 - 23°C, при интенсивности освещения 2000 лк, 16 часов освещения и 8 часов темноты. Микрораспространение проводили на среде Мурасиге-Скуга (МС) без гормонов (Murasige, Skoog, 1962).

Криоконсервация почек микро растений картофеля была проведена с использованием методов «Droplet» (Menuhr., 1996) и «Droplet vitrification» (Panis, et al., 2005) с модификациями. Для оценки достоверности различий между отдельными вариантами опыта использовали *t* критерий Стьюдента.

Для изучения идентичности микро растений, полученных после криохранения и длительного *in vitro* хранения, дополнительно к nSSR маркерам использовали RAPD анализ и STS маркеры определенных локусов митохондриальной и пластидной ДНК. В этом случае ПЦР-продукты разделяли электрофорезом в горизонтальных агарозных (1,4%) гелях с применением буфера TBE (×1). Фрагменты ДНК окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Оценка полиморфизма 14 ядерных микросателлитных локусов у выборки сохраняемых в коллекции ВИР сортов селекции России и стран ближнего зарубежья

Анализ полиморфизма 118 сортов отечественной (русской и стран ближнего зарубежья) селекции проводили с использованием 14 пар SSR-праймеров, которые в совокупности генерировали 103 амплификационных фрагмента размером от 66 до 341 п.н. (рис. 1, табл. 1).

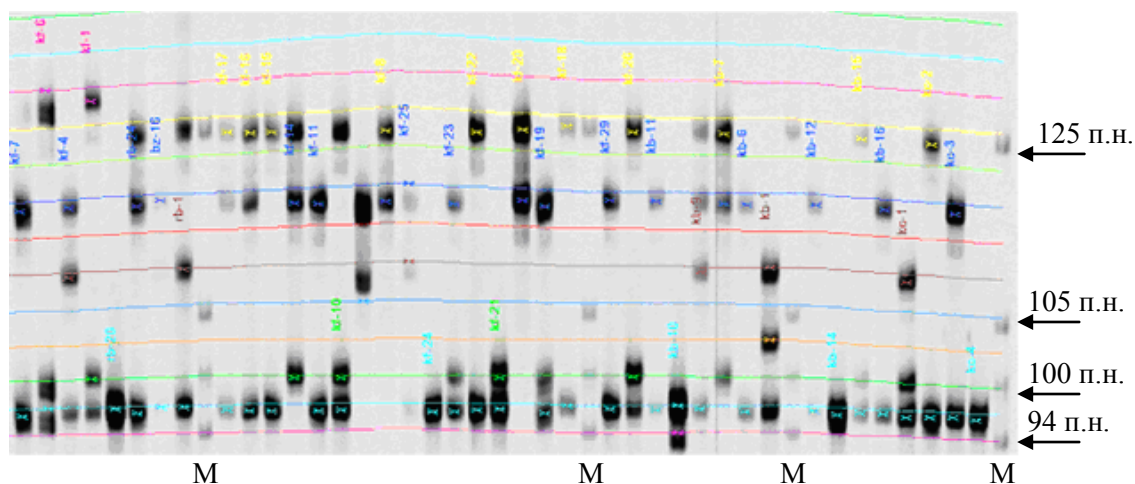


Рисунок 1. Электрофоретические спектры продуктов амплификации nSSR локуса STI004 у 40 сортов. М- маркер молекулярного веса «LiCor 50-350 b.p.»

Аллельный состав микросателлитных локусов для каждого сорта определяли по набору индивидуальных фрагментов ДНК, амплифицированных парой праймеров, специфичных к уникальным последовательностям, фланкирующим определенный микросателлит (рис. 1).

Число аллелей на локус в изученной выборке сортов варьировало от трех (локус STG0025) до 11 (локус STM0037), при этом среднее значение составило 7,4 (табл. 1). Уровень полиморфизма изученных локусов оказался достаточно высоким: значения PIC варьировали от 0,526 (локус STG0025) до 0,840 (локус STM0037), в среднем PIC составлял 0,729 на локус (табл. 1).

Таблица 1. Оценка полиморфизма nSSR локусов у 118 сортов отечественной селекции

№	Локус	Хромо-сома	Повторяющийся мотив	Число аллелей	Размер фрагментов (п.н.)	PIC	Число редких аллелей
1	STM5127	I	(TCT)n	10	236-341	0,765	<b>6</b>
2	STG0016	I	(AGA)n	6	118-154	0,757	<b>0</b>
3	STM5114	II	(ACC)n	8	280-304	0,708	3
4	STG0010	III	(TG)n	8	154-170	0,713	4
5	STI001	IV	(AAT)n	7	176-194	0,754	2
6	STI032	V	(GGA)n	7	108-126	0,814	1
7	STI004	VI	(AAG)n	10	<b>67-106</b>	0,776	4
8	STI033	VII	(AGG)n	9	112-136	0,777	4
9	STM1104	VIII	(TCT)n	5	166-178	0,599	1
10	STM1052	IX	(AT)n GT (AT)n (GT)n	8	207-255	0,771	2
11	STI014	IX	(TGG)n(AGG)n	4	121-130	0,666	1
12	STG0025	X	(AAAC)n	<b>3</b>	194-202	<b>0,526</b>	<b>0</b>
13	STM0037	XI	(TC)n (AC)n AA (AC)n (AT)n	<b>11</b>	68-90	<b>0,840</b>	3
14	STI030	XII	(ATT)n	7	85-106	0,744	2
Итого				103			33
Среднее на локус				7,4		0,729	

Жирным шрифтом обозначены min и max значения

Частота встречаемости различных аллелей 14 микросателлитных локусов в изученной выборке варьировала от 0,8% до 94,1%. При этом подавляющее большинство аллелей встречалось с частотой менее 50% (рис. 2).

Оценивая полиморфизм nSSR локусов у изученных сортов, отдельно учитывали частоту встречаемости (а) уникальных аллелей, которые присутствовали только у одного сорта данной выборки и (б) редких аллелей, частота встречаемости которых не превышала 5%. Суммарно из 103 аллелей, выявленных в 14 nSSR локусах, 33 были редкими (рис. 2). В зависимости от локуса, число редких аллелей варьировало от нуля (локусы STG0016 и STG0025) до шести (STM5127) (табл. 1).

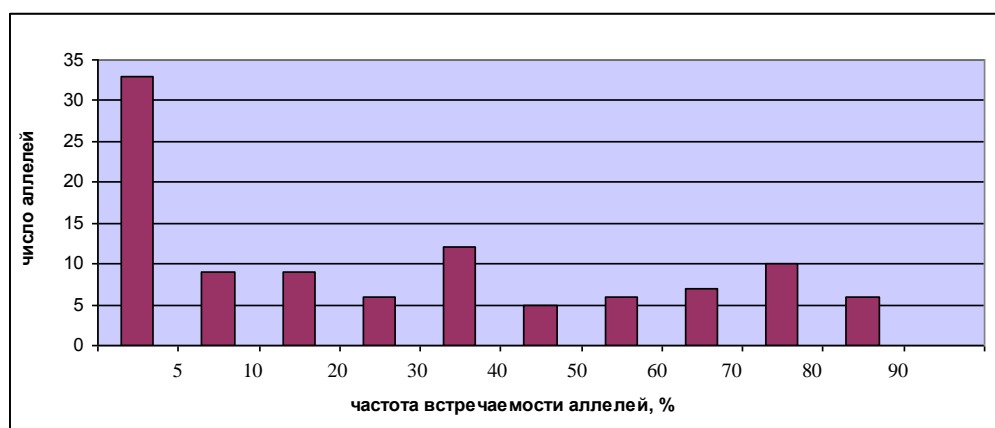


Рисунок 2. Число и частота встречаемости аллелей у 14 nSSR локусов, встречающихся с определенной частотой в исследуемой выборке 118 сортов

Аналогичный подход с использованием тех же 14 nSSR пар праймеров был применен для 67 зарубежных сортов из коллекции ВИР. В этой выборке сортов было выявлено от двух (локус STG0025) до двенадцати (локус STI0004) различных аллелей; в среднем 6,6 аллелей на локус (табл. 2). У 67 зарубежных сортов выявлено 22 редких и 7 уникальных аллелей. Уровень полиморфизма изученных локусов у зарубежных сортов также был достаточно высоким: значения индекса PIC варьировали от 0,498 до 0,840 в зависимости от локуса, и в среднем составляли 0,720 (табл. 2). Наименьшее значение индекса PIC выявлено для локуса STG0025, наибольшее – для локуса STI037, также как и у выборки отечественных сортов (табл. 2, 1).

Таблица 2. Показатели полиморфизма 14 nSSR локусов у выборки 67 сортов зарубежной селекции

№ п/п	Локус	Хромосома	Число аллелей	Размер фрагментов (п н)	PIС	Число редких аллелей
1	STM5127	I	6	236- <b>341</b>	0,749	1
2	STG0016	I	6	118-154	0,763	1
3	STM5114	II	7	280-304	0,671	3
4	STG0010	III	7	154-170	0,714	3
5	STI0001	IV	5	176-194	0,725	<b>0</b>
6	STI0032	V	7	108-126	0,793	1
7	STI0004	VI	<b>12</b>	<b>67</b> -106	0,764	<b>6</b>
8	STI0033	VII	7	112-136	0,761	2
9	STM1104	VIII	5	166-178	0,629	1
10	STM1052	IX	9	207-253	0,770	4
11	STI0014	IX	3	121-130	0,652	<b>0</b>
12	STG0025	X	<b>2</b>	194-202	<b>0,498</b>	<b>0</b>
13	STM0037	XI	10	70-90	<b>0,840</b>	<b>0</b>
14	STI0030	XII	6	85-106	0,745	<b>0</b>
Итого			<b>92</b>			22
Среднее			6,6		0,720	

Жирным шрифтом обозначены min и max значения



Показатели полиморфизма nSSR локусов у сортов двух выборок оказались близки и достоверно не отличались (коэффициент корреляции Спирмена  $\rho=0,95$ ).

## 2. Изучение генетического разнообразия селекционных сортов

### 2.1. Выявление сортов с редкими и уникальными аллелями nSSR локусов

В выборке 118 отечественных сортов обнаружено 12 сортов с уникальными аллелями и 58 сортов с редкими аллелями (табл. 3). Максимальное число редких аллелей на сорт не превышало трех, таких сортов в выборке оказалось всего восемь (табл. 3).

Таблица 3. Сорта отечественной селекции с редкими аллелями 14 nSSR локусов

Аллель		Сорт
STM0037	70	Алмаз, Верас, Милавица, Памяти Осиповой
	76	Нарочь, Нарт1
	90	Акросия, Арина, Архидея, Атлант, Бежицкий
STG0010	154	Дина, Марс, Наяда, Сузорье
	156	Искра, Ресурс
	168	Выток, Крепыш, Прибрежный, Пригожий 2, Сапрыкинский
	170	<i>Сапрыкинский</i>
STM5114	283	<i>Гранат</i>
	301	<i>Слава Брянщины</i>
	304	Бежицкий, Владикавказский, Крепыш, Пролисок, Рамзай
STI001	182	<i>Сказка</i>
	194	Алиса, Живица, Резерв, Экскорт
STI032	114	<i>Брянский надежный</i>
STI004	67	<i>Голубизна</i>
	76	<i>Алмаз</i>
	100	Брянская новинка, Милавица, Пригожий 2
	106	<i>Сентябрь</i>
STI033	115	Погарский, Слава Брянщины, Юбилей Жукова
	121	Бежицкий, Бородянский розовый, Владикавказский, Рамзай
	127	<i>Брянский деликатес</i>
	136	Брянский красный, Брянский надежный, Зарево, Румянка, Сентябрь
STI030	77	Марс, Накра
	103	Ветеран, Живица, Накра, Никита, Сентябрь
STM1052	249	Резерв, Нарымка, Шурминский, Хибинский ранний
	253	<i>Загадка</i>
STI0014	124	Найда, Погарский, Сказка, Слава Брянщины
STM1104	178	Пригожий 2, Шурминский-2
STM5127	242	<i>Зов</i>
	245	Алмаз, Мастер, Успех, Филатовский
	260	Бородянский розовый, Брянская новинка, Зарево, Ромашка
	269	Милавица, Юбилей Жукова
	272	<i>Хибинский ранний</i>
	341	Алена, Бородянский розовый, Брянская новинка, Виза, Ромашка
Итого	33	58 сортов

Сорта с уникальными аллелями обозначены курсивом

Следует отметить, что сорта Алмаз, Сентябрь и Слава Брянщины, одновременно имели и редкие, и уникальные аллели одновременно (табл. 4).

Таблица 4. Сорта выборки, имеющие максимальное число (три) редких аллели в изученных 14 nSSR локусах

Название сорта	Информация о родословных	Аллель
Алмаз	неизвестна	<i>STM5127_245, STM0037_70, STI004_76</i>
Бежицкий	Hydra × Немешаевский юбилейный ( <i>chc, dms</i> )	<i>STM5114_304, STI033_121, STM0037_90</i>
Бородянский розовый	<i>chc, acl, dms, adg, lept, vrn, com</i>	<i>STM5127_260, STM5127_341, STI033_121</i>
Брянская новинка	Лео × Добро ( <i>dms</i> )	<i>STM5127_260, STM5127_341, STI004_100</i>
Милавица	Свитязанка × Зарево ( <i>dms, adg, lept, chc</i> )	<i>STM5127_269, STI004_100, STM0037_70</i>
Пригожий 2	Сеянец 737-8 × Минский ранний ( <i>dms</i> )	<i>STG0010_168, STI004_100, STM1104_178</i>
Сентябрь	Иртыш × Зарево ( <i>dms, adg, lep, chc</i> )	<i>STI004_106, STI033_136, STI030_103</i>
Слава Брянщины	Ресурс × 655m-30 ( <i>adg, dms, acl, stol, vrn, chc</i> )	<i>STM5114_301, STI033_115, STI014_124</i>

Курсивом выделены уникальные аллели; в скобках указаны дикие и культурные виды, участвовавшие в создании определенного сорта

## 2.2. Изучение полиморфизма сортов в зависимости от периода селекции

С использованием расширенной выборки сортов (118 отечественных и 67 зарубежных) были сформированы три группы, соответствующие трем различным периодам селекции картофеля:

(1) Группа стародавних сортов, созданных на основе генетического разнообразия культурных видов картофеля. В нее вошли такие сорта, такие как Patersons Victoria (1863), Early Rose (1867), Cobbler (1876), Flourball (1895), Epicure (1897), Ella (1898), Bintjie (1910), Deodara (1913), Hindenburg (1916), Berlichingen (1927) и Paul Wagner (1928).

(2) Сорта, созданные на основе межвидовой гибридизации, начиная с первой трети XX века – времени начала вовлечения в селекцию единичных дикорастущих видов.

(3) Современные сорта, созданные в последние три десятилетия, соответствующие третьему периоду селекции картофеля – активному использованию межвидовой гибридизации. Эти сорта являются сложными межвидовыми гибридами, в родословных которых участвовали несколько диких видов и в ряде случаев – еще культурные виды.

Для каждой группы сортов были рассчитаны показатели полиморфизма 14 микросателлитных локусов (индекс PIC, среднее число аллелей на сорт, среднее число редких и уникальных аллелей на сорт). Результаты расчетов представлены графически на рисунке 3.

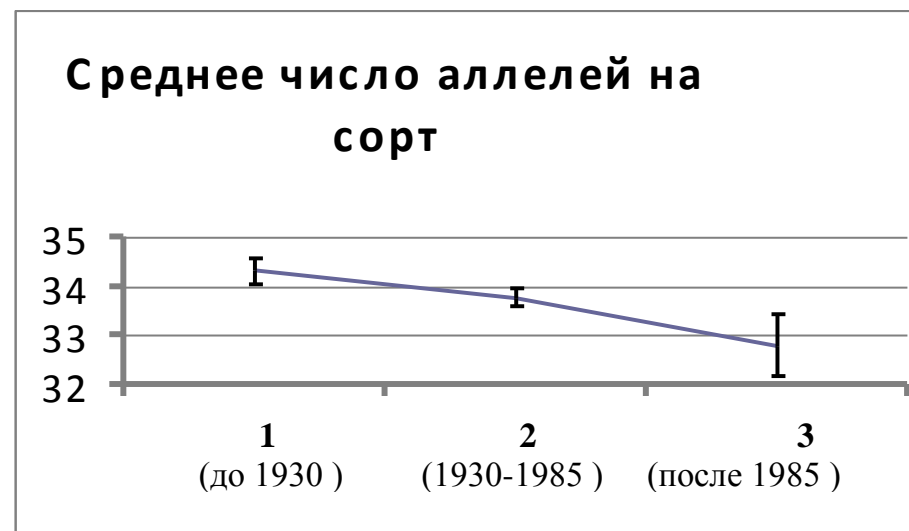
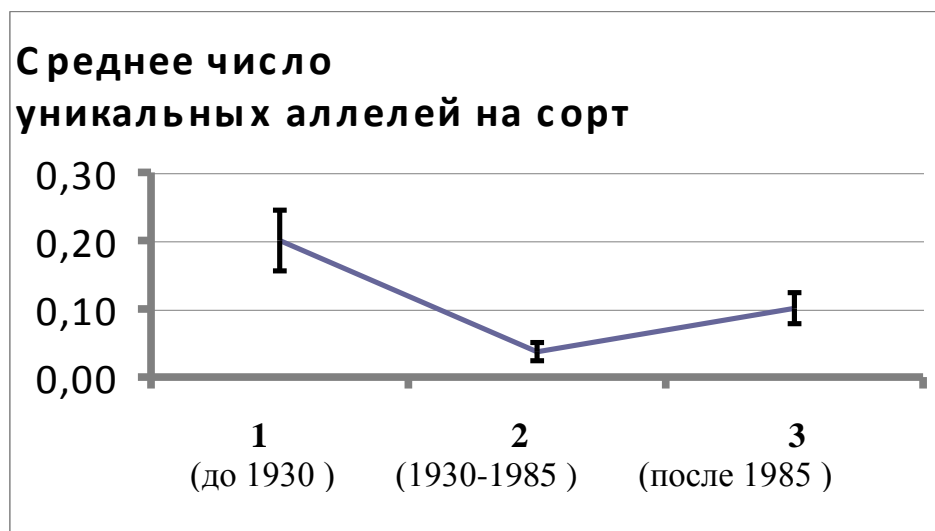
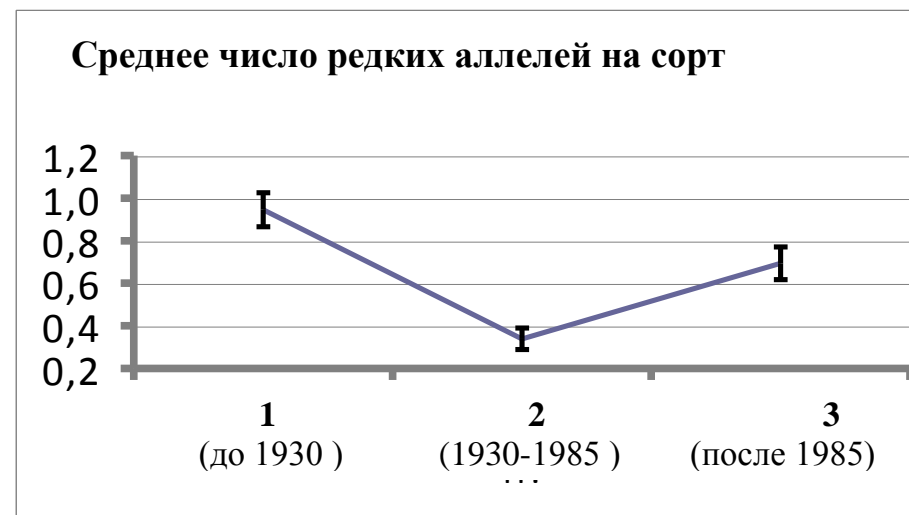
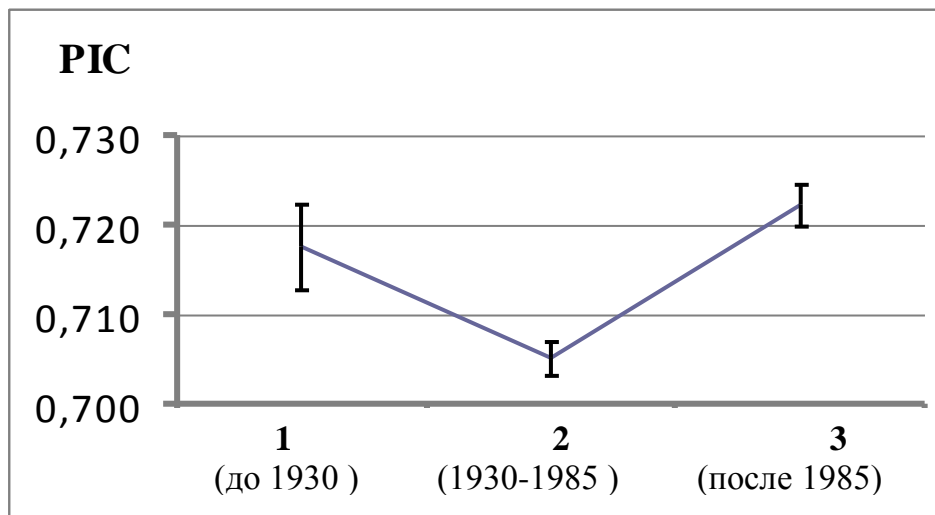


Рисунок 3. Значения показателей полиморфизма у сортов различных периодов селекции (1, 2, 3), рассчитанные по результатам SSR анализа 14 микросателлитных локусов

Сорта группы 2 имели достоверно более низкие значения трех показателей полиморфизма: индекса PIC, числа редких и числа уникальных аллелей (в среднем рассчитанных на сорт) по сравнению как со стародавними (группа 1), так и с современными сортами (группа 3). Современные сорта выборки (группа 3) и стародавние сорта (группа 1) по показателям PIC и среднему числу уникальных аллелей на сорт достоверно не различались. Однако число редких аллелей и среднее число аллелей на сорт у группы современных сортов было достоверно ниже, чем у группы стародавних (рис. 3).

Таким образом, изученные стародавние сорта оказались наиболее полиморфными, а изученные сорта, созданные во второй период селекции - в 1930-1985 гг. – наименее полиморфными.

### 2.3. Оценка уровня гетерозиготности отечественных сортов с использованием ядерных микросателлитных маркеров

Оценивая степень гетерозиготности, необходимо учитывать ploидность генотипов. Как известно, все селекционные сорта картофеля являются тетраплоидами ( $2n=4x=48$ ), поэтому гетерозиготность каждого локуса может варьировать от дуплекса до квадриплекса. Определить степень гетерозиготности генотипов и идентифицировать дуплексы (Д), триплексы (Т) и квадриплексы (К) для каждого изучаемого локуса позволяет использование монолокусных pSSR маркеров (рис. 4).

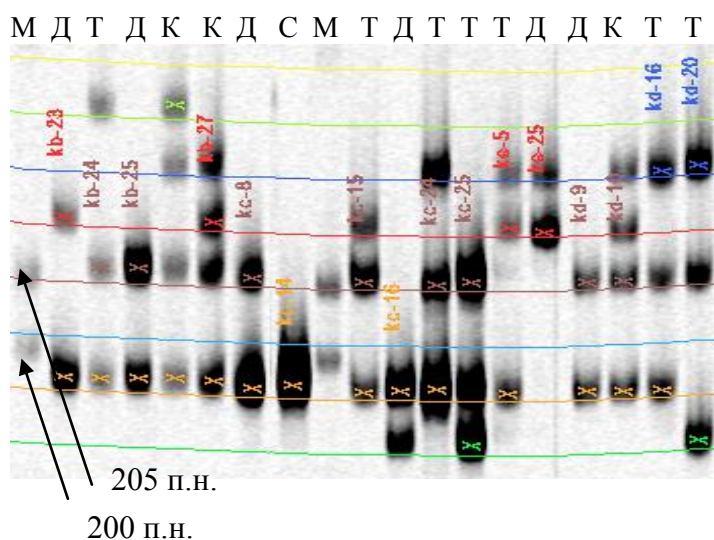


Рисунок 4.

Электрофоретические спектры продуктов амплификации nSSR локуса STI001 у 17 сортов.

М - маркер молекулярного веса «LiCor 50-350 б.р.»

Отмечено различное число амплифицированных фрагментов (аллелей) данного локуса у каждого сорта:  
С - симплекс (1 аллель),  
Д - дуплекс (2 аллели),  
Т - триплекс (3 аллели),  
К - квадриплекс (4 аллели данного локуса)

В таблице 5 представлены результаты оценки уровня гетерозиготности 14 nSSR локусов у выборки 118 отечественных сортов. Максимально ожидаемая гетерозиготность ( $H_1$ ) рассчитывалась согласно Гаевскому (2002) по формуле:  $H_1=1-1/n$  (где  $n$  - число аллелей в данном локусе), ее показатели варьировали от 66,7% до 90,9%. Фактическая гетерозиготность ( $H_2$ ) оценивалась по частоте встречаемости локусов в гетерозиготном состоянии (Д + Т + К) и варьировала от 59,3% до 99,1%. У изученных сортов доля (%) дуплексов - гетерозиготных nSSR локусов, имеющих по две аллели - варьировала от 25,7% до 71,6%, доля триплексов - от 0,8% до 53,8% и доля квадриплексов – от 0 до 21,2% в зависимости от локуса (табл. 5).

Доля (%) гомозиготных nSSR локусов (симплексов) у изученных сортов варьировала от 0,9% до 40,7% и в среднем составила 13,1% на локус (табл. 5).

Необходимо учитывать, что реальная частота генотипов, имеющих nSSR локусы в гомозиготном состоянии (симплекс), может быть ниже в случае наличия в определенных локусах «нулевых» аллелей.

Таблица 5. Степень гетерозиготности изученных nSSR локусов у 118 сортов российской, украинской, белорусской селекции

Локус	Доля (%) гомозиготных локусов у изученных генотипов (Симплекс)	Доля (%) гетерозиготных локусов у сортов с различным гетерозиготным состоянием			Суммарная гетерозиготность (%) гетерозиготных nSSR локусов (Д + Т + К) =H <sub>2</sub>	Ожидаемая гетерозиготность H <sub>1</sub> (%)
		Д	Т	К		
STM5127	30,2	48,3	16,4	5,2	69,8	90,0
STG0016	5,9	38,1	48,3	7,6	94,7	83,3
STM5114	6,8	56,4	27,4	9,4	93,2	87,5
STG0010	11,6	51,8	35,7	0,9	88,4	87,5
STI001	7,7	34,2	45,3	12,8	92,3	85,7
STI032	9,7	<b>25,7</b>	43,4	21,2	90,3	85,7
STI004	10,3	41,4	40,5	7,8	89,7	90,0
STI033	<b>0,9</b>	29,9	<b>53,8</b>	15,4	<b>99,1</b>	88,9
STM1104	<b>40,7</b>	58,5	<b>0,8</b>	<b>0</b>	<b>59,3</b>	80,0
STM1052	6,1	41,2	38,6	14,1	93,7	87,5
STI014	9,4	57,3	33,3	<b>0</b>	90,6	75,0
STG0025	23,3	<b>71,6</b>	5,2	<b>0</b>	76,7	<b>66,7</b>
STM0037	7,6	33,9	39	<b>19,5</b>	92,4	<b>90,9</b>
STI030	12,8	41,1	39,3	6,8	87,2	85,7
Среднее	13,1	45	33,4	8,6	87,0	84,6

Жирным шрифтом обозначены min и max значения

Известен факт, что высокогетерозиготные организмы имеют большую адаптивную способность (Алтухов, 2003). Монолокусные nSSR маркеры предоставляют возможность оценить уровень гетерозиготности полиплоидного организма. Для того, чтобы исследовать возможную связь степени гетерозиготности сортов и их адаптивности, из общей выборки были отобраны сорта с широкой адаптивностью (допущенные к использованию в нескольких регионах РФ) и сорта с узкой адаптивностью (допущенные к использованию только в одном отдельном регионе) (Госреестр, 2011 г.) (табл. 6).

Для этих двух групп сортов были подсчитаны ожидаемая (H<sub>1</sub>) и фактическая (H<sub>2</sub>) гетерозиготность. Рассчитанные показатели гетерозиготности для 14 nSSR локусов были несколько выше в группе широко адаптивных сортов, по сравнению с узко адаптивными сортами (табл. 6). Однако для более объективной оценки взаимосвязи степени гетерозиготности и адаптивности сорта необходимо анализировать данные для гораздо большего числа nSSR локусов.

Таблица 6. Показатели гетерозиготности 14 nSSR локусов у сортов, отличающихся по степени адаптивности

Сорт	Регион допуска*	Число nSSR локусов сорта в состоянии:			
		С	Д	Т	К
Узко адаптивные сорта					
Брянский надежный	3	5	5	3	1
Акросия	3	1	5	7	1
Марс	4	3	3	7	1
Нарт 1	6	2	9	2	1
Юбилей Жукова	3	1	5	8	0
Красная роза	6	1	6	7	0
Рамзай	7	0	7	6	1
Россиянка	3	2	8	4	0
Алиса	4	2	6	5	1
Синева	12	1	9	2	1
Нарымка	10	1	7	5	1
H <sub>1</sub> , %	73,1				
H <sub>2</sub> , %	89,7				
Широко адаптивные сорта					
Алена	4, 9, 10 12	0	4	9	1
Голубизна	3, 4, 5, 6	1	7	6	0
Жуковский ранний	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12	0	7	7	0
Крепыш	1, 2, 3, 5, 12	1	8	3	2
Ладожский	1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 12	2	9	3	1
Ресурс	3,5,7	1	5	7	0
Накра	4, 10, 11, 12	3	6	5	0
Никулинский	1, 2, 3, 4, 7, 9, 10	1	4	7	2
Наяда	1, 2, 3, 4, 5, 9, 12	0	8	6	0
Снегирь	1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 12	3	4	6	1
Удача	2, 3, 4, 5, 6, 7, 12	5	5	3	1
H <sub>1</sub> , %	79,9				
H <sub>2</sub> , %	90,8				

\* номера 1-12 регионов указаны в соответствии с Госреестром 2011 г.: 1- Северный; 2- Северо-западный; 3- Центральный; 4- Волго-вятский; 5- Центрально-черноземный; 6- Северо-кавказский; 7- Средневолжский; 8- Нижневолжский; 9- Уральский; 10- Западно-сибирский; 11- Восточно-сибирский; 12- Дальневосточный; С – симплекс, Д – дуплекс, Т – триплекс, К - квадриплекс

### 3. Генотипирование выборки сортов российской, украинской, белорусской селекции из коллекции ВИР

Система генотипирования Li-Cor 4300S, используемая нами, позволяет четко определить размеры всех амплифицированных фрагментов. Набор аллелей 14 изученных nSSR локусов был индивидуален для каждого из 118 сортов отечественной селекции, что дало возможность генотипировать все сорта изученной выборки.

Для регистрации результатов генотипирования можно использовать два подхода – (а) представлять для каждого сорта аллельный состав всех изученных

локусов или (б) привести аллельные варианты (гаплотипы) локусов сортов, что позволяет выявить наиболее информативные для данной выборки маркеры.

Сочетание 103 аллелей 14 nSSR локусов для выборки 118 отечественных сортов дало 356 гаплотипов (табл. 7). Из них 148 гаплотипов являлись уникальными, т.е. характерными только для одного конкретного сорта выборки, а 206 гаплотипов были выявлены у групп, включающих от двух до 82 сортов («общие гаплотипы») (табл. 7).

Таблица 7. Число гаплотипов 14 nSSR локусов, детектируемых в выборке 118 отечественных сортов

№ п/п	Локус	Число гаплотипов на локус	Число «общих» гаплотипов для каждого локуса	Численность групп сортов, имеющих «общие» гаплотипы данного локуса	Число уникальных гаплотипов на локус
1	STM5127	28	13	2-17	15
2	STG0016	25	17	2-25	8
3	STM5114	17	11	2-44	6
4	STG0010	22	11	2-30	11
5	STI001	24	18	2-24	6
6	STI032	43	<b>26</b>	2-9	17
7	STI004	33	17	2-15	16
8	STI033	24	18	2-19	6
9	STM1104	11	10	2-53	<b>1</b>
10	STM1052	26	16	2-17	10
11	STI014	10	7	2-41	3
12	STG0025	<b>5</b>	<b>4</b>	3-82	1
13	STM0037	<b>62</b>	24	2-10	<b>38</b>
14	STI030	26	14	2-24	12
Итого		356	206	2-82	148

Жирным шрифтом обозначены min и max значения

Как видно из результатов, представленных в таблице 7, из 14 nSSR маркеров наименее информативным оказался STG0025, с помощью которого у 118 сортов выявлено только 5 гаплотипов. Наиболее информативным был маркер STM0037, с использованием которого у 118 сортов детектировано 62 гаплотипа, из них 38 уникальных и 24 «общих», объединяющих от двух до 10 сортов (табл. 7). Максимальное число уникальных гаплотипов (по 4) имели четыре сорта выборки - Алена, Кристалл, Скарб и Зов.

В целях проверки эффективности генотипирования при помощи набора из 14 пар изученных nSSR праймеров мы добавили к 118 отечественным сортам еще 67 сортов зарубежной селекции. Оказалось, что набор аллелей в изученных 14 nSSR локусах был индивидуален для каждого сорта, что позволило нам различить и генотипировать все 185 сортов.

С целью снижения временных и материальных затрат на проведение генотипирования была проведена минимизация числа nSSR маркеров. Минимальный набор для генотипирования отечественных сортов включил три

маркера, а именно STI004, STI033, STM0037, которые у 118 сортов отечественной селекции суммарно детектировали 29 аллелей. Однако при изменении состава и/или расширении объема генотипируемой выборки, использование только этих трех маркеров в SSR анализе может оказаться недостаточно.

#### **4. Изучение генетических взаимосвязей сортов**

По результатам исследования полиморфизма 14 nSSR локусов был выполнен кластерный анализ для 118 сортов отечественной селекции.

Изученные 118 сортов российской, украинской и белорусской селекции независимо от примененных методов кластерного анализа объединялись в смешанные группы. Исключение составили девять сортов (Альпинист, Гарант, Лазурит, Пригожий 2, Сузорье, Выток, Лошицкий, Дина, Темп), созданных в Белорусском НИИ картофельного хозяйства, которые кластеризовались вместе (рис. 5).

Некоторые небольшие группы сортов объединялись вместе при использовании различных методов кластерного анализа, например: сорта Бежицкий, Владикавказский и Жуковский ранний, созданные на основе одного и того же сорта Hydra; сорт Зарево и сорта, созданные на его основе (Алена, Брянский красный, Брянский надежный, Милавица и Сентябрь) (рис. 5). С использованием метода NJ можно было также выделить пары сортов, которые кластеризовались вместе с относительно высокими (более 70%) значениями бутстреп оценки: Слава Брянщины и Погарский; Удача и Украинский розовый; Никулинский и Горянка и др. (рис. 5).

77 сортов российской селекции были созданы в 18 селекционных центрах, находящихся в 8 регионах РФ. Результаты кластерного анализа не выявили специфического группирования сортов в соответствии с местом их создания.

Для выборки 185 сортов, объединяющей сорта отечественной и зарубежной селекции, также был проведен кластерный анализ. При этом не было выявлено специфического группирования сортов по странам их происхождения. Исключение составили 10 нидерландских сортов: Accent, Anosta, Fambo, Impala, Marfona, Ostara, Prior, Resi, Sirko, Victoria, которые на кластере объединялись вместе при использовании различных методов кластерного анализа.

Таким образом, результаты кластерного анализа, проведенного на основании изучения полиморфизма 14 nSSR локусов, не позволяют дифференцировать сорта по их происхождению (страна происхождения, селекционный центр), что может указывать на интенсивный обмен селекционным материалом.



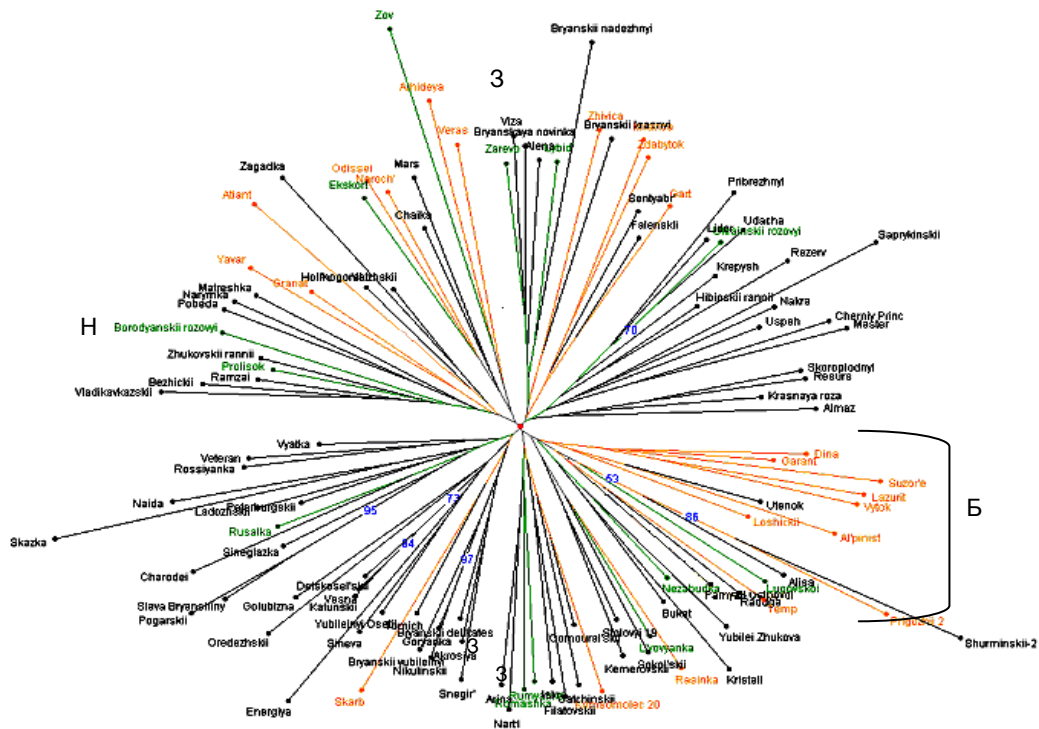


Рисунок 5. Группирование 118 сортов российской, белорусской и украинской селекции с использованием метода NJ, программа DARwin 5.0.158.

Б - группа белорусских сортов; Н - сорта, созданные на основе сорта Нюдра;

3 - сорта, созданные на основе Зарево

## 5. Оценка идентичности ДНК спектров микрорастений сортов картофеля после длительного *in vitro* и криохранения в сравнении с исходными генотипами

### Молекулярный анализ микрорастений сортов картофеля после длительного *in vitro* хранения

Сорта картофеля можно стабильно воспроизводить только при вегетативном размножении, поскольку семенная репродукция разрушает генетическую структуру сорта. Для надежного сохранения сортового генофонда дополнительно к полевым коллекциям необходимо создавать дублетные *in vitro* и крио коллекции, которые позволяют сохранять оздоровленный материал в условиях защищенности от воздействия экстремальных биотических и абиотических факторов (Гавриленко и др., 2007; Дунаева и др., 2011).

Для оценки идентичности спектров ДНК микрорастений, различное время сохраняемых в условиях *in vitro*, их контрольным вариантам, мы использовали разные типы ДНК маркеров: 10 nSSR праймеров; 12 RAPD праймеров и 2 STS праймера, специфичных к определенным локусам оргanelьных ДНК. Контролем служили ДНК спектры растений того же самого сорта из полевой коллекции. Продукты амплификации ДНК микрорастений двенадцати сортов, сохраняемых в условиях *in vitro* от 1 года до 14 лет, были идентичны контрольным, независимо от продолжительности *in vitro* хранения (рис. 6).

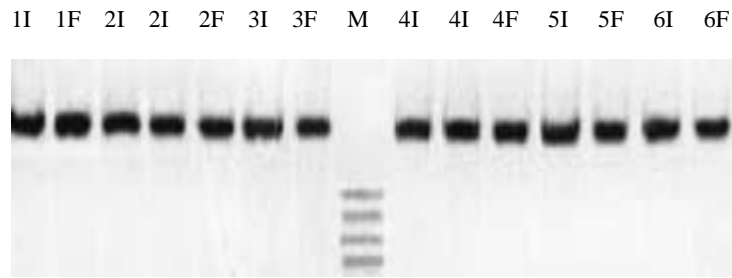


Рисунок 6. Электрофоретические спектры продуктов амплификации хлоропластной ДНК с праймером *atpB* у микрорастений (I) и их полевых аналогов (F): 1- Paul Wagner, 2 – Петербургский, 3 – Луговской, 4 - Лорх, 5 – Пушкинец, 6 – Изора. М – маркер молекулярного веса Fermentas 100-1000 п.н. Выбор для анализа пластидного локуса *atpB* объясняется тем, что у регенерантов в культуре *in vitro* отмечена нестабильность по данному локусу (Мозгова и др., 2006).

### Модификация методов криоконсервации сортов картофеля

При криохранении все метаболические процессы в растениях фактически останавливаются и теоретически возможно бессрочно долго сохранять генетически стабильный растительный материал в контролируемых условиях среды (-196°C). В настоящее время разработан ряд протоколов криоконсервации для различных объектов. Одной из основных проблем криоконсервации является отсутствие стандартных методов. Кроме того, условия криоконсервирования являются стрессовыми, и поэтому протоколы нуждаются в модификациях, позволяющих снизить стрессовую нагрузку на растение.

На начальном этапе исследования была модифицирована методика криоконсервации почек картофеля. Модификация для «Droplet» метода заключалась в сокращении времени обработки криопротектором (10% DMSO) с 2 до 1,5 часов, а для методов «Droplet» и «Droplet vitrification» - в использовании пазушных почек наряду с апикальными.

Наши результаты показали, что при сокращении времени обработки криопротектором регенерационная способность у сорта Desiree существенно не отличалась от оригинального протокола (25,0%±3,2 для оригинального протокола и 31,7%±2,6 для модифицированного протокола), а у образца 613090 *S. acaule* результаты для модифицированного протокола были достоверно выше ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с оригинальным протоколом (26,0%±2,5 и 16,7%±2,6, соответственно).

Наши результаты показали также возможность использования в качестве эксплантов пазушных почек наряду с апикальными (что требует исходный протокол). При использовании метода «Droplet vitrification» для 15 из 22 сортов не было выявлено существенных различий в проценте регенерации пазушных и апикальных почек (рис. 7). Криоконсервация пазушных почек позволит существенно сократить время и расходы на предварительное размножение микрорастений и тем самым повысить эффективность работ по созданию криколлекций картофеля.

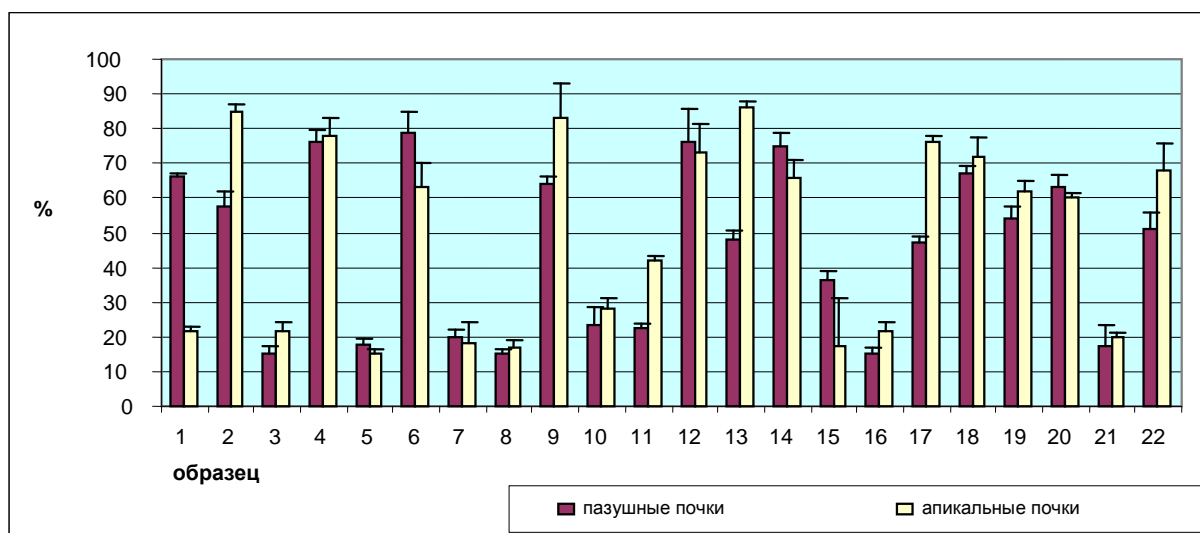


Рисунок 7. Регенерационная способность апикальных и пазушных почек 22 сортов (1-22).

### Молекулярный анализ регенерантов сортов картофеля после криоразмораживания

Для оценки идентичности исходных растений и растений-регенерантов мы использовали различные системы ДНК маркеров (6 SSR, 9 RAPD и 2 STS пар праймеров). Препараты ДНК выделяли из растений регенерантов, полученных после криоразмораживания и из контрольных растений. Результаты исследования не выявили различий молекулярных профилей у регенерантов и контрольных растений (рис. 8, 9). Одновременно была подтверждена принадлежность регенеранта к исходному генотипу (сорт).

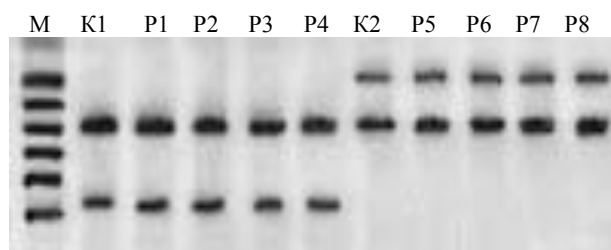


Рисунок 8. Продукты амплификации ДНК контрольных микрорастений и растений-регенерантов с RAPD праймером OPA 10. (K1) – исходное *in vitro* растение сорта Desiree (P1– P4) – регенеранты, полученные после криоконсервации почек сорта Desiree. (K2) – исходное *in vitro* растение образца 613090 *S. acaule* (P5 - P8) регенеранты почек образца 613090 *S. acaule* M – маркер молекулярного веса Fermentas 100-3000 п.н.

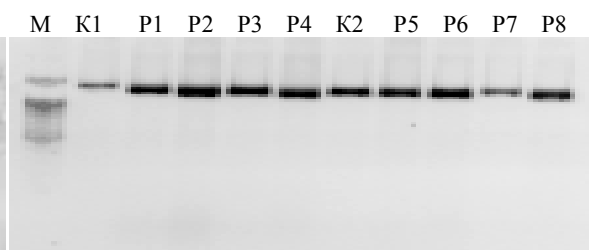


Рисунок 9. Продукты амплификации ДНК контрольных микрорастений и растений-регенерантов с парой праймеров, специфичных к локусу *atp B* пластидной ДНК. (K1) – исходное *in vitro* растение сорта Desiree (P1– P4) – регенеранты, полученные после криоконсервации почек сорта Desiree. (K2) – исходное *in vitro* растение образца 613090 *S. acaule* (P5 - P8) регенеранты почек образца 613090 *S. acaule* M – маркер молекулярного веса Fermentas 100-1000 п.н.

## ВЫВОДЫ

1. Показан высокий уровень полиморфизма 14 ядерных микросателлитных локусов у 118 сортов отечественной селекции. В зависимости от локуса число аллелей варьировало от 3 до 11, а значения индекса PIC - от 0,526 до 0,840. Показатели полиморфизма тех же самых микросателлитных локусов у 67 зарубежных сортов оказались сходными. Наиболее полиморфным в обеих выборках оказался локус STM0037, а наименее полиморфным – локус STG0025.

2. На основании результатов анализа полиморфизма 14 nSSR локусов проведено генотипирование 118 сортов селекции России и стран ближнего зарубежья из коллекции ВИР. Показано, что для однозначного различения селекционных сортов изученной выборки набор маркеров может быть минимизирован до 3 пар праймеров: STI004, STI033, STM0037.

3. Выделены сорта с редкими и уникальными аллелями, а также сорта, имеющие наиболее высокие значения гетерозиготности изученных nSSR локусов. Показано, что сорта трех основных периодов селекции различаются по показателям уровня полиморфизма (индексам PIC, числу редких и уникальных аллелей, в среднем рассчитанных на сорт).

4. С использованием данных SSR-анализа изучены генетические взаимосвязи сортов различного происхождения. Не выявлено специфического группирования сортов, связанного с местом их создания (страна, селекционный центр).

5. У регенерантов, полученных после криоконсервации, не выявлено изменений в составе спектров амплификационных продуктов по сравнению с контрольными генотипами (соответствующими сортами).

## СПИСОК ОСНОВНЫХ ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### I. Статьи, изданные в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Костина Л. И., Малышев Л.Л., Гавриленко Т.А. Генетическая дифференциация сортов картофеля с использованием SSR маркеров. // Аграрная Россия. 2004. – № 6. – С.19-24

2. Киру С.Д., Гавриленко Т.А., Костина Л.И., Рогозина Е.В., Антонова О.Ю., Трускинов Э.В., Швачко Н.А., Крылова Е.А., Смирнова А.Б. Сохранение, изучение и использование в селекции генетических ресурсов картофеля во ВНИИР им. Н.И. Вавилова (ВИР). Достижения науки и техники АПК. – 2007. – Т. 7. – С. 2-6.

3. Gavrilenko T., Antonova O., Ovchinnikova A., Novikova L., Krylova E., Mironenko N., Pendinen G., Islamshina A., Shvachko N., Kiru S., Kostina L., Afanasenko O., Spooner D. A microsatellite and morphological assessment of the Russian National Potato Collection. // Genetic Resources and Crop Evolution. – 2010. – V. 57. – P. 1151–1164.

4. Kaczmarczyk A., Shvachko N., Lupysheva Y., Hajirezaei M.-R., Keller E.R.J. Influence of alternating temperature preculture on cryopreservation results for potato shoot tips. // Plant Cell Report. . – 2008. – V. 27. – P. 1551–1558.

### II. Публикации не входящие в перечень ВАК РФ

1. Дунаева С.Е., Пендинен Г.И., Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Волкова Н.Н., Гавриленко Т.А Сохранение вегетативно размножаемых культур в *in vitro* и криоколлекциях. Под.ред. Гавриленко Т.А. // Методические указания. – С.-Петербург, ГНУ ВИР Россельхозакадемии. – 2011. – 64 с.

2. Гавриленко Т.А., Дунаева С.Е., Трускинов Э.В., Антонова О.Ю., Пендинен Г.И., Лупышева Ю.В., Роговая В.В., **Швачко Н.А.** Стратегия долгосрочного сохранения генофонда вегетативно размножаемых сельскохозяйственных растений в контролируемых условиях среды. // Тр. по прикл. бот., ген. и сел. – С.-Петербург, 2009. – Т. 164. – С. 273-285.

3. **Швачко Н.А.**, Антонова О.Ю., Новикова Л.Ю., Костина Л.И., Гавриленко Т.А. Генотипирования сортов картофеля на основе анализа полиморфизма ядерных микросателлитных последовательностей. // Тр. по прикл. бот., ген. и сел. – С.-Петербург, 2009. – Т. 166. – С. 478-480.

4. Гавриленко Т., Овчинникова А., Новикова Л., Крылова Е., Мироненко Н., Пендинен Г., **Швачко Н.**, Исламшина А., Киру С., Костина Л., Спунер Д. Изучение генетического разнообразия культурных и родственных диких видов картофеля из коллекции ВИР им. Н.И.Вавилова на основе анализа полиморфизма микросателлитных последовательностей ядерной ДНК и анализа изменчивости морфологических признаков. // Тр. по прикл. бот., ген. и сел. – С.-Петербург, 2009. – Т. 166. – С. 372-375.

5. **Швачко Н.А.** Использование микросателлитного анализа для характеристики генетического разнообразия сортов картофеля коллекции ВИР им. Н.И.Вавилова. // Матер. конференции молодых Ученых Северо-Западного научного центра «Формирование конкурентоспособности молодых ученых и специалистов». – С.-Петербург, 2006. – С. 36.

6. **Швачко Н.А.**, Сенник С.В. Оценка генетической стабильности *in vitro* образцов *Solanum tuberosum* L. на основе использования ДНК маркеров. // Матер. 10-ой Пушкинской школы-конференции молодых учёных (17-21 апреля, 2006, Пушкино). – Пушкино, 2006. – С. 394-395.

7. **Швачко Н.А.**, Сенник С.В., Антонова О.Ю., Гавриленко Т.А. Использование ДНК-маркеров для изучения генетической стабильности образцов картофеля коллекции ВИР, длительно сохраняемых в условиях *in vitro*. // Матер. Всероссийской научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира» (24-25 августа, 2006, Волгоград). – Волгоград, 2006. – С. 137-143.

8. Антонова О.Ю., **Швачко Н.А.**, Костина Л.И., Гавриленко Т.А. Использование SSR маркеров для идентификации сортов картофеля из коллекции ВИР им. Н.И.Вавилова. // Матер. III Съезда ВОГиС, (6-12 июня 2004, Москва). – М., 2004. – С. 87.

9. Антонова О.Ю., Рогозина Е.В., **Швачко Н.А.**, Исламшина А.Р., Большакова Е.И., Федорина Я.В., Чалая Н.А., Гавриленко Т.А. Молекулярный скрининг культурных и диких видов картофеля на устойчивость к вирусам X и Y. // Матер. V Съезда ВОГиС, (21-27 июня 2009, Москва). – Москва, 2009. – С. 171.

10. Гавриленко Т.А., Антонова О.Ю., Овчинникова А.Б., Новикова Л.Ю., Крылова Е.А., Мироненко Н.В., **Швачко Н.А.**, Исламшина А., Федорина Я.В., Киру С.Д., Костина Л.И., Спунер Д. Изучение генетического разнообразия культурных и родственных диких видов картофеля из коллекции ВИР им.Н.И.Вавилова на основе анализа полиморфизма микросателлитных последовательностей ядерной ДНК и анализа изменчивости морфологических признаков. // Матер. V Съезда ВОГиС, (21-27 июня 2009, Москва). – М., 2009. – С. 201.

11. Антонова О., Федорина Я., Костина Л., **Швачко Н.**, Гавриленко Т. Мониторинг генетического разнообразия сортов культурного картофеля *Solanum Tuberosum* L., на основе анализа полиморфизма последовательностей ядерной и органелльной ДНК. // Матер. конференции «Ориентированные фундаментальные исследования и их реализация в АПК России» (21-24 апреля, 2008, С.-Петербург). – С.-Петербург, 2008. – С. 21-22.

12. **Швачко Н.А.** Антонова О.Ю., Новикова Л.Ю., Костина Л.И., Гавриленко Т.А. Генотипирование сортов картофеля с использованием ПЦР анализа полиморфизма ядерных микросателлитов. // Матер. Всероссийской научно- координационной конференции, посвященной 100- летию со дня рождения академика К.З. Будина «Использование мировых генетических ресурсов ВИР в создании сортов картофеля нового поколения». – С.-Петербург, 2009. – С. 260.

13. Гавриленко Т., Антонова О., **Швачко Н.**, Овчинникова А., Федорина Я., Новикова Л., Рогозина Е., Костина Л. Использование ДНК маркеров в изучении генетического разнообразия и генотипировании сортов картофеля из коллекции ВНИИР им. Н.И.Вавилова. // Матер. V Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва, 2009. – С.263.

14. Овчинникова А., Антонова О.Ю., Новикова Л.Ю., Крылова Е.А., Мироненко Н.В., **Швачко Н.А.**, Исламшина А.Р., Сmealова Т.Н., Киру С.Д., Костина Л.И., Спунер Д., Гавриленко Т.А.. Изучение генетического разнообразия картофеля из коллекции ВИР на основе анализа полиморфизма микросателлитов ядерной ДНК и анализа изменчивости морфологических признаков. // Матер. Всероссийской научно-координационной конференции, посвященной 100- летию со дня рождения академика К.З. Будина «Использование мировых генетических ресурсов ВИР в создании сортов картофеля нового поколения». – С.-Петербург, 2009. – С. 261-263.

15. Gavrilenko T. Antonova O., **Shvachko N.**, Kostina L. Diversity of nuclear, chloroplast and mitochondrial DNA in potato breeding cultivars and Chilean landraces (*Solanum tuberosum ssp. tuberosum*) Solanaceae. // VI Conference Genomics meets biodiversity". – 2006. – P. 226.

16. Kiru S.D., T.A. Gavrilenko, L.I. Kostina, E.V. Rogozina, O.Y. Antonova, E.V. Truskinov, **N.A. Shvachko**, E.A. Krylova, A.B. Smirnova. Conservation, evaluation and use in breeding of potato genetic diversity at the N.I. Vavilov institute of plant industry (VIR). // Potato production and innovative technologies. Ed. by Haverkort A. S., Anisimov B. V. – Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 2007. – P. 353-363.

17. Antonova O, Fedorina J., Rogozina E., Kostina L., **Shvachko N.**, Gavrilenko T. Nuclear and chloroplast DNA studies using PCR based markers of the genetic variation of a subset of Russian potato cultivars. Nuclear and chloroplast DNA studies using PCR based markers of the genetic variation of a subset of Russian potato cultivars. // 17-th Triennial Conference of the European Association for Potato Research (July 6-10, 2008, Brasov). – Romania, 2008. – P. 368-371.

18. Gavrilenko T., Antonova O., Ovchinnikova A., Novikova L., Krilova E., Mironenko N., Pendinen G., Smealova T., Islamshina A., **Shvachko N.**, Kiru S., Kostina L., Afanasenko O., Spooner D. A Microsatellite and Morphological Assessment of the Russian National Potato Collection. // Abstract Book of American Society of Plant Taxonomists (ASPT), 2009, August 23-29, Snowbird, Utah, US. – 2009. - P. 160.

19. **Shvachko N.**, Gavrilenko T. Cryopreservation of potato landraces from VIR collection. // Abstract Book of the 18th Triennial Conference of the European Association for Potato Research, 2011, July 24-29, Oulu, Finland. – 2011. – P. 198.

20. **Shvachko N.**, Gavrilenko T. Cryopreservation of potato landraces using droplet-vitrification method. // In Grapin A., Keller J., Lynch P., Panis B., Revilla A., Engelmann F. eds. Proc. COST Action 871 Cryopreservation of crop species in Europe Final meeting, Angers, 8-11 Feb. 2011. OPOCE, Luxembourg, in press.