

УДК 635.21:631.524.86:631.527.8

<https://doi.org/10.47612/0134-9740-2020-28-57-63>

**И. А. Михалькович, Ю. В. Яхонт, Т. В. Семанюк,
А. В. Чашинский, Д. В. Башко, А. В. Кондратюк**

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству»,
аг. Самохваловичи, Минский район

E-mail: inna1984@inbox.ru

ОТБОР ИСТОЧНИКОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ПАТОГЕНАМ СРЕДИ ДИКИХ ВИДОВ *SOLANUM* КОЛЛЕКЦИИ *IN VITRO* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

РЕЗЮМЕ

Оценены образцы диких видов Solanum из коллекции in vitro на устойчивость к YBK, BCLK, фитофторозу. Проведен скрининг линий с использованием ДНК-маркеров. Выделены генотипы картофеля с маркерами устойчивости к фитофторозу, YBK, BCLK, а также с комплексом маркеров устойчивости к YBK и BCLK, в том числе 1 с 4-мя, 2 с 2-мя маркерами устойчивости.

Ключевые слова: картофель, YBK, BCLK, фитофтороз, устойчивость, дикие виды, молекулярные маркеры, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Картофель является одной из важнейших продовольственных культур в Республике Беларусь. В последние 20 лет в Беларуси изменения климата существенно отразились на фитопатологической ситуации на картофеле. При определенных погодных условиях фитофтороз, болезнь, вызываемая оомицетом *Phytophthora infestans*, становится основной причиной огромных потерь урожая [1, 2]. Возросла вредоносность вирусных болезней, что связано с изменением их штаммового состава, а также с изменением численности и видового состава тлей, основных переносчиков вирусов [3]. Каждый дополнительный процент поражения посадок картофеля тяжелыми формами вирусных болезней приводит к снижению урожайности клубней на 0,5–0,6 %. Вирусные болезни являются основной причиной вырождения сортов, приводя к значительным потерям урожая – до 70–85 % [4].

Наибольший интерес для селекции на устойчивость к вирусам представляет иммунитет (крайняя устойчивость, ER (extreme resistance). Этот тип устойчивости контролируется олигогенно доминантными аллелями R-генов, интроверсируемых в культурные сорта из диких видов. Привлечение в селекцию новых источников ценных генов является насущной необходимостью для селекции картофеля [2]. В коллекции диких видов *Solanum in vitro* лаборатории генетики картофеля РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству» насчитывается более 560 образцов 57 видов. Из них 6 неклубненосных видов (31 образец) и 51 вид, образующий клубни (533 образца).

Успех селекции в направлении создания сортов с комплексной устойчивостью во многом зависит от применения современных методов, с помощью которых можно

на ранних этапах идентифицировать устойчивые генотипы родительских селекционных линий. Одним из направлений, позволяющих расширить возможности традиционной селекции картофеля, оценить полиморфизм селекционного материала, является применение молекулярных ДНК-маркеров [5]. Молекулярные маркеры, тесно сцепленные с генами устойчивости, значительно интенсифицируют поиск селекционно-ценных образцов, позволяя существенно расширить выборку тестируемого материала и отобрать генотипы с комплексом олигогенов, и как результат – значительно повысить эффективность селекции и сократить временные затраты на создание новых форм картофеля [6, 7].

Целью исследования явилось изучение коллекции диких видов *Solanum in vitro* с привлечением молекулярных маркеров для отбора генотипов с генами, контролирующими устойчивость к YBK, ВСЛК и фитофторозу, а также выявление новых генетических источников, которые представляют особый интерес для использования в селекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Материалом для исследований служили 32 образца 19-ти диких видов картофеля для определения устойчивости к YBK методом прививок на инфицированные разными штаммами YBK (Y^0 , Y^N и Y^{NTN}) растения томата сорта Невский; 22 образца 14-ти диких видов картофеля для определения устойчивости к ВСЛК в условиях жесткого инфекционного фона, созданного в teste с прививкой на растения-инфекторы; 33 образца 15-ти диких видов картофеля для оценки устойчивости к фитофторозу методом отдельных листьев.

Выделенные в результате проведенных в 2016–2017 гг. исследований устойчивые и высокоустойчивые к YBK, ВСЛК, возбудителям фитофтороза образцы использовались в нашей работе по скринингу на гены устойчивости.

Оценку устойчивости к вирусным болезням проводили по методике Н. П. Скляровой, Р. В. Черепановой [8]. Выделение устойчивых к вирусам образцов дикого вида *S. acaule* осуществляли по методике А. Л. Амбросова и др. [9].

Оценку образцов коллекций картофеля по устойчивости к фитофторозу проводили в соответствии с методическими рекомендациями «Методы оценки картофеля, овощных и плодовых культур на устойчивость к болезням» [10], используя тест с кассетами [11].

Для изучения на гены устойчивости к YBK продиагностировано 13 образцов 9-ти видов картофеля: Л33-2 вида *S. michoacanum*; Л45-6, Л45-9 вида *S. bulbocastanum*; Л57-7 вида *S. pinnatisectum*; Л82-8, Л82-16, Л82-51, Л82-52 вида *S. abancayense*; Л84-8 вида *S. hondelmannii*; hcb13-1 вида *S. huancabambense*; Ig112-1 вида *S. lignicaule*; trf04-1 вида *S. trifidum*; vio14-2 вида *S. violaceimarmoratum*. К ВСЛК исследовали 10 образцов 8-ми видов: Е31-25 вида *S. raphanifolium*; Е50-2 вида *S. circaeifolium*; Л76-2, Л76-16 вида *S. vernei*; Л84-8 вида *S. hondelmannii*; Ч3, Ч4 вида *S. chaporense*; Ig112-1 вида *S. lignicaule*; NR3 вида *S. tuberosum*; vio14-2 вида *S. violaceimarmoratum*. Для определения генов устойчивости к *Phytophthora infestans* изучали 30 образцов 14-ти видов картофеля: А15, chc59-1, chc59-2, chc71-1, chc71-2 вида *S. chacoense*; Б3/Б12 вида *S. microdontum*; Е52-5, Е53-1 вида *S. circaeifolium*; Л23 вида *S. jamesii*; Л37-1, Л37-2, Л37-3 вида *S. fendleri*; Л45-3, blb2, blb3, S.b. вида *S. bulbocastanum*; Л57-7 вида *S. pinnatisectum*; Л63-2 вида *S. rybinii*; Л75-21, Л75-77 вида *S. vernei*; Л80-18, Л80-39 вида *S. neocardenasii*; agf47-1, agf47-2 вида *S. agrimonifolium*; col24-1 вида *S. colombianum*; hcb00-1, hcb06-1, hcb13-1 вида *S. huancabambense*; stp58-1, stp60-1 вида *S. stipuloideum*.

РАЗДЕЛ 2. ГЕНЕТИКА КАРТОФЕЛЯ

Для скрининга образцов картофеля к YBK использовали SCAR-маркер RYSC3 (*Ry_{ang}* от *S. tuberosum ssp. andigenum*), STS маркер Ry186 (*Ry_{chc}* от *S. chacoense*) и STS маркер Yes3-3A (*Ry_{sto}* от *S. stoloniferum*). Для определения гена PLRV1 и PLRV4 устойчивости к ВСЛК использовали SCAR-маркеры NL27 и UBC864R соответственно. Для определения генов устойчивости к *Phytophthora infestans* использовали три маркера: наличие гена *Rpi-blb1* от *S. bulbocastanum* определяли маркером Blb1-820, для идентификации гена *Rpi-R3b* от *S. demissum* использовался маркер R3b, ген *RI* от *S. demissum* идентифицировали при помощи SCAR-маркера R1 (табл. 1).

Выделение геномной ДНК из растений *in vitro* осуществляли с помощью наборов реагентов для выделения ДНК «Нуклеосорб» комплектация «С» производства фирмы «Праймтех» (Республика Беларусь) согласно протоколу производителей. 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, окрашенным бромистым этидием, с последующей регистрацией результатов с помощью оборудования системы гельдокументирования DOC-PRINT-VX2 (Германия).

Для приготовления реакционной смеси объемом 25 мкл использовали готовую смесь для ПЦР-анализа Quick-load Taq 2X Master Mix (ОДО «Праймтех», Республика Беларусь), соответствующие праймеры (прямой и обратный), матрицу ДНК и дезонизированную 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» (Республика Беларусь).

Таблица 1 – Маркеры, использованные для идентификации генов устойчивости картофеля к YBK и ВСЛК

Определяемый ген	Название маркера (праймера)	Последовательность нуклеотидов от 5' к 3' концу	Размер маркерного фрагмента
<i>Ry_{ang}</i>	RYSC3 (ADG23) F	AGGATATACGGCATCATTTTCCGA	321 п. н.
	RYSC3 (3.3.3.S) R	ATACACTCATCTAAATTGATGG	
<i>Ry_{chc}</i>	RY186F	TGGTAGGGATACTTCCCTAGA	587 п. н.
	RY186R	GCAAATCCTAGGTTATCAACTCA	
<i>Ry_{sto}</i>	YES 3-3A F	TAACCTCAAGCGGAATAACCC	341 п. н.
	YES 3-3A R	AATTCCACCTGTTACATGCTCTTGTG	
<i>PLRV1</i>	NL27 F	TAGAGAGCATTAAAGAAGCTGC	1164 п. н.
	NL27 R	TTTTGCCTACTCCGGCATG	
<i>PLRV4</i>	UBC864F	ATGATGATGATGATGATGAC	580 п. н.
	UBC864R	ATGATGATGATGATGATGAG	
<i>Rpi-blb1</i>	Blb1-820 F	AACCTGTATGGCAGTGGCATG	820 п. н.
	Blb1-820 R	GTCAGAAAAGGGCACTCGTG	
<i>Rpi-R3b</i>	R3b F	GTCGATGAATGCTATGTTCTGAGA	378 п. н.
	R3b R	ACCAGTTCTGCAATTCCAGATTG	
<i>RI</i>	R1 F	CACTCGTGACATATCCTCACTA	1400 п. н.
	R1 R	GTAGTACCTATCTTATTCTGCAAGAAT	

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате проведенных исследований по определению наличия маркеров устойчивости были получены следующие данные.

Все исследованные образцы имели в своем генотипе Ry_{sto} ген устойчивости к YBK, присутствие которого определяли с использованием маркера Yes3-3A. Из 13 проанализированных образцов наличие гена Ry_{adg} , сцепленного с маркером RYSC3 с ожидаемым размером фрагмента 321 п. н., отмечено у 6 образцов (46 %), при этом два из них относятся к одному дикому виду *S. bulbocastanum*. Частота встречаемости ДНК-маркера Ry186, сцепленного с геном устойчивости Ry_{chc} , была самой низкой – 4 образца (30 %), 3 из которых относятся к дикому виду *S. abancayense*. У образца Л84-8 дикого вида *S. hondelmannii* выявлено наличие 3-х маркеров устойчивости к YBK. По результатам скрининга, 8 образцов 5-ти диких видов (*S. abancayense*, *S. bulbocastanum*, *S. michoacanum*, *S. pinnatisectum*, *S. trifidum*) имеют в своем генотипе два маркера устойчивости к изучаемому патогену (табл. 2).

Наличие гена PLRV1 устойчивости к ВСЛК, присутствие которого определяли с использованием маркера UBC864, отмечено в 9-ти образцах, 4 из которых также дали реакцию наличия гена PLRV4, определяемого маркером NL27 (табл. 3).

Таблица 2 – Наличие маркеров устойчивости к YBK

Номер образца	Дикий вид	Маркер (ген)		
		RYSC3 (Ry_{adg})	Ry186 (Ry_{chc})	Yes3-3A (Ry_{sto})
Л82-8	<i>S. abancayense</i>		+	+
Л82-16			+	+
Л82-51				+
Л82-52			+	+
Л45-6	<i>S. bulbocastanum</i>	+		+
Л45-9		+		+
Л84-8	<i>S. hondelmannii</i>	+	+	+
hcb13-1	<i>S. huancabambense</i>			+
lgl 12-1	<i>S. lignicaule</i>			+
Л33-2	<i>S. michoacanum</i>	+		+
Л57-7	<i>S. pinnatisectum</i>	+		+
trf04-1	<i>S. trifidum</i>	+		+
vio14-2	<i>S. violaceimarmoratum</i>			+

Таблица 3 – Наличие маркеров NL27 и UBC864

Номер образца	Дикий вид	Маркер (ген)	
		NL27 (PLRV1)	UBC864 (PLRV4)
E50-2	<i>S. circaeifolium</i>	+	+
Л76-2	<i>S. vernei</i>	+	+
Л76-16		+	+
Л84-8	<i>S. hondelmannii</i>	+	
Ч3	<i>S. chaporense</i>		+
Ч4			+
lgl 12-1	<i>S. lignicaule</i>		+
vio14-2	<i>S. violaceimarmoratum</i>		+
E31-25	<i>S. raphanifolium</i>	+	+
NR3	<i>S. tuberosum</i>		+

РАЗДЕЛ 2. ГЕНЕТИКА КАРТОФЕЛЯ

В результате проведенной работы по ДНК-маркированию выделены образцы, в генотипе которых присутствует комплекс R-генов: с 4-мя генами устойчивости – Л84-8 (*S. hondelmannii*), с 2-мя генами устойчивости – lgl 12-1 (*S. lignicaule*), vio14-2 (*S. violaceimarmoratum*) (табл. 4).

Частота встречаемости ДНК-маркера Blb1-820, сцепленного с геном устойчивости *Rpi-blb1* к фитофторозу картофеля, была низкой. Он присутствовал в 3-х образцах (10 %): Л-45-3, blb3, S.b. дикого вида *S. bulbocastanum*. Данные образцы, по результатам искусственного заражения ботвы *Phytophthora infestans*, характеризуются баллом устойчивости 9 (рис. 1).

Ни в одном из изучаемых образцов не обнаружен ген устойчивости *R1*, присутствие которого определяли с использованием маркера R1, с ожидаемым размером маркерного фрагмента 1400 п. н.

Маркер R3b, сцепленный с геном *Rpi-R3b*, отмечен у одного образца blb2 дикого вида *S. bulbocastanum*, с баллом устойчивости 9 по результатам искусственного заражения (рис. 2).

Все выделенные образцы рекомендованы для использования в гибридизации как источники устойчивости к YBK, ВСЛК и фитофторозу.

Таблица 4 – Образцы диких видов с групповой устойчивостью к YBK и ВСЛК

Номер образца	Дикий вид	Маркер (ген)				
		YBK			ВСЛК	
		RYSC3 (<i>Ry_{adg}</i>)	Ry186 (<i>Ry_{chc}</i>)	Yes3-3A (<i>Ry_{sto}</i>)	NL27 (<i>PLRV1</i>)	UBC864 (<i>PLRV4</i>)
Л84-8	<i>S. hondelmannii</i>	+	+	+	+	
lgl 12-1	<i>S. lignicaule</i>			+		+
vio14-2	<i>S. violaceimarmoratum</i>			+		+

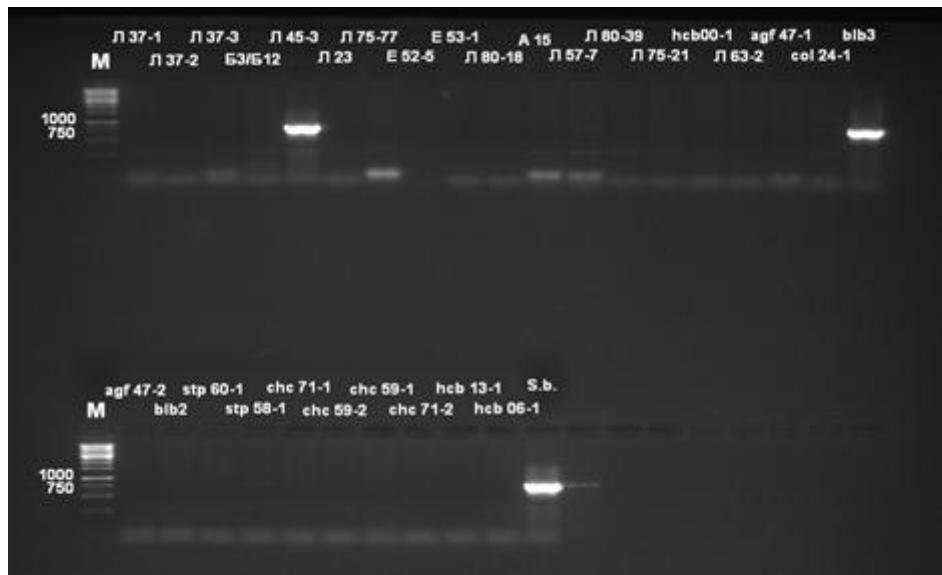


Рисунок 1 – Результаты амплификации с праймером Blb1-820: М – маркер молекулярного веса; размер маркерного фрагмента 820 п. н.

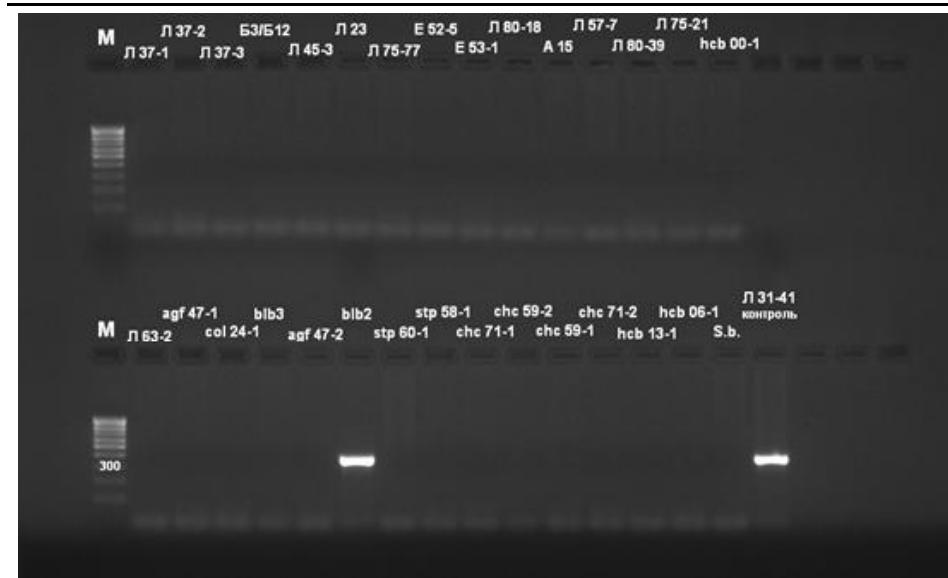


Рисунок 2 – Результаты амплификации с праймером R3b: М – маркер молекулярного веса; размер маркерного фрагмента 378 п. н.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом ПЦР-анализа оценены образцы диких видов *Solanum* из коллекции *in vitro* с помощью маркеров RYSC3 (*Ry_{adg}*), Ry186 (*Ry_{chc}*), Yes3-3A (*Ry_{sto}*), NL27 (*PLRVI*), UBC864 (*PLRVI*), Blb1-820 (*Rpi-blb1*), R1(*R1*), R3b (*Rpi-R3b*).

Выделены генотипы картофеля с наличием маркеров устойчивости к *Phytophthora infestans*: Л-45-3, *blb3*, *S.b.*, *blb2* дикого вида *S. bulbocastanum*; к YBK: образец Л84-8 дикого вида *S. hondelmannii* с наличием 3-х маркеров устойчивости, 8 образцов 5-ти диких видов (*S. abancayense*, *S. bulbocastanum*, *S. michoacanum*, *S. pinnatisectum*, *S. trifidum*), в генотипе которых определено 2 маркера устойчивости к изучаемому патогену; к ВСЛК: образцы E50-2 (*S. circaeifolium*), Л76-2, Л76-16 (*S. vernei*), E31-25 (*S. raphanifolium*) с наличием 2-х маркеров устойчивости к PLRV.

Также выделены образцы с комплексом маркеров устойчивости к YBK и ВСЛК, в том числе 1 с 4-мя генами устойчивости: Л84-8 вида *S. hondelmannii*; 2 с 2-мя генами устойчивости: *lgl 12-1* (*S. lignicaule*), *vio14-2* (*S. violaceimarmoratum*), обладающие высокой устойчивостью к изучаемым патогенам по результатам искусственного заражения.

Все выделенные образцы рекомендованы для использования в гибридизации в качестве источников устойчивости к YBK, ВСЛК и фитофторозу.

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. – 696 с.
2. Росс, Х. Селекция картофеля. Проблемы и перспективы / Х. Росс. – пер. с англ. – М. : Агропромиздат, 1989. – 183 с.
3. Изменение видового состава переносчиков вирусов картофеля по итогам многолетнего мониторинга / В. Н. Зейрук [и др.] // Картофелеводство : сб. науч. тр. / Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству ; редкол. : В. Г. Иванюк (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2008. – Т. 14. – С. 391–396.

Поступила в редакцию 23.11.2020 г.

I. A. MIHALKOVICH, YU. V. YAHONT, T. V. SEMANYUK,
A. V. CHASHINSKIY, D. V. BASHKO, A. V. KONDRATYUK

IN VITRO SELECTION OF PATHOGEN RESISTANT GENOTYPES AMONG *SOLANUM* WILD SPECIES USING DNA MARKERS

SUMMARY

The samples from *in vitro* collection of wild species *Solanum* were evaluated for resistance to PVY, PLRV, *Phytophthora infestans*. The screening of lines using DNA-markers was carried out. The genotypes of potatoes with single markers for resistance to late blight, PVY, PLRV, PLRV including 1 with 4, 2 with 2 markers of resistance, were identified.

Key words: potatoes, PVY, PLRV, *Phytophthora infestans*, resistance, wild species, DNA-markers, Belarus.