

РАЗДЕЛ 2

ИСХОДНЫЙ МАТЕРИАЛ

УДК 635.21:575.222.2.72:577.21

**Е.В. Воронкова, Н.В. Павлючук, Ю.В. Полюхович, О.Н. Гукасян,
В.М. Жарич, В.И. Лукша, А.П. Ермишин**

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», г. Минск

E-mail: E.Voronkova@igc.by

УСТОЙЧИВОСТЬ К Y-ВИРУСУ, ИНТРОГРЕССИРОВАННАЯ В ДИПЛОИДНЫЕ МЕЖВИДОВЫЕ ГИБРИДЫ ОТ *SOLANUM STOLONIFERUM*

РЕЗЮМЕ

*С помощью иммуноферментного анализа после искусственного заражения Y-вирусом картофеля была оценена коллекция из 240 межвидовых диплоидных гибридов картофеля, полученных на основе мексиканского аллотетраплоидного вида *Solanum stoloniferum*. Было показано, что среди них может быть отобран селекционный материал с высокой устойчивостью к вирусной инфекции, которая стабильно передается потомству при беккроссировании дигаплоидами культурного картофеля. Экспериментально подтвержден моногенный характер наследования признака «экстремальная резистентность к обычному и некротическому штаммам PVY», передающихся межвидовым гибридам от *S. stoloniferum*. Такой характер наследования признака позволит в дальнейшем использовать полученные расщепляющиеся популяции гибридов на основе *S. stoloniferum* для маркирования нового фактора экстремальной устойчивости к PVY от этого вида картофеля.*

Ключевые слова: картофель, *Solanum stoloniferum* Schltdt., диплоидные межвидовые гибриды, устойчивость к Y-вирусу, ИФА, гены экстремальной устойчивости (ER-гены), расщепление.

ВВЕДЕНИЕ

Существенное снижение урожайности и качества картофеля во многих случаях связано с распространением вирусных заболеваний. В частности, высокой вредоносностью отличаются вирусы картофеля Y, A, S, V из рода *Potyvirus* [1–6]. Среди них особое место занимает Y-вирус картофеля (PVY). По мнению ведущих специалистов мира в области вирусологии растений (по данным опроса журнала *Molecular Plant Pathology*), он занимает пятую позицию среди вирусов растений по экономической и научной значимости, что определяется несколькими причинами [4]. По данным ряда авторов, потери

урожая клубней у пораженных PVY растений могут составлять до 80–90 % [7]. Кроме того, для него характерна широчайшая распространенность в мире и высокое генетическое разнообразие выделенных изолятов, что усугубляет его патогенность [6, 8]. Проблему также осложняет наличие нескольких векторов переноса инфекции: возможно распространение вирусной инфекции посредством клубней при репродукции и размножении семенного картофеля и распространение в результате переноса сосущими насекомыми [1, 4, 6, 9]. Проблему борьбы с вирусной инфекцией не удастся решить в полной мере путем использования комплекса передовых агротехнических мероприятий, требующих огромных финансовых затрат на получение чистой от вируса семенной продукции и контроля насекомых-вредителей. В то же время поиск новых генов устойчивости и использование приемов маркер-ассоциированной селекции могли бы способствовать повышению эффективности селекционного процесса и снижению затрат на создание новых высокоустойчивых сортов [2, 3, 5].

В настоящее время известно более 10 генов устойчивости к PVY, часть из которых клонирована и картирована [1, 2, 9–16]. Часть из них представляют собой гены гиперчувствительности (HS – hyper sensitivity), выявленные в разных сортах культурного картофеля и в некоторых диких видах. HS-гены обеспечивают устойчивость только к некоторым из известных в настоящее время штаммов PVY. В то же время высокая вариабельность PVY, его способность к достаточно быстрому мутированию и/или рекомбинации ведет к возникновению новых штаммов вируса, преодолевающих устойчивость, представленную у сортов картофеля, используемых в различных регионах мира [4, 6, 8, 10, 17]. Отмечено возникновение новых симптомов заболевания, повышающих экономический ущерб от потерь урожая при выращивании и хранении картофеля [6–8, 17].

Повысить устойчивость картофеля к PVY, обеспечить долговременную устойчивость к широкому спектру штаммов возможно, по мнению ряда авторов, при использовании в селекции генов так называемой экстремальной (крайней) устойчивости (ER – extra resistance) и их пирамидированию в одном генотипе [2, 3, 11, 17]. Гены экстремальной устойчивости выявлены у нескольких диких видов картофеля, в том числе у аллотетраплоидного мексиканского вида *Solanum stoloniferum* Schltdt., известного также как источник генов устойчивости к X, A и V-вирусам картофеля и высокой устойчивости к фитофторозу [1, 11, 18, 19]. Хотя генетический материал этого вида используется в селекции с середины XX-го в. и представлен у многих сортов, в силу репродуктивных ограничений, возникающих при гибридизации аллотетраплоидного *S. stoloniferum* и автотетраплоидного *S. tuberosum* и происходящей из этой сложности интрогрессии генов *S. stoloniferum* к культурному картофелю, он не отличается большим разнообразием [10–12, 20]. В настоящее время клонированы только один или два гена экстремальной устойчивости к PVY [12, 15, 16]. В то же время, согласно исследованиям,

проведенным G. Cockerham, имеется, как минимум, три гена (или аллельных формы), обеспечивающих высокую устойчивость к Y-вирусу с различным фенотипическим проявлением признака (сочетание одновременной устойчивости к PVY с устойчивостью к другим потивирусам – PVA и/ или PVV) [10]. Таким образом, расширение генетического разнообразия *S. stoloniferum* в селекционном материале картофеля способствовало бы более эффективно использованию селекционно-ценных генов этого вида для создания сортов с опережающей появлению новых штаммов экстремальной устойчивостью к PVY и другим потивирусам.

В лаборатории генетики картофеля ГНУ «Институт генетики и цитологии» был разработан ряд новых методов преодоления межвидовых репродуктивных барьеров, благодаря чему были получены уникальные диплоидные межвидовые гибриды картофеля на основе аллотетраплоидных видов, в том числе гибриды на основе *S. stoloniferum* [21]. Для того чтобы эффективно использовать в селекции полученный исходный материал, необходимо оценить уровень интрогрессии генетического материала *S. stoloniferum* в культурный картофель, изучить генетический контроль выявленного признака устойчивости к Y-вирусу и идентифицировать гены, отвечающие за его формирование. Результатом этих исследований должно стать создание молекулярных маркеров, удобных для использования в селекционном процессе для идентификации новых генов устойчивости в исходном материале. В данной работе представлены результаты оценки устойчивости диплоидных межвидовых гибридов (BC1 и BC2) между *S. stoloniferum* и дигаплоидами *S. tuberosum* к Y-вирусу картофеля, основанные на данных иммуноферментного анализа (ИФА) при искусственном заражении растений, и анализ наследования признака устойчивости в специально созданных расщепляющихся по этому признаку популяциях гибридов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Растения картофеля выращивали на поле экспериментальной базы ГНУ «Институт генетики и цитологии». В 2007 и 2008 гг. проводили оценку устойчивости клубневого поколения межвидовых гибридов BC1 и BC2, полученных на основе *S. stoloniferum*. В качестве инфектора использовали растения картофеля сорта Зарница с показателями оптической плотности при ИФА 0,4–0,6. Осуществляли принудительное двукратное заражение механической инокуляцией соком инфектора в условиях открытого грунта. Для оценки устойчивости к PVX специально заражение гибридов на основе *S. stoloniferum* не проводили.

Для изучения наследуемости признака «экстремальная устойчивость к PVY» межвидовых гибридов клубневое поколение двух специально созданных расщепляющихся популяций, полученных при скрещивании контрастных по проявлению признака гибридов BC1 (sto × tbr) × tbr, заражали в 2010 г. и оценивали с помощью ИФА в 2011–2012 гг. Генотипы популяции IGC 08/13.n

(87 генотипов), полученной при опылении высокоустойчивого к PVY гибрида IGC 02/183.17 неустойчивым к данному вирусу гибридом IGC 02/185.1 заражали высокоагрессивным штаммом Y⁰. Генотипы популяции IGC 08/14.n (84 генотипа), полученной при скрещивании высокоустойчивого гибрида IGC 02/183.17 с неустойчивым гибридом с IGC 02/178.3, заражали некротическим штаммом Y^N. Для приготовления инокулюма штаммов PVY⁰ и PVY^N использовали свежесжатый сок из листьев соответствующих растений табака сорта Samsung, клон № 2 с показателем оптической плотности при иммуно-ферментном анализе, равном 0,3 ед. Инфекторы (листья с зараженных растений) были предоставлены лабораторией исходного материала РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодородию». Заражению способом механической инокуляции соком растений-инфекторов в условиях открытого грунта подвергали только гибриды, находившиеся в период заражения в подходящей фазе развития. Растения с поздними сроками появления всходов и потому сильно отстающие в росте и фазе развития от основной массы – браковали. Первое заражение осуществляли в фазу от 3–4 настоящих листьев, повторное – с интервалом в 10 дней от первого заражения.

Для осуществления иммуноферментного анализа использовали набор реагентов Всероссийского научно-исследовательского института картофельного хозяйства (ВНИИ КХ) РАСХН для идентификации Y-вируса картофеля (Коренево, Россия). Работу осуществляли согласно рекомендациям производителя [22]. Учет данных ИФА проводили с помощью фотометра Uniscan I (LabSistems), со светофильтром для длины волны 490 нм. Положительным контролем служил сок инфицированных растений сорта Росинка с показателем оптической плотности при ИФА более 2,0. Высокоустойчивыми считали растения, уровень накопления вирусных частиц в которых не превышал 0,01 единицы оптической плотности (ед. опт. пл.). При отборе неустойчивых образцов использовали пониженный порог 0,10 [16]. При оценке расщепления образцы делили на два типа: высоко (экстремально) устойчивые – с оптической плотностью не более 0,01 и прочие – с оптической плотностью выше 0,015.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение устойчивости к вирусной инфекции диплоидных межвидовых гибридов, полученных на основе аллотетраплоидного мексиканского вида *S. stoloniferum*, осуществляли в основном на уровне первого и второго бек-кроссных поколений, полученных при повторном опылении гибридов F₁ фертильными генотипами *S. tuberosum*. Часть гибридов происходила от опыления дигаплоидов *S. tuberosum* смесью пыльцы нескольких гибридов F₁ *S. stoloniferum* × *S. tuberosum*, полученных на основе разных генотипов *S. stoloniferum*. Оценку самих гибридов F₁ в большинстве случаев провести не удалось, так как они, как правило, при выращивании в условиях длинного

дня, что характерно для средних широт, отличались крайне слабым клубнеобразованием (у большинства клубни не завязывались при обильном формировании длинных столонов). Это не позволило нам репродуцировать гибриды F_1 в течение нескольких лет и получить достаточное количество клубней для проведения лабораторных и полевых тестов.

В 2007 и 2008 гг. по устойчивости к PVY было проанализировано в общей сложности 240 гибридов. Из них к высокоустойчивым (оптическая плотность 0,00–0,015) был отнесен 51 генотип (BC1 и BC2), что составило 21,25 % оцененной популяции. При этом лишь незначительная часть из устойчивых гибридов (10 генотипов) имела относительно культурный тип куста и формировала достаточно крупные клубни. Большинство устойчивых форм имели ярко выраженные признаки дикого родителя. Визуальная оценка зараженных растений показала полное отсутствие у всех без исключения образцов симптомов гиперчувствительной реакции. Растения, выделившиеся как устойчивые по данным ИФА, визуально выглядели совершенно здоровыми, а некротическая реакция присутствовала только в месте инокуляции вируса. Такой результат свидетельствует в пользу предположения, что устойчивость межвидовых гибридов *S. stoloniferum* определяется либо полевой устойчивостью к вирусам за счет комплекса полигенов, либо, что более вероятно, основную роль в формировании устойчивости полученных нами межвидовых гибридов имеют основные гены (R-гены) крайней устойчивости к соответствующим патогенам [12]. Возможно также формирование устойчивости одновременно за счет обоих этих механизмов.

Доля в популяциях устойчивых гибридов зависела от генотипа аллотетраплоидного родителя и могла различаться весьма существенно. Например, в потомстве клона *S. stoloniferum* Л-32-7-3 устойчивыми к PVY оказались более 30 % гибридов BC1, в то время как в потомстве Л-32-7-1 устойчивость сохранили только 12,5 % гибридов. Хотя мы специально не проводили заражение гибридов X-вирусом картофеля, проведенный параллельно у гибридов ИФА на содержание этого вируса показал, что многие из высокоустойчивых к PVY генотипов проявили высокую полевую устойчивость и к PVX. При этом следует отметить, что все изучавшиеся гибриды до искусственного заражения PVY не менее двух лет репродуцировались в полевых условиях с достаточно высоким фоном вирусной инфекции.

В настоящее время известны и три гена (возможно аллельные формы одного гена) аллотетраплоидного вида *S. stoloniferum*, контролирующие сочетание в различной комбинации ER устойчивости к PVY с ER или HR устойчивостью к PVA и PVV [1, 10, 23]. Один из этих генов $Ry_{sto} = Ry_{f-sto} = R2$, сочетающий экстремальную устойчивость к Y и V вирусам с гиперчувствительностью к A-вирусу, картирован на хромосоме XII [1, 12–16]. Высока вероятность, что гены Ry_{sto} и Ry_{f-sto} являются близко расположенными на хромосоме XII, но не идентичными. Также возможно, что они представляют собой различные аллельные варианты одного гена. Ген Ry_{f-sto} интрогрессирован из

образцов коллекции *S. stoloniferum* Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова в селекционную линию PW 362 (MPI 47.174/3), созданную в Институте селекции и интродукции растений (Млохов, Польша) и не связан с эффектом ЦМС у селекционного материала [12, 16, 20]. Второй ген – Ry_{sto} интрогрессирован в некоторые сорта картофеля западноевропейской селекции от линий CPC 9, CPC 28.4, PI 1600226 и MPI 61.303/4, полученных в ходе многократного беккроссирования аллотетраплоидного вида культурным картофелем [2, 10, 15]. Он ассоциирован с эффектом ЦМС у межвидовых гибридов, наследуемым от материнского аллотетраплоидного родителя совместно с его митохондриальным геномом [16]. Считается, что механизм действия Ry_{sto} и Ry_{fsto} сходен и заключается в участии продуктов генов в процессах супрессии репликации вирусов или их дестабилизации, которые происходят на уровне протопластов растения-носителя этих генов [15]. По данным Х. Росса, кроме *S. stoloniferum* в родословной линии MPI 61.303/4, наиболее часто используемой при создании источников R-генной устойчивости к Y-вирусу в Европейских селекционных центрах, присутствуют также *S. tuberosum ssp andigenum*, *S. acaule*, *S. demissum* и *S. spgazzinii*, часть из которых также может быть источниками ER и/или HR устойчивости к PVY [11]. Лишь немногие сорта (по данным Х. Росса, около 20), созданные в Германии, а также несколько сортов из Польши и Нидерландов несут гены экстремальной устойчивости к PVY от *S. stoloniferum* [20, 24, 25]. Ряд сортов с генами устойчивости к Y-вирусу от этого вида созданы также белорусскими селекционерами [24].

Полученные нами диплоидные гибриды между *S. stoloniferum* и фертильными дигаплоидами *S. tuberosum*, выделившиеся по высокой устойчивости к PVY, отличались достаточно высокой мужской фертильностью, что позволило использовать их в беккроссных скрещиваниях с дигаплоидами картофеля не только в качестве материнских форм, но и как опылителей. Таким образом, интрогрессированный нами локус, связанный с иммунитетом к PVY, стабильно передающийся потомству первичных гибридов при беккроссировании дигаплоидами *S. tuberosum*, не идентичен известному гену Ry_{sto} , наличие которого связано с ЦМС гибридов F_1 . Это также подтверждается результатами анализа с использованием микросателлитного маркера STM0003₁₁₁, рекомендуемого для идентификации данного гена, не выявившего этот ген в полученных нами гибридах. Оценка гибридов с помощью маркера GP122/EcoRV718 на наличие гена Ry_{fsto} показала, что устойчивость гибридов не связана также и с наличием второго известного гена устойчивости к PVY от *S. stoloniferum* [17].

По данным G.Cockerham, *S. stoloniferum* является одним из наиболее полиморфных мексиканских видов картофеля, в том числе и в отношении устойчивости к PVY в сочетании с устойчивостью к PVA. Этот автор выделяет шесть типов устойчивости, из которых три типа представляют собой высокую устойчивость к PVY с разной степенью устойчивости к PVA. Все имеющиеся

в современном ассортименте иммунные к PVY сорта с присутствием генов устойчивости от *S. stoloniferum* принадлежат к одному из этих трех типов вне зависимости от исходной селекционной линии. Тип 1 характерен для сортов селекции Нидерландов, типы 1 и 3 – для сортов из Германии и типы 1 и 2 – для сортов польской селекции [16]. При этом тип 1, характеризующийся иммунитетом к PVY с отсутствием симптомов, характерных как для PVY, так и PVA (появление небольших некротических пятен на листьях), в том числе и при инокуляции вирусной инфекцией, и полным отсутствием симптомов обоих вирусов в вегетативном потомстве, встречается наиболее часто [10].

Мы не проводили анализ полученного нами гибридного материала на основе *S. stoloniferum* на зараженность А-вирусом, однако полное отсутствие характерной для виروزов симптоматики при заражении PVY и стабильное сохранение высокого уровня устойчивости к PVY в вегетативном потомстве гибридов позволяют отнести полученные нами гибриды к типу 1. Таким образом, собранные нами данные по устойчивости межвидовых диплоидных гибридов картофеля на основе *S. stoloniferum* свидетельствуют, что существует достаточно высокая вероятность выявления в созданном нами селекционном материале нового, ранее неизвестного локуса этого аллотетраплоидного вида, связанного с экстремальной устойчивостью к PVY и, возможно, к PVA. Наличие обширного гибридного материала, полученного нами в течение нескольких лет, и стабильно высокая доля среди него образцов с высокой устойчивостью к PVY, подтвержденная методом ИФА, свидетельствует о необходимости выявления этого локуса и создания удобного для его идентификации ПЦР-маркера, пригодного для целей маркер-ассоциированной селекции. С целью последующего маркирования и картирования нового фактора устойчивости к PVY были созданы две популяции гибридов, в которых анализ расщепления по признаку «экстремальная устойчивость к PVY» позволил оценить характер наследования признака и выявить генотипы, пригодные в качестве контрастных форм для последующего молекулярно-генетического маркирования данного фактора.

В таблице 1 представлены сравнительные данные за два года испытаний, показывающие фенотипическое разнообразие в расщепляющихся популяциях IGC 08/13.n и IGC 08/14.n по уровню устойчивости к соответствующим штаммам Y-вируса.

Как видно из данных по распределению устойчивых и неустойчивых генотипов в 2011 и 2012 гг., количество неустойчивых генотипов в обеих популяциях существенно выросло при оценке, проводившейся в 2012 г. При этом уменьшилось количество генотипов как с показателями оптической плотности до 0,01 ед., так и с оптической плотностью 0,00. По-видимому, это связано с постепенным накоплением вирусных частиц в растениях при вегетативном репродуцировании. Тем не менее доля устойчивых генотипов и в 2012 г. в обеих популяциях составила около половины (в IGC 08/13.n – более половины). Несмотря на то что доля неустойчивых образцов существенно возросла (в том

Таблица 1 – Распределение генотипов в расщепляющихся популяциях IGC 08/13.n (заражение PVY⁰) и IGC 08/14.n (заражение PVY^N) в зависимости от оптической плотности (показатель накопления вирусных частиц в соке), выявленной при ИФА межвидовых гибридов в экспериментах 2011 и 2012 гг.

Название гибридной популяции и ее происхождение	Количество оцененных генотипов, шт.		Показатели оптической плотности, ед. опт. пл.	Распределение			
	2011 г.	2012 г.		Количество генотипов, шт.		Частота генотипов, %	
				2011 г.	2012 г.	2011 г.	2012 г.
IGC 08/13.n; IGC 02/ 183.17 <i>sto</i> (ER*) × IGC 02/185.1 <i>sto</i> (S**)	87	83	0,00–0,010	76	47	87,36	56,63
			В т. ч. 0,00	41	11	47,13	13,25
			0,011 – > 2	11	36	12,64	43,37
			В т. ч. > 0,18	2	25	2,30	30,12
IGC 08/14.n; IGC 02/ 183.17 <i>sto</i> (ER*) × IGC 02/178.3 <i>sto</i> (S**)	84	77	0,00–0,010	78	37	92,86	48,05
			В т. ч. 0,00	41	11	55,95	14,28
			0,011 – > 2	6	40	7,14	51,95
			В т. ч. > 0,18	4	34	4,76	44,16

* ER – высокоустойчивый к PVY; ** S – неустойчивый к PVY.

числе и с оптической плотностью более 0,18, которую принято считать пороговой), лишь в отдельных образцах можно было выявить наличие вирусной инфекции визуально [26].

Изменение соотношения устойчивых и неустойчивых генотипов дает основание предполагать, что устойчивость к PVY, выявленная у части гибридов в 2011 г., определяется не столько реакцией экстремальной устойчивости при заражении соком инфектора, сколько относительной устойчивостью к накоплению вирусных частиц, связанной не с действием ER-генов, а другими факторами, в частности с длительностью инкубационного периода. Первоначальный анализ гибридов на накопление вирусных частиц с помощью ИФА проводили в 2011 г. на растениях, выросших из клубней зараженных растений картофеля. При анализе 2012 г. сбор экспериментального материала проводили на растениях второго после заражения клубневого поколения. Известно, что клубневое репродуктивное размножение картофеля способствует накоплению вирусной инфекции [9]. При этом кроме искусственного заражения оказывал также влияние естественный фон вирусной инфекции, что также могло способствовать повышению уровня распространения и накопления вирусных частиц. Возможно, относительная устойчивость части генотипов, выявленная в 2011 г., связана с действием полигенов, определяющих снижение активности размножения патогена в клубнях и растениях.

Таким образом, двухлетняя оценка накопления вируса в экспериментальных генотипах позволила нам существенно повысить точность оценки и выделить генотипы со стабильно высокой устойчивостью (экстремальной устойчивостью) к разным штаммам вируса. Также удалось выделить генотипы, оптическая плотность для которых в 2012 г., как и в 2011, была равна 0. Количество

таких гибридов было более 13 % в популяции IGC 08/13.n и более 14 % – в популяции IGC 08/14.n. Очевидно, такие генотипы могут рассматриваться как источники экстремальной устойчивости к PVY при селекции на устойчивость к данному вирусу и одновременно служить надежными положительными стандартами при оценке полиморфизма по признаку устойчивости к вирусу с помощью методов молекулярно-генетического анализа.

Данные о соотношении в экспериментальных популяциях устойчивых и неустойчивых гибридов оказались очень близкими в оба года испытаний (см. табл. 1). При создании обеих расщепляющихся популяций исходные межвидовые гибриды F₁ были получены с участием клона *S. stoloniferum* PI 16158 (по каталогу Национального генбанка по картофелю США, NRSP-6), поэтому можно говорить, что интрогрессированный нами генетический материал дикого вида обеспечивает устойчивость как к обычному (PVY⁰), так и к некротическому (PVY^N) штаммам вируса.

При отборе неустойчивых образцов в отношении сортов картофеля у разных авторов применяются пороги 0,18–0,2 ед. опт. пл. Однако в настоящей работе мы существенно понизили порог для отбора неустойчивых образцов (до 0,10), так как проводилось изучение гибридов картофеля с интрогрессированными генами дикого вида. Такой же порог для отбора неустойчивых образцов был применен учеными ВНИИ КХ [22]. При оценке расщепления ориентировались на соответствующую градацию – образцы делили на два типа: высокоустойчивые (экстрарезистентные) – с оптической плотностью не более 0,01 и прочие – с оптической плотностью выше 0,01. Результаты анализа расщепления в двух популяциях межвидовых гибридов представлены в таблице 2.

Для получения расщепляющихся по признаку устойчивости к PVY популяций мы использовали скрещивания между контрастными по проявлению признака диплоидными беккроссными гибридами ([wild sp. × tbr] × tbr). Таким образом, в высокоустойчивом родителе, участвовавшем в скрещиваниях при

Таблица 2 – Расщепление по признаку «устойчивость к PVY» в популяциях межвидовых гибридов, полученных от скрещивания высокоустойчивого (ER – extra resistance) к PVY и восприимчивых (S – susceptible) к PVY клонов

Фактическое расщепление ER : (O = S + R)*	Теоретическое расщепление ER : (O = S + R)	Отклонение от теоретического расщепления	χ^2	Уровень значимости P
IGC 08/13.n				
(IGC 02/ 183.17 sto (ER*) × IGC 02/185.1 sto (S**), заражение PVY ⁰				
47 : 36	43,5 : 43,5 (1 : 1)	2,5	1,46	0,05
IGC 08/14.n				
IGC 02/ 183.17 sto (ER) × IGC 02/178.3 sto (S), заражение PVY ^N				
37 : 40	38,5 : 38,5 (1 : 1)	1,5	0,12	0,05

* ER – extra resistance (высокоустойчивые); ** S – susceptible (неустойчивые).

получении популяций для молекулярно-генетического маркирования, соответствующий ER-ген может быть представлен только в гетерозиготном состоянии. Как видно из данных таблицы 2, в обеих популяциях межвидовых гибридов характер расщепления практически совпадает. Несмотря на то что в популяции IGC 08/13.n имеется некоторый избыток устойчивых генотипов, в обоих случаях расщепление достоверно соответствует теоретически ожидаемому для анализирующего скрещивания с гетерозиготным родителем 1 : 1. Такой характер расщепления в популяциях на экстремально устойчивые резистентные и неустойчивые генотипы говорит о том, что высокая устойчивость определяется наличием одного доминантного R-гена (см. табл. 2), полученного от дикого родителя. Это согласуется с данными других авторов [10]. Хотя, как уже говорилось выше, в формировании устойчивости может принимать участие и полигенный фактор, определяющий, по всей видимости, скорость накопления вирусных частиц в заражавшихся растениях картофеля, результаты расщепления говорят о независимом наследовании R-генной и полигенной устойчивости.

Соответствие полученного в эксперименте расщепления теоретически ожидаемому подтверждает моногенный контроль признака экстремальной устойчивости к PVY, наследуемого от *S. stoloniferum*, что упрощает подбор образцов из полученных нами гибридных популяций для дальнейшего маркирования соответствующего гена. Это обстоятельство, а также наличие в изучаемых популяциях достаточно большого числа образцов с контрастным проявлением признака (22 иммунных с показателем оптической плотности за два года наблюдений 0,00 ед. опт. пл. и более 50 сильно поражаемых вирусом с показателем оптической плотности около 2,0 и выше ед. опт. пл.), должно способствовать успешному маркированию нового гена экстремальной устойчивости к Y-вирусу, интрогрессированному в дигаплоиды *S. tuberosum* от аллотетраплоидного вида *S. stoloniferum*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований по изучению диплоидных межвидовых гибридов картофеля, полученных на основе мексиканского аллотетраплоидного вида *S. stoloniferum*, с целью использования в селекции на устойчивость к Y-вирусу было показано, что среди них может быть отобран селекционный материал с высокой устойчивостью к вирусной инфекции. Признак стабильно передается потомству при беккроссировании дигаплоидами культурного картофеля. При этом изучение исходных генотипов дикого вида с помощью ДНК-маркеров позволяет предположить наличие в них и в гибридах, полученных на их основе, нового, ранее немаркированного и некартированного фактора, обеспечивающего высокую устойчивость к патогену. Экспериментально подтвержден моногенный характер наследования признака «экстремальная резистентность к обычному и некротическому штаммам PVY», передающихся межвидовым гибридам от *S. stoloniferum*. Такой характер

наследования признака позволит в дальнейшем использовать полученные расщепляющиеся популяции гибридов на основе *S. stoloniferum* для маркирования нового фактора ER устойчивости к PVY от этого вида картофеля.

В расщепляющихся популяциях выделены гибриды с контрастным проявлением признака устойчивости, необходимые для проведения молекулярно-генетического анализа с целью выявления генетического полиморфизма, коррелирующего с признаками устойчивости и дальнейшего маркирования нового гена.

Список литературы

1. Solomon – Blackburn, R.M. A review of host major-gene resistance to potato viruses X, Y, A and V in potato: gens, genetics and mapped location / R.M. Solomon–Blackburn, H. Barker // *Heredity*. – 2001. – Vol. 86. – P. 8–6.
2. 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.
3. Vales, M.I. Marker – Assisted Selection for PVY resistance in tetraploid potato / M.I. Vales [et al.] // *Proc. IS on Molecular Markers in Horticulture*. – N.V. Bassil and R. Martin eds. – Acta Hort. – 2010. – Vol. 859. – P. 409–416.
4. Scholthof, K.G. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology / K.G. Scholthof [et al.] // *Molecular Plant Path.* – 2011. – Vol. 12. – № 9. – P. 938–954.
5. Ortega, F. Application of molecular marker-assisted selection (MAS) for disease resistance in practical potato breeding programme / F. Ortega, C. Lopez – Vizcon // *Potato research*. – 2012. – Vol. 55. – P. 1–13.
6. Ohshima, K. Studies on the molecular evolution of potyviruses // *J. Ge. Plant. Pathol.* – 2013. – Vol. 79. – P. 448–452.
7. Блоцкая, Ж.В. Штаммоспецифические особенности Y-вируса картофеля (PVY) // *Земледелие и защита растений*. – 2014. – № 4. – С. 49–50.
8. Lorenzen, J.H. Whole gene characterization of *Potato virus Y* isolates collection in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada / J.H. Lorenzen [et al.] // *Arch. Viro.* – 2006. – Vol. 151. – P. 1055–1074.
9. Иванюк, В.Г. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / В.Г. Иванюк, С.А. Банадысев, Г.К. Журомский. – Минск: Белпринт, 2005. – 696 с.
10. Cockerham, G. Genetical studies on resistance to potato Viruses X and Y // *Heredity*. – 1970. – Vol. 25. – № 3. – P. 309–348.
11. Росс, Х. Селекция картофеля. Проблемы и перспективы / Х. Росс; пер. с англ. / М.: Агропромиздат. – 1989. – 183 с.
12. Flis, B. *Ry-fsto* 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 / B. Flis [et al.] // *Molecular Breeding*. – 2005. – Vol. 15. – P. 95–101.
13. Development of a locus-specific marker and localization of *Ry_{sto}*-gene based on linkage to catalase gene on chromosome XII in the tetraploid potato genome / I. Cernak [et al.] // *Breeding science*. – 2008. – Vol. 58. – P. 309–314.

14. Evidence for utility of the same PCR-based markers for selection of extreme resistance to Potato virus Y controlled by *Rysto* of *Solanum stoloniferum* derived from different sources / J.P.T. Valkonen [et al.] // *Ann Appl Biol* . – 2008. – Vol. 152 . – P. 121–130.
15. Brigneti, G. Molecular mapping of the potato virus Y resistance gene *Rysto* in potato / G. Brigneti, J. Garcia-Mas, D.C. Baulcombe // *Theor. Appl. Genet.* – 1997. – Vol. 94. – P. 198–203.
16. Ye-Su Song, Development of STS markers for selection of extreme resistance (*Ry_{sto}*) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars / Ye-Su Song, A. Schwarzfischer // *Am. J. Pot. Res.* – 2008. – Vol. 85. – P. 159–170.
17. Tian, Y-P. Genetic determinants of potato virus Y required to overcome or trigger hypersensitive resistance to PVY strain group 0 controlled by the gene *Ny* in potato/ Y-P. Tian, J. Valkonen // *МРМІ.* – 2013. – Vol. 26. – № 3. – P. 2970–305.
18. Wang, M. Diversity and evolution of resistance genes in tuber-bearing *Solanum* species. PhD-thesis – Wageningen Universiteit: Wageningen, Netherlands, 2007. – 108 p.
19. Ермишин, А.П. Картофель / А.П. Ермишин, Е.В. Воронкова, В.А. Козлов // *Генетические основы селекции растений. Частная генетика растений / под науч. ред. А.В. Кильчевского, Л.В. Хотылевой.* – Минск : Беларус. навука, 2010. – Т. 2. – С. 156–234.
20. Sources and Effectiveness of Potato PVY Resistance in IHAR's Breeding Research / E. Zimnoch – Guzowska [et al.] // *Am. J. Potato Res.* – 2013. – Vol. 90. – P. 21–27.
21. Воронкова, Е.В. Диплоидные гибриды между аллотетраплоидными дикими видами картофеля *Solanum acaule* Bitt., *S. stoloniferum* Schtdl. и дигаплоидами *S.tuberosum* L. / Е.В. Воронкова, В.М. Лисовская, А.П. Ермишин // *Генетика.* – 2007. – Т. 43. – № 8. – С. 1065–1073.
22. Инструкция по использованию иммуноферментного диагностического набора для определения вирусов картофеля / Методические указания Всероссийского научно-исследовательского института картофельного хозяйства (ВНИИ КХ) РАСХН. – Коренево. – 2001. – 7 с.
23. Гавриленко, Т.А. Создание устойчивых к вирусам растений картофеля на основе традиционных подходов и методов биотехнологии / Т.А. Гавриленко, Е.В. Рогозина, О.Ю. Антонова // *Идентифицированный генофонд растений и селекция / под. ред. Б.В. Ригина.* – СПб: ВИР, 2005. – С. 644–662.
24. Воронкова, Е.В., Изучение коллекции сортов и перспективных гибридов картофеля на наличие ПЦР-маркеров генов устойчивости с целью отбора исходного материала для селекции на комплексную устойчивость к патогенам / Е.В. Воронкова [и др.] / *Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры: материалы Междунар. конф., посв. 80-летию Центрального ботанического сада НАН Беларуси (19–22 июня 2012 г., Минск, Беларусь): в 2 ч. / Нац. акад. наук Беларуси, Центр. ботан. сад; редкол.: В.В. Титок (гл. ред.) [и др.] / Минск : ЦБС НАН Беларуси, 2012. – Ч. 2. – С. 268–271.*

25. Sato, M. Potato virus Y resistance gene, *Ryhc*, mapped to the distal end of potato chromosome 9 / M. Sato [et al.] // *Euphytica*. – 2006. – Vol. 149. – P. 367–372.

26. Ye-Su Song. Mapping of extreme resistance to PVY (*Rysto*) on chromosome XII using anther–culture–derived primary dihaploid potato lines / Ye-Su Song [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2005. – Vol. 111. – P. 879–887.

27. Sources and Effectiveness of Potato PVY Resistance in IHAR's Breeding Research / E. Zimnoch – Guzowska [et fl.] // *Am. J. Potato Res.* – 2013. – Vol. 90. – P. 21–27.

Поступила в редакцию 26.11.2015 г.

E.V. VORONKOVA, N.V. PAVLYUCHUK, YU.V. POLYUHOVICH,
O.N. GUKASYAN, V.M. ZHARICH, V.I. LUKSHA, A.P. ERMISHIN

RESISTANCE TO Y-VIRUS, INTROGRESSIVE IN DIPLOIDIC INTERSPECIFIC HYBRIDS FROM *SOLANUM STOLONIFERUM*

SUMMARY

*With the immuno fermental analysis help after artificial infection with Y-virus of potato the collection from 240 interspecific diploidic hybrids of potatoes received on the basis of the Mexican allotetraploid type of *Solanum stoloniferum* was estimated. It was shown that among them selection material with high resistance to viral infection which is steadily transferred to posterity at a backcrossing of digaploidama of cultural potato can be selected. Monogenic nature of inheritance of sign «extreme resistance to usual and necrotic strains of PVY», transferred to interspecific hybrids from *S. stoloniferum* is experimentally confirmed. Such nature of sign inheritance will allow using the received split populations of hybrids on the basis of *S. stoloniferum* for marking of a new factor of extreme resistance to PVY from this type of potato.*

Key words: potato, *Solanum stoloniferum* Schltdt., diploid interspecific hybrids, resistance to Y-virus, ELISA, extreme resistance genes (ER-genes), segregation.