

РАЗДЕЛ 2

ГЕНЕТИКА КАРТОФЕЛЯ

УДК 635.21:631.524.86:631.527.8

<https://doi.org/10.47612/0134-9740-2021-29-51-57>

И. А. Михалькович, Д. В. Башко, А. В. Кондратюк, В. А. Козлов

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук

Беларусь по картофелеводству и плодоовощеводству»,

аг. Самохваловичи, Минский район

E-mail: geneticabelbulba@mail.ru

ВЫДЕЛЕНИЕ 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 PVX, PVY, PVS, PVM, раку картофеля, золотистой и бледной нематоде, фитофторозу. Проведен скрининг линий с использованием ДНК-маркеров. Выделены генотипы картофеля с отдельными изучаемыми маркерами генов устойчивости, также с комплексом маркеров генов устойчивости.*

Ключевые слова: картофель, устойчивость, PVX, PVY, PVS, PVM, рак картофеля, нематода, фитофтороз, дикие виды, молекулярные маркеры, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Многие дикие виды картофеля рассматриваются как перспективные источники устойчивости к разнообразным патогенам, в связи с этим оценка на наличие таких генов представляет несомненный интерес. Разработан ряд методов, позволяющих с высокой эффективностью выявлять гены, определяющие устойчивость к болезням и вредителям картофеля. Преимущество данных методов связано с возможностью проведения оценки селекционного материала по генотипу. Такая оценка, в отличие от оценки по фенотипу, несомненно, более точная, не зависит от внешних факторов, во многих случаях менее трудоемкая, ее можно применять на ранних этапах селекционного процесса, в любое время года [1, 7, 8].

Наиболее простым и эффективным является метод, основанный на полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК изучаемого организма со специфическими праймерами, называемыми также ПЦР-маркерами. ПЦР-маркеры создаются с учетом знаний последовательности участков ДНК, ассоциированных с конкретными генами, и позволяют выявлять наличие таких генов вне зависимости от их фенотипического проявления.

Селекция с использованием молекулярных маркеров находит все более широкое применение при создании источников с комплексной устойчивостью к патогенам [2, 4, 5].

В данной статье представлены результаты оценки образцов диких видов картофеля из коллекции *Solanum in vitro* на наличие гена *Rx1* или *Rx_{and}* устойчивости к PVX, двух генов устойчивости к PVY (*Ry_{and}* и *Ry_{chc}*), гена *Ns* сверхчувствительной реакции к PVS, определение гена *Rm* сверхчувствительности к PVM, гена *Sen1* иммунитета к раку картофеля

(*Synchytrium endobioticum*), генов *H1*, *Gro1-4* к золотистой картофельной нематоде (*Globodera rostochiensis*) и *Gpa2* к бледной нематоде картофеля (*Globodera pallida*), четырех генов устойчивости к фитофторозу картофеля (*Phytophthora infestans*) (*R1_{dms}*, *R3b_{dms}*, *Rpi-blb1*, *Rpi-sto1*). Целью исследования являлось выявление новых генетических источников, которые представляют особый интерес для использования в селекции [3, 6, 9].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Материалом для исследований по скринингу на гены устойчивости служили 30 образцов 12-ти диких видов картофеля из коллекции *Solanum in vitro* РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларусь по картофелеводству и плодоовощеводству» (табл. 1).

Для оценки образцов на наличие генов устойчивости к *Phytophthora infestans* проведено молекулярное маркирование со SCAR-маркером *Blb1-820*, позволяющим установить наличие гена *Rpi-blb1* устойчивости от дикого вида *S. bulbocastanum* и SCAR-маркерами *R1₁₂₀₅* и *R3b₃₇₈*, позволяющими определить одноименные гены устойчивости от *S. demissum* (*R1_{dms}*, *R3b_{dms}*). Наличие гена *Rpi-sto1* высокой долговременной устойчивости к фитофторозу от дикого вида *S. stoloniferum* определяли при помощи SCAR-маркера *Rpi-sto1-890*.

Наиболее эффективную защиту от картофельных цистообразующих нематод обеспечивают гены *H1*, *Gro1-4* и *Gpa2*. Для определения устойчивости к *Globodera rostochiensis* использовали SCAR-маркеры *N146₅₀₆*, *N195₃₃₇* и *57R₄₅₀* для идентификации гена *H1*, SCAR-маркер *Gro1-4₆₀₂*, сцепленный с геном *Gro1-4*. Для определения устойчивости к *Globodera pallida* применяли один STS-маркер *Gpa2-2₄₅₂* для идентификации гена *Gpa2*.

Один из основных доминантных генов иммунитета к патотипу 1 *Synchytrium endobioticum* является ген *Sen1*. Присутствие доминантной аллели данного гена диагностировали с помощью SCAR-маркера *NL25₁₄₀₀*, созданного на основе сиквенса RFLP-фрагмента с таким же названием.

Скрининг исследуемого материала на наличие R-генов устойчивости к PVY проводили с использованием SCAR-маркера *RYSC3₃₂₁* для идентификации гена *Ry_{adg}* и STS-маркера *Ry364₃₇₀* для определения гена *Ry_{chc}*.

Таблица 1 – Изученные образцы диких видов *Solanum* коллекции *in vitro*

Вид	Аббревиатура	Номер образца	Номер линии
<i>S. acaule</i>	acl	Л46	1,11,17
<i>S. andigenum</i>	adg	A3	A3
<i>S. bulbocastanum</i>	blb	S.b.	S.b.
		Л45	3,7
<i>S. chacoense</i>	chc	A	A6, A15
<i>S. demissum</i>	dms	Л31	36,41
		Л68	9
<i>S. jamesii</i>	jam	Л23	Л23
<i>S. polyadenium</i>	pld	Л39	2,5,11
<i>S. phureja</i>	phu	394ZP35/ivp35	ivp35
		231ZP48/ivp48	Ivp48
<i>S. stoloniferum</i>	sto	Л32	5,8,10
		S.st	S.st
<i>S. tarijense</i>	tar	Л77	20,23
<i>S. vernei</i>	vrn	D54	D54
		Л75	15,16,17
<i>S. verrucosum</i>	ver	Л70	4
		Л71	3

РАЗДЕЛ 2. ГЕНЕТИКА КАРТОФЕЛЯ

Крайняя устойчивость к вирусу X интрагрессирована в культурные сорта картофеля из полукультурного вида *S. tuberosum ssp. andigena*. Для определения гена *Rx1* или *Rx_{and}* использовали аллель-специфический маркер 221R и маркер PVX.

Определение гена *Rm* сверхчувствительности к вирусу M проводили с использованием пары маркеров SCAR-маркер SC878₈₈₅ и ISSR-маркер UBC822₁₀₇₉.

Устойчивость к PVS передана в культурный картофель от *S. andigenum* – источника гена *Ns* сверхчувствительной реакции, определяли данный ген с использованием ISSR-маркера UBC811₆₆₀ (табл. 2).

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 производителя. Качество полученной ДНК определяли проведением ПЦР-реакции с праймерами ВСН, являющимися

Таблица 2 – Характеристика маркеров R-генов устойчивости картофеля, использованных в работе

Определяемый ген	Название маркера	Нуклеотидная последовательность праймера от 5` к 3`	Размер маркерного фрагмента (п. н.-пар нуклеотидов)
<i>Rx1</i>	221 R F	GCTTACATTGCTCGAAGAAGCCAC	800
	221R R	CCTTAATAATCAATAGATTCAACTCG	
<i>Rx_{and}</i>	PVX F	ATCTTGGTTTGAATACATGG	1230
	PVX R	CACAATATTGGAAGGATTCA	
<i>Ry_{adg}</i>	RYSC3 (ADG23) F	AGGATATAACGGCATCATTTTCCGA	321
	RYSC3 (3.3.3.S) R	ATACACTCATCTAAATTGATGG	
<i>Ry_{chc}</i>	Ry364 F	CTATTATAAGTCTGGTACTAGGACG	370
	Ry364 R	GGCTATATGTTCAATGAATTGATGCTAA	
<i>Ns</i>	UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	660
<i>Rm</i>	UBC822	TCTCTCTCTCTCTCA	1079
<i>Rm</i>	SC878 F	GGATGGATGGATGAGGAGGAAACT	885
	SC878 R	CCGACTAGCGATTGGATGC	
<i>Sen1</i>	NL25F	TATTGTTAACCGTTACTCCCTC	1400
	NL25R	AGAGTCGTTTACCGACTCC	
<i>H1</i>	N 146 F	AAGCTCTGCCTAGTGCTC	506
	N 146 R	AGGCAGAACATGCCATG	
	N 195 F	TGGAAATGGCACCCACTA	337
	N 195R	CATCATGGTTCACTTGTAC	
	57 F	TGCCTGCCTCTCCGATTCT	450
	57 R	GGTTCAGCAAAGCAAGGACGTG	
<i>Gro1-4</i>	Gro 1-4 F	AAGCCACAACTCTACTGGAG	602
	Gro 1-4 R	GATATAGTACGTAATCATGCC	
<i>Gpa2</i>	Gpa 2-1 F	TTTAGCACGGAATGTGGGAA	452
	Gpa 2-1 R	GTTTCCCCATCAAAACTCAC	
<i>Rpi-blb 1</i>	Blb1-820 F	AACCTGTATGGCAGTGGCATG	820
	Blb1-820 R	GTCAGAAAAGGGCACTCGTG	
<i>R1_{dms}</i>	R1 F	CACTCGTACATATCCTCACTA	1205
	R1 R	GTAGTACCTATCTTATTCTGCAAGAAT	
<i>R3b_{dms}</i>	R3b F	GTCGATGAATGCTATGTTCTCGAGA	378
	R3b R	ACCAAGGCCACAAGATTCTC	
<i>Rpi-sto1</i>	Rpi-sto1-890 F	ACCAAGGCCACAAGATTCTC	890
	Rpi-sto1-890 R	CCTGCGGTTCGGTTAATACA	

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

В результате проведенных исследований по определению наличия ДНК-маркеров на гены устойчивости к PVX, PVY, PVS, PVM, раку картофеля, золотистой и бледной нематоде, фитофторозу картофеля были получены данные, приведенные в таблице 3.

С высокой частотой представлен маркер Ry364 (90 % – 27 образцов), позволяющий выявлять ген устойчивости к YBV (Ry_{cho}). Относительно высокой является частота в популяциях другого гена – Ry_{and}, определяемого маркером RYSC3 с ожидаемым размером фрагмента 321 пара нуклеотидов. Этот ген устойчивости к Y-вирусу картофеля присутствовал в 20 образцах (66,7 %). Отмечена низкая частота встречаемости маркера 221R, сцепленного с геном устойчивости Rx₁ (13,3 %), и нулевая встречаемость маркера PVX, сцепленного с геном устойчивости Rx_{and} отвечающих за устойчивость к X-вирусу картофеля.

Частота встречаемости ДНК-маркера UBC811, определяющего ген устойчивости Ns к PVS, была невысокой и составила 23,3 %, однако следует отметить, что все изучаемые образцы видов *S. acaule* и *S. demissum* показали наличие изучаемого маркера в своем генотипе, что вызывает интерес дальнейшего изучения данных видов в этом направлении.

При изучении наличия маркеров UBC822 и SC878 устойчивости к PVM, определяющих ген Rm, в каждом генотипе выбранных для изучения образцов четырех диких видов картофеля отмечен отклик на маркер SC878: *S. phureja* (2 образца), *S. polyadenium* (3 образца), *S. vernei* (4 образца), *S. verrucosum* (2 образца). В общей сложности выделено 14 образцов (49,7 %), имеющих по результатам скрининга в своем генотипе маркер SC878, и один образец с маркером UBC822 – A3 (*S. andigenum*).

Наличие гена устойчивости *Sen1* к раку картофеля, присутствие которого определяли с использованием маркера NL25, отмечено в 21-м образце (70 %). Отсутствовал маркер во всех изучаемых образцах диких видов *S. polyadenium*, *S. bulbocastanum*, *S. demissum*, *S. jamesii*, что может говорить о неперспективности изучения образцов этих видов в данном направлении.

По результатам скрининга на наличие гена *H1* устойчивости к золотистой картофельной нематоде отобрано 6 образцов. Образец D54 дикого вида *S. vernei* имеет в своем генотипе три маркера генов устойчивости: N146, N195, 57R; образец А6 дикого вида *S. chacoense* – два маркера устойчивости: N146, N195. Наличие гена *Gro1-4*, определяемого маркером *Gro1-4*, отмечено в 15 образцах (50 %). В одном изучаемом

Таблица 3 – Наличие (+) или отсутствие (-) молекулярных маркеров устойчивости

Образец	PVX		PVY		PVS		PVM		Pak		Нематода		Фитофтороз картофеля			
	221R	PVX	RYSC3	Ry364	UBC811	UBC822	SC878	N125	N146	N195	57R	Gpa2-2	Bib1-820	R1	R3b	Rpi-sto1-890
Ivp48	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
J175-15	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
J175-16	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
A3	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
J132-8	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
J146-17	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
J139-2	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J145-7	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J170-4	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J168-9	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
S.st	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D54	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ivp35	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A6	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
J177-20	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
J171-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J175-17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J177-23	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J139-5	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J132-5	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
J139-11	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
J146-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J145-3	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S.b	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
A15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J131-36	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J131-41	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J123	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J132-10	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
J146-11	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

образце D54 (*S. vernei*) был обнаружен маркер Gpa2-2 гена устойчивости *Gpa2* к бледной картофельной нематоде.

Частота встречаемости ДНК-маркера Blb1-820, сцепленного с геном устойчивости *Rpi-blb1* к фитофторозу картофеля, была низкой. Он присутствовал в 4-х образцах (13,3 %): Л-45-7, Л45-3, S.b. (*S. bulbocastanum*), S.st (*S. stoloniferum*). Маркеры R1 и R3b, определяющие одноименные гены устойчивости к фитофторозу от *S. demissum*, установлены в 3-х (10 %) и 7-ми (23,3 %) образцах соответственно. Наличие гена *Rpi-sto-1* высокой долговременной устойчивости к фитофторозу от дикого вида *S. stoloniferum*, определяемого при помощи SCAR-маркера Rpi-sto-1-890, отмечено в 3-х (10 %) образцах: Л45-7, Л45-3, S.b. от дикого вида *S. bulbocastanum*.

В результате проведенной работы по ДНК-маркированию выделены генотипы картофеля с наличием отдельных маркеров генов устойчивости по изучаемым признакам, также с комплексом маркеров генов устойчивости от двух до восьми в одном генотипе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ коллекции диких видов картофеля в культуре *in vitro* на наличие ряда ПЦР-маркеров (221R, PVX, RYSC3, Ry364, UBC811, UBC822, SC878, NL25, N146, N195, 57R, Gro1-4, Gpa2-2, Blb1-820, R1, R3b, Rpi-sto1-890) показал перспективность поиска материала с комплексом генов устойчивости к ХВК, YBK, SBK, MBK, раку картофеля, золотистой и бледной нематоде, фитофторозу картофеля для дальнейшего использования в селекционной работе.

Выделены образцы, в генотипе которых присутствует комплекс R-генов: Л32-10 (*S. stoloniferum*) – восемь генов устойчивости: *Ry_{adg}*, *Ry_{chc}* (к YBK), *Ns* (к SBK), *Rm* (к MBK), *Sen1* (к раку картофеля), *H1*, *Gro1-4* (к золотистой картофельной нематоде), *R3b_{dms}* (к фитофторозу картофеля); Л31-41, Л68-9 (*S. demissum*), D54 (*S. vernei*) – семь генов; А3 (*S. andigenum*), Л31-36 (*S. demissum*) – шесть генов. У 6-и образцов присутствовали пять генов устойчивости, у 11-ти образцов – четыре, у 4-х – три гена и 3 образца выделены с двумя генами устойчивости. Отмечены дикие виды *S. acaule* и *S. demissum*, представляющие интерес для дальнейшего изучения образцов на наличие гена устойчивости *Ns* к PVS.

Все выделенные образцы рекомендованы для использования в гибридизации в качестве источников устойчивости к ХВК, YBK, SBK, MBK, раку картофеля, золотистой и бледной картофельной нематоде, фитофторозу картофеля.

Список литературы

1. Barone, A. Molecular marker-assisted selection for potato breeding / A. Barone // American Journal of Potato Research. – 2004. – Vol. 81, № 2. – P. 111–117.
2. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato / C. Gebhardt [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2006. – Vol. 112. – P. 1458–1464.
3. 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.
4. Диплоидные гибриды между диким аллотетраплоидным видом картофеля *Solanum stoloniferum* и диплоидными клонами культурного картофеля *S. tuberosum*, имеющие геном дикого вида / А. П. Ермишин [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2017. – Т. 61. – № 5. – С. 80–89.
5. Использование RAPD-маркеров в интродукции селекции картофеля на диплоидном уровне / Е. В. Воронкова [и др.] // Картофелеводство : сб. науч. тр. / Науч.-практ.

центр Нац. акад. наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству. – Минск, 2007. – Т. 12. – С. 28–37.

6. Оценка исходного материала картофеля по составу и аллельному состоянию генов устойчивости к болезням и вредителям с целью оптимизации подбора родительских форм для гибридизации : метод. рекомендации / А. П. Ермишин [и др.] ; под ред. А. П. Ермишина ; Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2016. – 56 с.

7. Оценка коллекции дигаплоидов *Solanum tuberosum* на наличие R-генов к комплексу патогенов картофеля с помощью ПЦР-анализа / Е. В. Воронкова [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, 2009. – Т. 16. – С. 6–21.

8. Поиск источников генов устойчивости к патогенам среди образцов селекционно-генетических коллекций ВНИИКХ с использованием молекулярных маркеров / В. А. Бирюкова [и др.] // Защита картофеля. – 2015. – Т. 1. – С. 3–7.

9. Устойчивость картофеля к карантинным болезням / А. В. Хютти [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – № 21 (1). – С. 51–61.

Поступила в редакцию 19.10.2021 г.

I. A. MIHALKOVICH, D. V. BASHKO, A. V. KONDRATYUK,
V. A. KOZLOV

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

SUMMARY

*The samples from the in vitro collection of wild *Solanum* species were evaluated for resistance to PVX, PVY, PVS, PVM, *Synchytrium endobioticum*, *Globodera rostochiensis*, *Globodera pallida*, *Phytophthora infestans*. The screening of lines using DNA markers was carried out. The genotypes of potatoes with a single marker and with a complex of markers of resistance genes were identified.*

Key words: potatoes, resistance, PVX, PVY, PVS, PVM, *Synchytrium endobioticum*, *Globodera rostochiensis*, *Globodera pallida*, *Phytophthora infestans*, wild species, DNA markers, Belarus.