

УДК 635.21:631.524.86:577.21

<https://doi.org/10.47612/0134-9740-2021-29-58-69>

**Н. В. Русецкий, В. А. Козлов, И. А. Михалькович, Д. В. Башко,
А. В. Кондратюк, А. В. Чашинский, Т. В. Семанюк**

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук

Беларусь по картофелеводству и плодоовощеводству»,

аг. Самохваловичи, Минский район

E-mail: nicrw@mail.ru; Wiko@mail.ru

СКРИНИНГ СЕЛЕКЦИОННОГО И КОЛЛЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА КАРТОФЕЛЯ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К М- И S-ВИРУСАМ С ПРИМЕНЕНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты исследований по оценке образцов картофеля, созданных в лаборатории генетики картофеля, и сортов, поддерживаемых в коллекционном питомнике РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларусь по картофелеводству и плодоовощеводству», на устойчивость к M- и S-вирусам, и выделению источников устойчивости к этим патогенам с применением ДНК-маркеров. По данным проведенных исследований выделен ряд устойчивых форм с наличием маркеров: SC878₈₈₅ к гену Gm, GP250₅₁₀, UBS822₁₀₇₉ к гену Rm и маркеров SCG17₃₂₁ и UBC811₆₆₀ к гену N_s, которые могут быть использованы в селекции картофеля на вирусоустойчивость.

Ключевые слова: картофель, образец, гибрид, M-вирус картофеля, S-вирус картофеля, ПЦР, ДНК-маркер, устойчивость.

ВВЕДЕНИЕ

Картофель, как культура вегетативно размножаемая, способен поражаться большим количеством различных вирусов, сохраняющихся и передающихся через клубневой посадочный материал. Ввиду большого разнообразия патогенов вирусной природы создание устойчивых к нескольким вирусам сортов является очень трудоемким процессом. Путь получения новых сортов картофеля – это гибридизация тетраплоидных гетерозигот. Следовательно, для гибридных популяций характерен широкий диапазон вариабельности и сложный характер расщепления оцениваемых признаков, что существенно затрудняет отбор генотипов с желаемой комбинацией генов хозяйственно ценных признаков, что, в свою очередь, предопределяет необходимость испытания больших объемов гибридных сеянцев [1]. При этом большинство применяемых в селекции картофеля методов испытания и отбора гибридов далеки от совершенства, так как основаны на фенотипической оценке генотипов, точность которой может быть подвержена действию средообразующих факторов. В особенности это относится к методам оценки признаков устойчивости к болезням и вредителям. Многие из них трудоемки и продолжительны во времени, недостаточно точны.

Как правило, выявление ДНК-маркеров генов устойчивости менее затратно по использованию трудовых и денежных ресурсов в сравнении с фенотипической

РАЗДЕЛ 2. ГЕНЕТИКА КАРТОФЕЛЯ

оценкой соответствующих признаков. Один из плюсов использования этого метода заключается в том, что его можно применять в любое время года вне зависимости от внешних условий [2–4].

Наибольшее значение применение ДНК-маркеров в селекции картофеля имеет при оценке исходного материала. Информация о наличии определенных хозяйствственно ценных генов, в частности, генов устойчивости к болезням и вредителям, позволяет оптимизировать подбор родительских форм, прогнозировать вероятность отбора обладающих желательными признаками сеянцев среди гибридов, полученных в результате их скрещивания. Применяя ДНК-технологии, можно значительно упростить пирамидирование в одном генотипе генов устойчивости к различным патогенам или пирамидирование генов устойчивости к одному патогену, но происходящих из разных источников [3, 5].

Объекты исследования: S-вирус картофеля (SBK, Potato virus S, PVS) и M-вирус картофеля (MBK, Potato virus M, PVM) относятся к роду *Carlavirus*. Оба эти вируса способны передаваться как контактно-механическим путем, так и с помощью векторов – тлями, клопами и картофельной коровкой. В настоящий момент по степени распространенности на картофеле эти вирусы заняли лидирующие позиции в большинстве стран мира. В нашей республике, по данным мониторинга распространения вирусных болезней, проведенном в 2005–2010 гг., пораженность посадок картофеля хозяйств разных форм собственности в разрезе областей составляет: MBK – от 22,3 % по Гомельской до 72,9 % по Гродненской, SBK – от 32,8 % по Гомельской до 48,9 % по Витебской. По результатам исследований, проведенных в 2016–2020 гг., получены следующие данные: MBK – от 28,6 % по Витебской до 57,2 % по Гомельской, SBK – от 32,0 % по Гродненской до 55,2 % по Витебской.

В ряде своих работ мы указывали на широкое распространение S- и M-вирусов и необходимость вовлечения в селекционный процесс источников устойчивости к этим патогенам [6, 7]. Вредоносность этих вирусов варьирует в широких пределах. Так, по данным одних авторов, потери урожая при смешанной инфекции S- и X-вирусов составляют от 21,1 до 83,8 % [8]. По данным других – не превышают 10,0–20,0 % [9]. Вирус S чаще всего находится в растениях картофеля в латентной (скрытой) форме. Основными симптомами его проявления на ботве являются: при поражении сильными штаммами – общий хлороз, отставание в росте, яркая мозаика, крапчатость; слабыми – посветление, слабая мозаичность и бронзовость листьев.

M-вирус картофеля более вредоносен и наряду с Y- и L-вирусами включен в Перечень особо опасных вредителей, болезней растений и сорняков Республики Беларусь [10]. В Республике Польша PVM внесен в список вирусных патогенов, вызывающих тяжелые вирусные заболевания. Симптомы поражения M-вирусом чаще всего проявляются в виде мозаичного закручивания листьев. Кроме того, могут проявляться симптомы в виде пятнистости, мозаики, морщинистости листьев, некроза черешков и стеблей, закручивания и деформации листьев, степень проявления которых варьирует от легкой до тяжелой [11, 12]. При сильной реакции на M-вирус может наблюдаться деформация листьев и торможение роста растений [13]. Потери урожая от заболевания, вызываемого M-вирусом, варьируют от 10 до 75 % [14]. Наибольший ущерб отмечен при поражении сильным штаммом вируса очень чувствительных сортов картофеля.

Самым надежным и экологически безопасным методом, позволяющим предотвратить риск распространения вирусной инфекции и снизить степень ее вредоносности, является создание устойчивых сортов.

Степень устойчивости сортов картофеля к M-вирусу, возделываемых во многих странах мира, невысока и слабо дифференцирована: от 2 до 5 баллов (по шкале 1–9,

РАЗДЕЛ 2. ГЕНЕТИКА КАРТОФЕЛЯ

где 9 – крайне устойчив). Исключение составляют сорта польской селекции: Triada, Korona и Kuklik, которые показывают устойчивость к PVM в полевых условиях (оценка 7 баллов) [15].

Для успешной селекции необходимым условием является наличие доноров устойчивости к патогену с эффективными генами, контролирующими этот признак. Сложность создания устойчивых к M- и S-вирусам исходных форм и сортов в первую очередь обусловлена отсутствием или незначительным количеством надежных генетических источников этого признака как среди диких видов, так и внутри вида *Solanum tuberosum*.

По литературным данным, до настоящего времени у картофеля рода *Solanum* выявлено два типа доминантных генов устойчивости к PVM. Один из них ген *Rm*, отвечающий за гиперчувствительную некротическую реакцию (HS – hyper sensitivity), происходящий от *S. megistacrolobum* [16]. Второй ген *Gm* выявлен у некоторых образцов *S. gourlayi* и обеспечивает устойчивость к инфекции, связанную с медленным размножением и медленным системным распространением вируса в растениях [17, 18]. Помимо этого устойчивые к M-вирусу образцы были выделены среди видов *S. stoloniferum* и *S. microdontum* [19].

В селекции на устойчивость к S-вирусу в основном используется тип устойчивости, связанный со сверхчувствительной реакцией, которая была обнаружена у боливийской линии PI 258907 (*ssp andigena*) и обусловлена одним доминантным геном *Ns*. Получены сорта картофеля, содержащие этот ген, – Szignal, Fantasia, Adretta, Barycz, Klepa, Meduza, Omulew и др. [16].

Однако, несмотря на достигнутые успехи в этом направлении селекции, форм картофеля, устойчивых ко многим патогенам, адаптированных к определенным почвенно-климатическим условиям и обладающих комплексом хозяйствственно полезных признаков, недостаточно. Поэтому селекционный процесс в этом направлении является непрерывным и постоянным.

В последние годы для целенаправленного отбора генотипов растений с требуемыми характеристиками во многих странах мира разрабатывают и используют молекулярные маркеры генов устойчивости. В отношении доминантного гена *Ns* устойчивости к S-вирусу W. Marczewski, K. Ostrowska, E. Zimnoch-Guzowska [20] идентифицировали 4 RAPD-маркера, сцепленных с этим геном. С помощью STS-маркера GP126, CAPS-маркеров GP189 и CP16 (рестриктазы *HaeIII* и *HindIII* соответственно) была установлена локализация гена *Ns* в 8-й хромосоме [21]. На основе последовательности ISSR-маркера UBC811₆₆₀ был разработан сцепленный с геном *Ns* SCAR-маркер SC811₄₅₄ [22]. Однако K. Szajko и др. показали, что SCAR-маркер SC811₄₅₄ может амплифицироваться и в PVS-восприимчивых сортах картофеля. Для определения таких *Ns*-ложноположительных маркеров продукты ПЦР необходимо обработать рестриктазой *MboI* или *FokI* [23].

Для одновременного тестирования двух генов устойчивости *Ry-fsto* к Y-вирусу и *Ns* к PVS K. Witek и др. [24] разработали метод мультиплексной ПЦР на основе использования CAPS-маркеров GP122₅₆₄ и SC811₂₆₀ и рестриктаз EcoRV и *MboI*. Эффективность этой методики для использования в маркер-сопутствующей селекции была подтверждена на 55 сортах картофеля.

Молекулярные маркеры к генам устойчивости к PMV были разработаны W. Marczewski и др. [25]. Это ISSR-маркеры UBC878₉₆₂ и UBC864₈₁₆, которые были конвертированы в SCAR-маркеры 115 SC878₈₈₅ и SC864₈₁₆, сцепленные с *Gm* и *Rm* локусами соответственно. На близком расстоянии от гена *Rm* находится маркер UBC822₁₀₇₉,

РАЗДЕЛ 2. ГЕНЕТИКА КАРТОФЕЛЯ

а маркеры GP250₅₁₀ и GP283₃₂₀ расположены еще ближе к этому гену (на расстоянии 0,8 сМ). В исследованиях Е. А. Волуевич, Н. В. Павлючук [26] использование маркеров GP250₅₁₀, GP283₃₂₀ и UBC822₁₀₇₉ позволило выявить присутствие гена *Rm* в таких сортах белорусской селекции, как Аксамит, Атлант, Бриз, Ветразь, Дар, Дельфин, Дубрава, Живица, Журавинка, Каприз, Колорит, Криница, Манифест, Нептун, Одиссей, Орбита, Прамень, Скарб, Сузорье, Талисман, Уладар, Явар, Янка. Ген *Gm* был выявлен с помощью маркера SC878₈₈₅ у двух белорусских гибридов [26–28].

Целью проводимых исследований являлось выделение с применением методов ИФА и ПЦР генетических источников, имеющих в своем генотипе аллели, отвечающие за устойчивость к S- и M-вирусам картофеля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Материалом исследования служили селекционные образцы, созданные в лаборатории генетики картофеля Центра, а также сорта мирового генофонда картофеля.

Полевые опыты были заложены на опытном поле селекционного севооборота РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларусь по картофелеводству и плодоовоощеводству» в аг. Самохваловичи. Почва участка – дерново-подзолистая, среднесуглинистая, подстилаемая моренным суглинком. Предшественник – редька масличная на семена. Площадь опытного поля – 0,2 га.

В период вегетации проводили необходимые учеты и наблюдения по внешним симптомам развития вирусных болезней, а в фазу бутонизации – цветения растений картофеля – ИФА на содержание вирусной инфекции. Во время уборки осуществляли учет продуктивности, скороспелости (по фенологии), окраски и формы клубней, компактности гнезда, длины столонов и ряда других признаков согласно Методике исследований по культуре картофеля [29]. В послеуборочный период проводили определение содержания крахмала по удельному весу.

В зимне-весенний период в условиях климакамеры селекционно-гибридного модуля высаживали межвидовые гибриды и сорта коллекционного питомника. Образцы помещали в двухлитровые сосуды, наполненные торфяным субстратом. Осуществляли регулярный полив. В фазу от полных всходов до бутонизации проводили тестирование исследуемых образцов на содержание скрытой вирусной инфекции методом ИФА. Всего на устойчивость к вирусам было изучено 89 образцов, из них 20 сортов и образцов коллекции мирового генофонда и 69 гибридов, созданных в лаборатории генетики Центра.

Иммуноферментный анализ (ELISA) на наличие вирусной инфекции выполняли сотрудники лаборатории иммунодиагностики картофеля Центра согласно протоколам к диагностическим наборам.

Оценку родительских форм и гибридного селекционного материала картофеля на наличие ДНК-маркеров известных генов устойчивости к S-вирусу – *Ns*; к M-вирусу – *Gm* и *Rm* проводили в лаборатории генетики картофеля. Идентификацию доминантных аллелей генов *Ns*, *Gm* и *Rm* выполняли в рабочей коллекции выделенных ДНК.

Наличие гена *Gm*, отвечающего за устойчивость к M-вирусу картофеля, осуществляли при помощи SCAR-маркера SC878₈₈₅. Выявление второго гена устойчивости к MBK – *Rm* проводили с использованием двух маркеров – GP250₅₁₀ (CAPS) и UBC822₁₀₇₉ (ISSR). Идентификацию гена устойчивости к S-вирусу картофеля устанавливали с применением двух маркеров – SCAR-маркера SCG17₃₂₁ и ISSR-маркера UBC811₆₆₀ [22, 25].

ДНК образцов выделяли из зеленых свежесобранных листьев, взятых из среднего яруса куста. Выделение геномной ДНК из растений *in vivo* осуществляли с помощью наборов реагентов для выделения ДНК «Нуклеосорб» комплектация «С» производства

РАЗДЕЛ 2. ГЕНЕТИКА КАРТОФЕЛЯ

фирмы «Праймтех» (Республика Беларусь) согласно протоколу производителя. Качество полученной ДНК определяли проведением ПЦР-реакции с праймерами ВСН, являющимися внутренним положительным контролем, амплифицирующимся у любых образцов картофеля.

Реакцию проводили на амплификаторе Veriti (Applied Biosystems, США). Визуализацию продуктов амплификации осуществляли разделением в 2 %-м агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, с последующей регистрацией результатов с помощью оборудования системы гельдокументирования DOC-PRINT-VX2 (Германия).

Для приготовления реакционной смеси использовали готовую смесь для ПЦР-анализа Quick-load Taq 2X Master Mix (ОДО «Праймтех», Республика Беларусь), соответствующие праймеры (прямой и обратный), матрицу ДНК и деионизированную воду в количестве, необходимом для доведения объема смеси до рассчитанного. В состав Quick-load Taq 2X Master Mix входят все необходимые компоненты ПЦР: ДНК полимераза, dNTPs, Mg²⁺ и реакционный буфер, а также красители для непосредственного нанесения реакционной смеси на гель при проведении электрофоретического анализа. Использованные в работе праймеры синтезированы в ОДО «Праймтех».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

С целью оценки и выделения образцов картофеля, устойчивых к S- и M-вирусам, был проведен иммуноферментный анализ селекционных гибридов и сортов мирового генофонда картофеля, включающий 89 образцов, на наличие пораженности их PVS и PVM. Для этого в зимне-весенний период были осуществлены подбор и высадка в условиях климакамеры селекционно-гибридного модуля межвидовых гибридов с учетом предварительных данных об относительной устойчивости к S- и/или M-вирусам по результатам полевых испытаний и диагностики методом иммуноферментного анализа. По данным ИФА выявлено 45 высокоустойчивых образцов: к S-вирусу – 24, к M-вирусу – 11, к S+M-вирусам – 10 (табл. 1).

Детекцию генов *Gm* и *Rm* устойчивости к вирусу картофеля M и гена *Ns*, устойчивости к S-вирусу картофеля осуществляли с использованием молекулярных маркеров, разработанных W. Marczewski и др. (табл. 2).

У отобранных по устойчивости к исследуемым вирусам форм картофеля была выделена ДНК с целью определения наличия генов устойчивости (*Ns*, *Gm* и *Rm*) со специфическими маркерами к S- и M-вирусам.

Оценку образцов на наличие ПЦР-маркеров генов устойчивости проводили среди ДНК, выделенных из биологического материала селекционных гибридов и сортов мирового генофонда картофеля.

Присутствие гена *Ns*, отвечающего за устойчивость к S-вирусу картофеля, устанавливали с помощью SCAR-маркера SCG17₃₂₁. Определляемый маркер выявлен у 75,3 % изучаемых образцов картофеля. В качестве второго маркера для идентификации гена устойчивости *Ns* использовали ISSR-маркер UBC811₆₆₀. Наличие двух маркеров генов (SCG17₃₂₁ и UBC811₆₆₀) отмечено у 45 образцов, что составляет 66,2 % от изученных по данному признаку образцов.

Для выявления генов, отвечающих за устойчивость к M-вирусу, использовали SCAR-маркер SC878₈₈₅, CAPS-маркер GP250₅₁₀ и ISSR-маркер UBC822₁₀₇₉. На рисунке в качестве примера приведен фрагмент результата амплификации с праймером UBC822₁₀₇₉ для определения гена *Rm* чувствительности к вирусу M.

Данные по молекулярному скринингу генов, отвечающих за устойчивость к S- и M-вирусам, у исследуемых образцов картофеля представлены в таблице 3.

РАЗДЕЛ 2. ГЕНЕТИКА КАРТОФЕЛЯ

Таблица 1 – Результаты тестирования межвидовых гибридов на содержание латентной вирусной инфекции, ИФА, 2021 г.

Образец	Наличие устойчивости к вирусам		Образец	Наличие устойчивости к вирусам	
	SBK	MBK		SBK	MBK
166-14-7	+	-	83ya13-4	+	-
142-14-40	+	-	кc159x13-6	+	+
137-14-28	+	-	кc1x13-13	+	+
155-13-20	+	-	кc82y13-4	+	+
144-14-6	+	+	7mya15-3	+	+
70-15-2	+	-	127mya15-8	-	+
241-15-2	+	-	108y15-19	+	-
70-15-2	-	+	195ya15-11	-	+
138-14-4	-	+	60ум15-7	-	+
162-13-1	-	+	60ум15-1	-	+
166-13-1	-	+	7mya15-9	+	-
201306-12	+	-	43y15-7	+	-
201317-52	+	-	кc22y13-8	+	-
201502-2	+	-	195ya15-8	+	+
01503-3	+	-	180y15-12	+	-
215.50-20	+	-	215.45-14	+	-
215.211-1	-	+	215.110-3	+	-
нд.214/11-1	+	-	13/24-20	+	-
215.64-9	-	+	13/40-15	+	+
215.230-19	+	+	214.10-13-13	+	+
215.103-13	-	+	215.30-10	+	-
11/89-9	+	+	215.20-10	+	-
215.309-11	+	-	-	-	-

Примечание. «+» – наличие устойчивости; «-» – отсутствие устойчивости.

Таблица 2 – Характеристика маркеров генов устойчивости картофеля к S- и M-вирусам

Ген	Ви- рус	Название маркера	Тип марке- ра	Нуклеотидная последовательность праймера 5'→3'	Источник
<i>Gm</i>	PVM	SC878 ₈₈₅	SCAR	F: GGATGGATGGATGAGGAGGAACT R: CCGACTAGCGATTGGATGC	W. Marczewski и др. (2006)
<i>Rm</i>	PVM	GP250 ₅₁₀	CAPS	F: AGTTCAACACCACTAGGAC R: GACATCAAGTTACCTATGAC	
<i>Rm</i>	PVM	UBC822 ₁₀₇₉	ISSR	TCTCTCTCTCTCTCA	
<i>Ns</i>	PVS	SCG17 ₃₂₁	SCAR	F: ACGACCGACACTCAAATTGTACA R: ACGACCGACAAGAGGACCAAGGGAATAAC	W. Marczewski и др. (2001)
<i>Ns</i>	PVS	UBC811 ₆₆₀	ISSR	GAGAGAGAGAGAGAGAC	

Рисунок – Фрагмент результата амплификации с праймером UBC822₁₀₇₉для определения гена *Rm* сверхчувствительности к вирусу М

Примечание. М – маркер молекулярного веса; размер маркерного фрагмента 1079 п. н.

Таблица 3 – Результаты молекулярного скрининга генов, отвечающих за устойчивость к S- и M-вирусам картофеля, 2021 г.

№ п/п	Сорт, гибрид	Наличие маркеров к генам устойчивости к вирусам				
		к гену <i>Ns</i> (PVS)		к гену <i>Gm</i> (PVM)	к гену <i>Rm</i> (PVM)	
		SCG17 ₃₂₁	UBC811 ₆₆₀	SC878 ₈₈₅	GP250 ₅₁₀	UBC822 ₁₀₇₉
1	001125-85	+	-	Н/д	Н/д	Н/д
2	01501-6	+	+	Н/д	Н/д	Н/д
3	01503-3	+	+	Н/д	Н/д	Н/д
4	127mya15-4	+	-	-	-	+
5	127mya15-8	Н/д	Н/д	-	-	+
6	13/40-10	+	+	Н/д	Н/д	Н/д
7	13/40-6	+	+	+	-	-
8	131ya15-8	+	+	-	+	+
9	136ya15-1	+	+	+	+	-
10	137-14-28	+	-	Н/д	Н/д	Н/д
11	138-14-4	Н/д	Н/д	+	+	-
12	139ya15-2	+	+	+	±	+
13	142-14-40	+	+	Н/д	Н/д	Н/д
14	144-14-6	+	+	+	-	-
15	162-13-1	Н/д	Н/д	-	+	+
16	166-14-7	+	+	Н/д	Н/д	Н/д
17	16Б03-17	+	-	Н/д	Н/д	Н/д
18	16Б03-9	+	-	Н/д	Н/д	Н/д
19	16Б08-4	+	+	Н/д	Н/д	Н/д
20	16П15-5	+	+	Н/д	Н/д	Н/д
21	180y15-12	+	+	Н/д	Н/д	Н/д
22	181ya13-4	+	+	-	+	+
23	183-15-6	Н/д	Н/д	+	-	+
24	194ya15-2	+	+	Н/д	Н/д	Н/д

РАЗДЕЛ 2. ГЕНЕТИКА КАРТОФЕЛЯ

Продолжение таблицы 3

№ п/п	Сорт, гибрид	Наличие маркеров к генам устойчивости к вирусам				
		к гену <i>Ns</i> (PVS)		к гену <i>Gm</i> (PVM)	к гену <i>Rm</i> (PVM)	
		SCG17 ₃₂₁	UBC811 ₆₆₀	SC878 ₈₈₅	GP250 ₅₁₀	UBC822 ₁₀₇₉
25	195ya15-11	H/д	H/д	+	-	+
26	195ya15-36	+	+	-	-	+
27	195ya15-8	+	-	+	-	+
28	201.303-14	+	+	H/д	H/д	H/д
29	201306-12	+	+	-	+	+
30	201317-52	+	+	H/д	H/д	H/д
31	201502-2	+	+	H/д	H/д	H/д
32	2024.3-43-6	+	-	H/д	H/д	H/д
33	2-11-19	+	+	H/д	H/д	H/д
34	213.49a-5	H/д	H/д	-	-	+
35	214.25-13-1	H/д	H/д	+	+	-
36	214/11-1	+	+	H/д	H/д	H/д
37	263-15-7	+	+	H/д	H/д	H/д
38	274-15-3	+	+	H/д	H/д	H/д
39	288-15-4	H/д	H/д	+	+	+
40	3-12-4	+	+	H/д	H/д	H/д
41	40xy14-11	H/д	H/д	+	+	+
42	46ya13-8	+	+	H/д	H/д	H/д
43	4xys14-11	+	+	+	+	+
44	503-22	+	+	H/д	H/д	H/д
45	50ya15-6	+	+	+	-	-
46	5бум15-3	H/д	H/д	+	+	+
47	60ум15-1	H/д	H/д	+	-	+
48	60ум15-4	H/д	H/д	H/д	H/д	+
49	60ум15-6	H/д	H/д	+	-	+
50	60ум15-7	H/д	H/д	+	-	+
51	61y14-2	H/д	H/д	+	-	+
52	66-06-12	+	-	H/д	H/д	H/д
53	70-15-2	+	-	+	-	+
54	70ум15-5	H/д	H/д	+	+	+
55	7муя15-1	+	+	H/д	H/д	H/д
56	7муя15-3	+	+	+	-	+
57	7муя15-9	+	-	H/д	H/д	H/д
58	83ya13-4	+	-	H/д	H/д	H/д
59	9-10-11	+	+	-	+	-
60	94y15-5	+	-	H/д	H/д	H/д
61	Корона (контроль)	H/д	H/д	+	-	+
62	Omulew (контроль)	+	+	H/д	H/д	H/д
63	Антонина	+	+	-	-	+
64	Букет	+	+	-	+	+
65	ВИР65	+	+	H/д	H/д	H/д
66	Зарево	+	+	H/д	H/д	H/д
67	Звездаль	+	-	H/д	H/д	H/д
68	К 243446-3	+	-	H/д	H/д	H/д
69	Корона (контроль)	H/д	H/д	+	-	+
70	Кристалл	H/д	H/д	+	+	+
71	Kc195x13-6	-	-	-	-	-

РАЗДЕЛ 2. ГЕНЕТИКА КАРТОФЕЛЯ

Окончание таблицы 3

№ п/п	Сорт, гибрид	Наличие маркеров к генам устойчивости к вирусам				
		к гену <i>Ns</i> (PVS)		к гену <i>Gm</i> (PVM)	к гену <i>Rm</i> (PVM)	
		SCG17 ₃₂₁	UBC811 ₆₆₀	SC878 ₈₈₅	GP250 ₅₁₀	UBC822 ₁₀₇₉
72	Kc1x13-13	+	-	-	-	+
73	Kc22y13-8	+	+	H/d	H/d	H/d
74	Kc3ya15-12	+	-	+	-	+
75	Kc44ya15-5	+	-	+	+	
76	Kc82y13-4	+	-	-	+	+
77	Kc8ya15-10	+	+	H/d	H/d	H/d
78	Kc8ya15-5	+	+	H/d	H/d	H/d
79	Лазарь	+	-	H/d	H/d	H/d
80	Мираж	H/d	H/d	+	+	-
81	H165-2	+	-	+	+	+
82	Накра	+	+	H/d	H/d	H/d
83	Нальчинский	H/d	H/d	-	-	+
84	Нур-Алем	+	+	-	+	+
85	Сеним	+	-	-	+	+
86	Сиреневый туман	+	+	+	+	+
87	Сокольский	+	-	H/d	H/d	H/d
88	Триада (контроль)	+	+	H/d	H/d	H/d
89	Янка	+	+	-	+	+

Примечание. «+» – наличие устойчивости; «-» – отсутствие устойчивости; н/д – не диагностировали.

Наличие в геноме двух ДНК-маркеров SC878₈₈₅ и UBS822₁₀₇₉, ассоциированных с изучаемым признаком устойчивости к МВК, было отмечено в 21 образце, или 41,2 % от изучаемой выборки. Маркер GP250₅₁₀ к гену устойчивости *Rm* был определен в 23 образцах картофеля, что составляет 25,8 % от всех изученных.

Присутствие одновременно S- и M-ДНК-маркеров идентифицировано в 25 гибридах (28,0 %). Наличие четырех маркеров (SCG17₃₂₁, UBC811₆₆₀, SC878₈₈₅ и UBC822₁₀₇₉) выявлено в гибридах 139ya15-2 и 7mya15-3 (2,2 %). Все пять изучаемых маркеров отмечены лишь для двух образцов: гибрида 4xys14-11 и сорта Сиреневый туман.

По данным исследований, выделено более 30 образцов картофеля, которые использованы в качестве родительских форм в гибридизации для получения гибридного материала с комплексной устойчивостью к изучаемым вирусам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований подобраны и высажены в условиях климатической камеры селекционно-гибридного модуля межвидовые гибриды с предварительными данными об относительной устойчивости к S- и/или M-вирусам, а также проведено их тестирование на содержание вирусов методом ИФА. По данным иммуноферментного анализа выявлено 45 высокоустойчивых образцов: к S-вирусу – 24, к M-вирусу – 11, к S+M-вирусам – 10.

Для обнаружения генов устойчивости *Gm*, *Rm* и *Ns* к S- и M-вирусам у свободных от вирусной инфекции образцов проведено выделение ДНК и осуществлен скрининг на наличие ПЦР-маркеров к соответствующим генам.

Присутствие гена *Ns*, отвечающего за устойчивость к S-вирусу картофеля, устанавливали с помощью SCAR-маркера SCG17₃₂₁. Определенный маркер выявлен у 75,3 % изучаемых образцов картофеля. В качестве второго маркера для идентификации гена

РАЗДЕЛ 2. ГЕНЕТИКА КАРТОФЕЛЯ

устойчивости *Ns* использовали ISSR-маркер UBC811₆₆₀. Наличие двух маркеров генов (SCG17₃₂₁ и UBC811₆₆₀) отмечено у 45 образцов, что составляет 66,2 % от изученных по данному вирусу образцов.

Для выявления генов, отвечающих за устойчивость к М-вирусу, использовали SCAR-маркер SC878₈₈₅ и ISSR-маркер UBC822₁₀₇₉. Наличие в геноме обоих ДНК-маркеров, ассоциированных с изучаемым признаком устойчивости к МВК, было отмечено в 21 образце, или 41,2 % от изучаемой выборки.

Присутствие одновременно S- и М-ДНК-маркеров отмечено в 25 гибридах (28,0 %), четырех маркеров – в гибридах 139уа15-2 и 7муа15-3 (2,2 %). Все пять изучаемых маркеров определены лишь для двух образцов: гибрида 4xys14-11 и сорта Сиреневый туман.

Исходя из полученных результатов по оценке исследуемых образцов на устойчивость к S- и M-вирусам и наличию у них соответствующих признаку маркеров было выделено более 20 родительских форм, которые были вовлечены в гибридизацию для получения гибридов, устойчивых к комплексу M- и S-вирусов.

Список литературы

1. Генетические основы селекции растений : в 4 т. / под науч. ред. А. В. Кильчевского, Л. В. Хотылевой. – Т. 2 Частная генетика растений. Картофель / А. П. Ермишин, Е. В. Воронкова, В. А. Козлов. – Минск : Беларусь. наука, 2010. – С. 156–234.
2. Gebhardt, Ch. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome / Ch. Gebhardt, J. P. T. Valkonen // Ann. Rev. Phytopathol. – 2001. – Vol. 39. – P. 79–102.
3. Solomon-Blackburn, R. M. Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a traditional and molecular approaches / R. M. Solomon-Blackburn, H. Barker // Heredity. – 2001. – Vol. 86. – P. 17–35.
4. Barone, A. Molecular marker-assisted selection for potato breeding / A. Barone // Am. J. Potato Res. – 2004. – Vol. 81. – P. 111–117.
5. Росс, X. Селекция картофеля. Проблемы и перспективы : пер. с англ. / X. Росс. – М. : Агропромиздат, 1989. – 183 с.
6. Русецкий, Н. В. Оценка исходного материала картофеля на иммунитет к вирусам картофеля / Н. В. Русецкий // Картофелеводство : сб. науч. тр. / Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларусь по картофелеводству и плодоовоощеводству ; редкол.: С. А. Турко (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2018. – Т. 26. – С. 101–111.
7. Русецкий, Н. В. Испытание селекционного материала картофеля на полевую устойчивость к вирусным болезням / Н. В. Русецкий // Картофелеводство : сб. науч. тр. / Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларусь по картофелеводству и плодоовоощеводству ; редкол.: С. А. Турко (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2016. – Т. 24. – С. 115–122.
8. Круглова, Д. И. Вирусная инфекция и продуктивность растений картофеля / Д. И. Круглова // Овощеводство и садоводство в Западной Сибири : науч. тр. / Омский с.-х. ин-т им. С. М. Кирова. – Омск, 1982. – С. 21–25.
9. Павлова, Е. А. Диагностика скрытой вирусной инфекции картофеля – важный этап семеноводства / Е. А. Павлова // Защита и карантин растений. – 2014. – № 2. – С. 15–16.
10. Об утверждении перечня особо опасных вредителей, болезней растений и сорняков [Электронный ресурс] : постановление М-ва сельского хоз-ва и прод. Респ. Беларусь, 22 авг. 2006 г., № 48 // Государственный реестр СЗР и удобрений / ГУ «Главная государственная инспекция по семеноводству, карантину и защите растений». – Минск, 2006.
11. Kowalska, A. Differences among isolates of potato virus M and potato virus S / A. Kowalska // Phytopathol. Z. – 1978. – Vol. 79. – P. 385–399.

РАЗДЕЛ 2. ГЕНЕТИКА КАРТОФЕЛЯ

12. Wild *Solanum* species as resistance against different pathogens of potato / J. I. Ruiz de Galarreta [et al.] // Potato Res. – 1998. – Vol. 41. – P. 57–68.
13. Kostiw, M. The occurrence of major potato viruses in Poland / M. Kostiw // J. of Plant Protection Res. – 2011. – Vol. 51, № 3. – P. 204–209.
14. The reaction to virus infection of potato cultivars from the Polish National List in 2010 / M. Chrzanowska [et al.] // Biuletyn Instytutu hodowli i aklimatyzacji roślin. – 2011. – NR 260/261. – P. 309–324.
15. Zagorska, M. Analysis of the results of studies conducted in 1973–2005 on reaction of potato cultivars to *Potato virus M* / M. Zagorska, M. Chrzanowska // Biuletyn instytutu hodowli i aklimatyzacji roślin. – 2007. – NR 243. – P. 227–234.
16. Dziewonska, M. Necrotic reaction to *Potato virus M* in *Solanum stoloniferum* and *Solanum megistacrolobum* / M. Dziewonska, K. Ostrowska // Phytopathol. Zeitschr. – 1977. – Vol. 88. – P. 172–179.
17. Reaction of *Solanum gourlayi* and its hybrids with *S. tuberosum* to potato virus M (PVM) / M. Was [et al.] // Phytopathol. Zeitschr. – 1980. – Vol. 97. – P. 186–191.
18. Swiezynski, K. M. Inheritance of resistance to potato virus M found in *Solanum gourlayi* Haw / K. M. Swiezynski, M. A. Dziewonska, K. Ostrowska // Genet. Pol. – 1981. – Vol. 22, № 1. – P. 1–8.
19. Swiezynski, K. Parental line breeding in potatoes / K. Swiezynski // Acta biol. ingosl. Ser. F. Suppl. Beogard. – 1983. – № 3. – P. 99–112.
20. Marczewski, W. Identification of RAPD markers linked to the *Ns* locus in potato / W. Marczewski, K. Ostrowska, E. Zimnoch-Guzowska // Plant Breeding. – 1998. – Vol. 117. – P. 88–90.
21. Marczewski, W. The *Potato virus S* resistance gene *Ns* maps to potato chromosome VIII / W. Marczewski, J. Hennig, C. Gebhardt // Theoretical and Applied Genetics. – 2002. – Vol. 105. – P. 564–567.
22. Marczewski, W. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for the *Ns* resistance gene in potato (*Solanum tuberosum* L.) / W. Marczewski // J. Appl. Genet. – 2001. – Vol. 42, № 2. – P. 139–144.
23. Endonuclease restriction of SCAR amplicons SC811 is required to identify *Ns*-false-positive markers in PVS-susceptible potato cultivars / K. Szajko [et al.] // J. Appl. Genet. – 2008. – Vol. 49, № 1. – P. 45–47.
24. A _multiplex PCR approach to simultaneously genotype potato towards the resistance alleles *Ry-fsto* and *Ns* / K. Witek [et al.] // Mol. Breeding. – 2006. – Vol. 18. – P. 273–275.
25. Marczewski, W. Potato chromosomes IX and XI carry genes for resistance to *Potato virus M* / W. Marczewski [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2006. – Vol. 112. – P. 1232–1238.
26. Волуевич, Е. А. Отбор устойчивых к М-вирусу генотипов картофеля (*Solanum tuberosum*) с помощью ПЦР / Е. А. Волуевич, Н. В. Павлючук // Докл. НАН Беларуси. – 2014. – Т. 58, № 2. – С. 93–96.
27. Методы ПЦР-детекции генов устойчивости к Y- и S-вирусам картофеля / Е. А. Волуевич [и др.] ; М-во сельского хоз-ва и прод. Респ. Беларусь, НАН Беларуси, Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству. – Минск : ИООО «Право и экономика», 2013. – 59 с.
28. Отбор генотипов картофеля, устойчивых к М-вирусу, с использованием молекулярных маркеров / Е. А. Волуевич [и др.] // Картофелеводство : сб. науч. тр. / Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству. – Минск, 2014. – Т. 22 – С. 13–23.

29. Методика исследования по культуре картофеля. – М. : Колос, 1967. – 225 с.

Поступила в редакцию 20.10.2021 г.

N. V. RUSETSKIY, V. A. KOZLOV, I. A. MIHALKOVICH,
D. V. BASHKO, A. V. KONDRATYUK, A. V. CHASHINSKIY,
T. V. SEMANYUK

**SCREENING OF POTATO SELECTIVE AND COLLECTING
MATERIAL FOR RESISTANCE TO PVM AND PVS USING
DNA MARKERS**

SUMMARY

The article presents the research results on the assessment of potato samples that were created in the laboratory of potato genetics and varieties that are cultivated in the collection nursery of RUE «Scientific and Practical Center of the NAS of Belarus for Potato, Vegetable and Fruit Growing», for resistance to PVM and PVS, and detection of resistance sources to these pathogens with the use of DNA markers. Based on the research results, a number of stable forms was found with the following markers: SC878₈₈₅ to the Gm gene, GP250₅₁₀, UBS822₁₀₇₉ to the Rm gene and markers SCG17₃₂₁ and UBC811₆₆₀ to the N_s gene, which can be used in potato selection for virus resistance.

Key words: potatoes, sample, hybrid, PVM, PVS, PCR, DNA-marker, resistance.