

РАЗДЕЛ 2

ГЕНЕТИКА КАРТОФЕЛЯ

УДК 635.21:631.524.86.01:631.527.8

<https://doi.org/10.47612/0134-9740-2020-28-37-44>

Д. В. Башко, А. В. Чашинский, Т. В. Семанюк, И. А. Михалькович

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук

Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству»,

аг. Самохваловичи, Минский район

E-mail: Missis.minzer@mail.ru

ТЕСТИРОВАНИЕ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ КАРТОФЕЛЯ ПО НАЛИЧИЮ ДНК-МАРКЕРОВ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ПАТОГЕНАМ

РЕЗЮМЕ

В данной работе представлены результаты тестирования межвидовых гибридов картофеля по наличию генов устойчивости к фитофторозу, золотистой картофельной нематоде, бледной картофельной нематоде и раку картофеля. Особой селекционной ценностью характеризуются образцы 50-12-14, 50-12-4, 50-12-2, 143-14-1, 178-14-17, обладающие высокой насыщенностью маркерами генов устойчивости к патогенам.

Ключевые слова: картофель, ПЦР, ДНК-маркер, устойчивость, межвидовой гибрид, фитофтороз, золотистая картофельная нематода, бледная картофельная нематода, рак картофеля.

ВВЕДЕНИЕ

Фитофтороз картофеля, вызываемый оомицетом *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, в Республике Беларусь по праву считается одной из наиболее вредоносных болезней картофеля. В годы с сильным поражением ботвы и клубней урожай может снижаться на 50–80 %. Нематодные болезни (фитогельминтозы) также значительно снижают урожайность картофеля, семенные и товарные качества клубней, резко увеличивают отходы картофеля при хранении [1]. Создание исходного материала и далее на его основе сортов, обладающих высокой степенью устойчивости к патогенам, является актуальной задачей. Ее перспективность зависит от вовлечения в селекционный процесс диких и культурных видов картофеля, являющихся богатейшими источниками устойчивости картофеля к болезням, вредителям и экстремальным факторам внешней среды [2–6].

Однако использование диких и культурных видов картофеля для создания исходного материала приводит к затягиванию селекционного процесса. Классическая схема селекции картофеля включает ежегодный отбор наиболее перспективных гибридов на основе фенотипической оценки. Всесторонняя их оценка в полевых и лабораторных условиях приводит к уменьшению изучаемого материала и отбору наиболее перспективных образцов. Продолжительность такого селекционного цикла в среднем составляет

8–10 лет. С учетом того, что многие полученные межвидовые гибриды несут в себе ряд отрицательных признаков, свойственных сородичам культурного картофеля (позднеспелость, длинные столоны, мелкие клубни, плохие кулинарные качества и др.), и необходимости их устранения путем использования насыщающих скрещиваний, создание доноров устойчивости может затянуться на несколько селекционных циклов. Так, на получение перспективной исходной формы, начиная с момента вовлечения образцов диких видов в селекционный процесс, может уйти не менее 25 лет [7]. Использование достижений молекулярной генетики при создании нового исходного материала картофеля позволит усовершенствовать процесс отбора перспективных образцов и сократить время их создания.

Целью наших исследований явилось тестирование на наличие ДНК-маркеров генов устойчивости к фитофторозу, нематоде, раку картофеля перспективных межвидовых гибридов картофеля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Материалом для исследований служил 21 межвидовой гибрид, полученный в лаборатории генетики картофеля РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству». Данные образцы, созданные на основе диких видов картофеля *S. bulbocastanum*, *S. polyadenium* и *S. etuberosum*, обладают комплексом хозяйствственно ценных признаков [8].

Выделение геномной ДНК из клубней картофеля осуществляли с помощью наборов реагентов для выделения ДНК «Нуклеосорб» комплектация «С» производства фирмы «Праймтех» (Республика Беларусь) согласно протоколу производителя. Качество полученной ДНК определяли с помощью ПЦР-реакции с праймерами ВСН, являющимися внутренним положительным контролем, амплифицирующимся у любых образцов картофеля.

Äëÿ î öäî êè î áðäööï áí á àëè-ëå áäî î áñöî é-ëâî ñòè è *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary проводили молекулярное маркирование со SCAR-маркером BLB1-820, позволяющим установить наличие гена *Rpi-blb 1* устойчивости от дикого вида *S. bulbocastanum* и SCAR-маркерами R1₁₂₀₅ и R3b₃₇₈, которые позволяют определить одноименные гены устойчивости от *S. demissum*. Кроме того, наличие гена *Rpi-stol* высокой долговременной

Таблица 1 – Характеристика маркеров R-генов устойчивости картофеля к патогенам, использованных в работе

Ген	Устойчивость	Маркер	Праймер (5'-3')	Источник
<i>Rpi-blb 1</i>	К фитофторозу от <i>S.bulbocastanum</i>	BLB1-820	F: AACCTGTATGGCAGTGGCATG R: GTCAAGAAAAGGCACTCGT	Wang, 2008
<i>RI</i>	К фитофторозу от <i>S. demissum</i>	R1	F:CACTCGTGACATACTCTCACTA R:GTAGTACCTAICTTATTCCTGCAAGAAT	Khavkin et al., 2010
<i>R3b</i>	К фитофторозу от <i>S. demissum</i>	R3b	F:GTGATGAAATGCTATGTTCTCTCGAGA R:ACCAAGTTCTGCAATTCCAGATG	Khavkin et al., 2010
<i>Rpi-si1</i>	К фитофторозу от <i>S. sijoniferum</i>	517/1519	F:CAITCCAACTAGCCATCTTGG R:TATTICAGATCGAAAGTAC	Wang, 2007
<i>Rpi-si1</i>	К фитофторозу от <i>S. sijoniferum</i>	1521/518	F:GAAAGTCTAGAGTTACACTGG R:CAATCACAAATGGCAGGAAACC	Wang, 2007
<i>HI</i>	К <i>Globodera rostochiensis</i>	N146	F: AAGCTCTTGCCCTAGTGCTC R:AGGGGGAACATGCCATG	Takenchi et al., 2009
<i>HI</i>	К <i>Globodera rostochiensis</i>	N195	F: TGGAAATGGCACCCTA R:CATCATGGTTCACITGICAC	Asano et al., 2012
<i>Gpa2</i>	К <i>Globodera pallida</i>	Gpa2-2	F:GCACITAGAGACTCATTC R:ACAGAATGGTGGCAAGCAGAAA	Asano et al., 2012
<i>Sen1</i>	К <i>Synchytrium endobioticum</i>	NI125	F: TATTGTTAATCGTTACTCCCTC R:AGAGTCCGTTAACCGACTCC	Hehl et al., 1999

устойчивости к фитофторозу от дикого вида *S. stoloniferum* определяли при помощи SCAR-маркеров 517/1519₇₅₀ и 1521/518₇₀₄.

Генами, обеспечивающими эффективную защиту от цистообразующих нематод, являются *H1* и *Gpa2*. Для их определения использовали SCAR-маркеры N146₅₀₆ и N195₃₃₇ для идентификации гена *H1* (*Globodera rostochiensis*) и STS-маркер *Gpa2-2*₄₅₂ для определения гена *Gpa2* (*Globodera pallida*).

Одним из основных доминантных генов иммунитета к патотипу 1 рака картофеля является ген *Sen1*. Присутствие доминантной аллели данного гена может быть диагностировано с помощью SCAR-маркера NL25₁₄₀₀, созданного на основе сиквенса RFLP-фрагмента с таким же названием.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате проведенного молекулярного маркирования 21 межвидового гибрида картофеля по наличию ДНК-маркеров генов устойчивости к фитофторозу, золотистой картофельной нематоде, бледной картофельной нематоде и раку картофеля было установлено, что маркер NL25₁₄₀₀ (ген *Sen1*) идентифицирован у всех образцов (встречаемость 100 %) (табл. 2).

ДНК-маркер R3b₃₇₈ (ген *R3b*) присутствовал у 15 изученных образцов. Его встречаемость составила 71,4 %.

Использованные SCAR-маркеры N146₅₀₆ и N195₃₃₇ на устойчивость к *Globodera rostochiensis* показали частоту встречаемости 63,2 и 68,4 % соответственно (рис. 1).

Ген *R1*, обеспечивающий защиту картофеля от штаммов *Phytophthora infestans*, относящихся к первой группе ациркулентности *Avr1* (A1 тип спаривания), был выявлен у 7 межвидовых гибридов. Частота встречаемости составила 33,3 % (рис. 2).

Маркеры (517/1519₇₅₀ и 1521/518₇₀₄) на гены устойчивости к фитофторозу показали низкую частоту встречаемости – 14,3 и 28,6 % соответственно. И только три образца (14,3 %) несли в себе ген *Rpi-blb 1*.

Очень низкий процент встречаемости (1,1 %) отмечен для ДНК-маркера *Gpa2-2*₄₅₂, определяющего устойчивость к бледной картофельной нематоде (*Globodera pallida*).

Наибольшее количество маркеров отмечено у межвидовых гибридов 50-12-2, 50-12-4 и 50-12-14, полученных на основе соматического гибрида 503-55 (*S. bulbocastanum*) и сорта Манифест. Данные образцы характеризовались наличием маркеров BLB1-820, *R1*, *R3b* (за исключением образца 50-12-2), 517/1519, 1521/518. А также у этих гибридов отмечено наличие маркера NL25₁₄₀₀. STS-маркер *Gpa2-2*₄₅₂ идентифицирован только у образца 50-12-14.

Гибрид 143-14-1, полученный при скрещивании соматического гибрида 501-48 (*S. bulbocastanum*) с сортом Манифест, и форма 178-14-17, созданная с использованием соматического образца 0701-52 (*S. polyadenium*) и гибрида 8492-1, содержат гены устойчивости к фитофторозу *R1*, *R3b*, *Rpi-sto1* и ген *Sen1*. ДНК-маркер N195₃₃₇ выявлен у гибрида 143-14-1, а у формы 178-14-17 – STS-маркер *Gpa2-2*₄₅₂.

У межвидового гибрида 61-14-9, полученного на основе дикого вида *S. etuberosum* и культурного вида *S. andigenum*, диагностировали два маркера *R1*₁₂₀₅ и 1521/518₇₀₄, отвечающих за устойчивость к фитофторозу, и один маркер NL25₁₄₀₀ (устойчивость к раку картофеля).

Остальные изученные образцы характеризовались наличием одного из ДНК-маркеров, скрепленных с генами устойчивости к фитофторозу. Это формы: 147-09-4, 147-09-9, 155-13-3, 155-13-4, 155-13-16, 178-14-8, 178-14-23, 178-14-27, 42-13-7, 42-13-38 с маркером R3b₃₇₈ и 166-14-7 с маркером *R1*₁₂₀₅. Кроме того, данные гибриды обладали

Таблица 2 – Результаты молекулярного скрининга генов устойчивости к фитофторозу, золотистой и бледной картофельным нематодам, раку картофеля у межвидовых гибридов

Межвидовой гибрид	Маркер (ген)						
	BLB1-820 (<i>Rpi-hlb1</i>)	R1 ₁₂₀₅ (<i>R1</i>)	R3b ₃₇₈ (<i>R3b</i>)	517/1519 ₇₅₀ (<i>Rpi-stol1</i>)	1521/518 ₇₀₄ (<i>Rpi-stol1</i>)	N146 ₅₀₆ (<i>HI</i>)	N195 ₃₃₇ (<i>HI</i>)
107-15-8	0	0	0	0	0	0	0
133-14-4	0	0	+	0	0	–	–
143-14-1	0	+	+	0	+	0	0
147-09-4	0	0	+	0	+	+	+
147-09-9	0	0	+	0	+	0	+
155-13-3	0	0	+	0	0	+	0
155-13-4	0	0	+	0	0	–	–
155-13-16	0	0	+	0	0	+	0
155-13-20	0	0	0	0	0	+	0
166-14-7	0	+	0	0	0	+	0
178-14-8	0	0	+	0	0	+	0
178-14-17	0	+	+	0	+	0	+
178-14-23	0	0	+	0	0	+	0
178-14-27	0	0	+	0	0	+	0
42-13-17	0	0	+	0	0	+	0
42-13-20	0	0	0	0	0	+	0
42-13-38	0	0	+	0	0	+	0
50-12-2	+	0	+	0	0	0	0
50-12-4	+	+	+	+	0	0	0
50-12-14	+	+	+	+	0	0	+
61-14-9	0	+	0	0	0	0	0
Частота встречаемости, %	14,3	33,3	71,4	14,3	28,6	63,2	68,4
							1,1
							100

Примечание. «+» – маркер выявлен; «0» – маркер не выявлен; «–» – анализ не проводился.

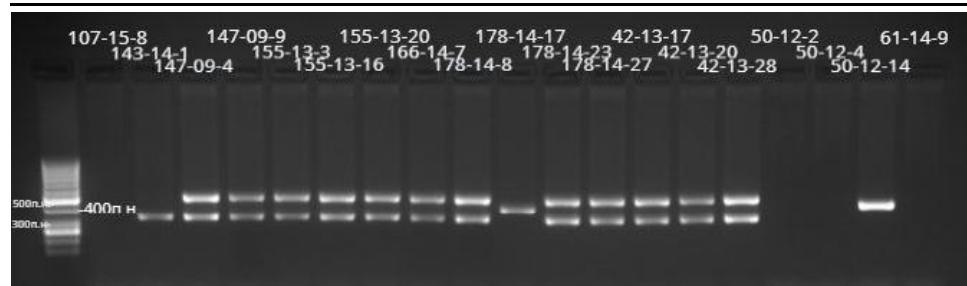


Рисунок 1 – Результаты амплификации маркеров N146₅₀₆, N195₃₃₇, Gpa2-2₄₅₂ на наличие генов устойчивости *H1* и *Gpa2* к нематодам

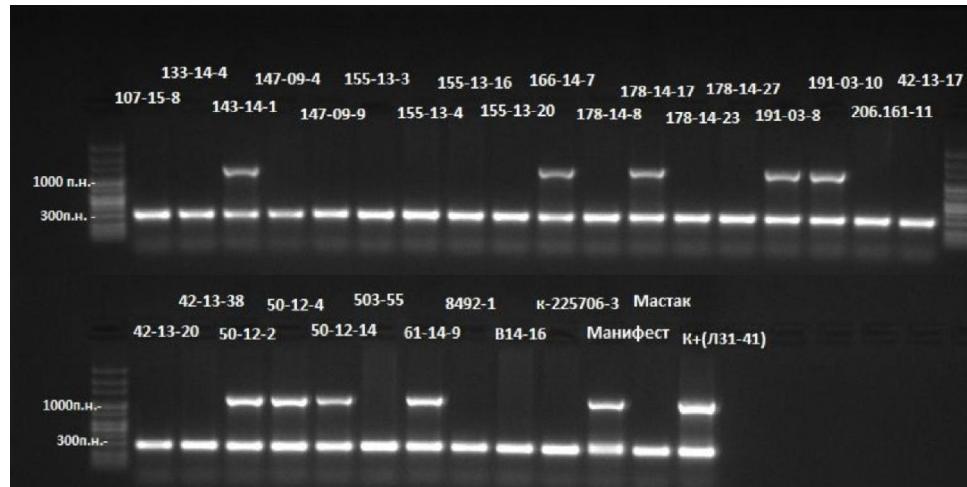


Рисунок 2 – Результаты амплификации маркера R1 на наличие гена устойчивости *R1* к фитофторозу картофеля

SCAR-маркерами N195₃₃₇ и N146₅₀₆, определяющими устойчивость к золотистой картофельной нематоде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что частота выявления ДНК-маркеров генов устойчивости к фитофторозу, раку картофеля, золотистой и бледной картофельным нематодам была различной.

Из 21 исследованного межвидового гибрида картофеля максимальное количество маркеров (BLB1-820, R1₁₂₀₅, R3b₃₇₈, 517/1519₇₅₀, 1521/518₇₀₄, Gpa2-2₄₅₂, NL25₁₄₀₀) идентифицировано у образца 50-12-14.

У гибрида 50-12-4 определены 6 маркеров на гены устойчивости к фитофторозу (BLB1-820, R1₁₂₀₅, R3b₃₇₈, 517/1519₇₅₀, 1521/518₇₀₄) и раку картофеля (NL25₁₄₀₀).

У образцов 50-12-2, 143-14-1, 178-14-17 обнаружено по 5 маркеров на гены устойчивости к фитофторозу (BLB1-820, R1₁₂₀₅, R3b₃₇₈, 517/1519₇₅₀, 1521/518₇₀₄), золотистой (N195₃₃₇) и бледной (Gpa2-2₄₅₂) картофельным нематодам, раку картофеля (NL25₁₄₀₀).

У остальных изученных межвидовых гибридов присутствуют от 2 до 4 ДНК-маркеров на гены устойчивости к фитофторозу, раку картофеля, золотистой и бледной картофельным нематодам.

Полученные данные о наличии ДНК-маркеров генов устойчивости к фитофторозу, нематодам и раку картофеля позволяют более эффективно использовать межвидовые гибриды в селекции картофеля.

Список литературы

1. Иванюк, В. Г. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / В. Г. Иванюк, С. А. Банадысов, Г. К. Журомский. – Минск : Белпринт, 2005. – 695 с.
2. Будин, К. З. Значение диплоидных видов картофеля и пути использования их в селекции / К. З. Будин, Н. Ф. Бывако, Л. М. Турулева // Науч.-техн. бюл. ВИР. – Ленинград, 1984. – Вып. 145. – С. 175–182.
3. Колобаев, В. А. Межвидовые гибриды картофеля, подавляющие размножение фитофтороза / В. А. Колобаев // Использование мировых генетических ресурсов ВИР в создании сортов картофеля нового поколения : материалы Всероссийской науч.-координ. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения К. З. Будина, Санкт-Петербург, 28–29 июля 2009 г. / Российская акад. с.-х. наук, Вавиловское общество генетиков и селекционеров, Северо-Западный региональный науч. центр Россельхозакадемии, ГНУ ГНЦ РФ «Всерос. науч.-исслед. ин-т растениеводства им. Н. И. Вавилова» РАСХН ; сост. С. Д. Киру. – Санкт-Петербург : ГНУ ГНЦ РФ ВИР им. Н. И. Вавилова, 2009. – С. 50–58.
4. Вовлечь в практическую селекцию межвидового гибридного материала картофеля, созданного на основе редко используемых диких видов картофеля / В. А. Козлов [и др.] // Картофелеводство : сб. науч. тр. / Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по картофелеводству и плодоовоощеводству ; редкол.: С. А. Турко [и др.]. – Минск, 2013. – Т. 21. – С. 93–103.
5. Подгаецкий, А. А. Генетические ресурсы картофеля / А. А. Подгаецкий // Материалы Междунар. юбилейной науч.-практ. конф., посвящ. 75-летию Ин-та картофелеводства Нац. акад. наук Беларуси, Самохваловичи, 7–10 июля 2003 г. : науч. тр. / Ин-т картофелеводства НАН Беларуси. – Минск, 2003. – С. 108–109.
6. Киру, С. Д. Генетические ресурсы картофеля ВИР – один из главных источников исходного материала для селекции / С. Д. Киру // Материалы Междунар. юбилейной науч.-практ. конф., посвящ. 75-летию Ин-та картофелеводства Нац. акад. наук Беларуси, Самохваловичи, 7–10 июля 2003 г. : науч. тр. / Ин-т картофелеводства НАН Беларуси. – Минск, 2003. – С. 200–206.
7. Козлов, В. А. Схема создания исходного материала на основе дигаплоидов и диких видов картофеля / В. А. Козлов // Картофелеводство : сб. науч. тр. / Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по картофелеводству и плодоовоощеводству ; редкол.: С. А. Турко (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2016. – Т. 24. – С. 100–106.
8. Чашинский, А. В. Использование соматических гибридов картофеля при создании исходного материала, устойчивого к фитофторозу / А. В. Чашинский, Т. В. Семанюк // Картофелеводство : сб. науч. тр. / Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по картофелеводству и плодоовоощеводству ; редкол.: В. Л. Маханько (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2020. – Т. 27. – С. 55–63.
9. Allele mining in *Solanum*: conserved homologues of *Rpi-blb1* are identified in *Solanum stoloniferum* / M. Wang [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2008. – Vol. 116. – P. 933–943.
10. Potato resistance to late blight as related to the *R1* and *R3* genes introgressed from *Solanum demissum* / E. Khavkin [et al.] // PPO-Special Report. – 2010. – № 14. – P. 231–238.
11. Wang, M. Diversity and evolution of resistance genes in tuber-bearing *Solanum* species: PhD-thesis / M. Wang. – Wageningen, 2007. – P. 43–58.

12. DNA marker for efficient selection of disease and pests resistance genes in potato (in Japanese) / T. Takeuchi [et al.]. – Hokkaido Nogyo-Shiken-Kaigi-Shiryo, 2009. – P. 1–26.

13. DNA marker-assisted evaluation of potato genotypes for potential resistance to potato cyst nematode pathotypes not yet invading into Japan / K. Asano [et al.] // Breeding Sci. – 2012. – Vol. 62, № 2. – P. 142–150.

14. TMV resistance gene *N* homologues are linked to *Synchytrium endobioticum* resistance to potato / R. Hehl [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 1999. – Vol. 98. – P. 379–386.

Поступила в редакцию 07.12.2020 г.

D. V. BASHKO, A. V. CHASHINSKIY, T. V. SEMANYUK,
I. A. MIHALKOVICH

**POTATOTS INTERSPECIFIC HYBRIDS TESTING
FOR THE PRESENCE OF DNA MARKERS OF PATAGEN
RESISTANCE GENES**

SUMMARY

The results of interspecific potatoes hybrids analysis to determine the presence of resistance genes to late blight, potato cyst nematode and potato wart are presented in the article. Hybrids 50-12-14, 50-12-4, 50-12-2, 143-14-1, 178-14-17 are the most valuable due to accumulation more gene specific markers.

Key words: potatoes, PCR, DNA-marker, resistance, interspecific hybrid, late blight, golden potato nematode, pale potato nematode, potato cancer.