

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

Беларуси 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 нематод, 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 представят 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 Беларуси 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 интрогрессирована 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 М 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	GCTTACATTTGCTCGAAGAAGCCAC	800
	221R R	CCTTAATAATCAATAGATTCAACTCG	
<i>Rx_{and}</i>	PVX F	ATCTTGGTTTGAATACATGG	1230
	PVX R	CACAATATTGGAAGGATTCA	
<i>Ry_{adg}</i>	RYSC3 (ADG23) F	AGGATATACGGCATCATTTTCCGA	321
	RYSC3 (3.3.3.S) R	ATACACTCATCTAAATTTGATGG	
<i>Ry_{chc}</i>	Ry364 F	CTATTATAAGTCTGGTACTAGGACG	370
	Ry364 R	GGCTATATGTTCAATGAATTCATGCTAA	
<i>Ns</i>	UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	660
<i>Rm</i>	UBC822	TCTCTCTCTCTCTCA	1079
<i>Rm</i>	SC878 F	GGATGGATGGATGAGGAGGAAACT	885
	SC878 R	CCGACTAGCGATTTGGATGC	
<i>Sen1</i>	NL25F	TATTGTTAATCGTTACTCCCTC	1400
	NL25R	AGAGTCGTTTTACCGACTCC	
<i>H1</i>	N 146 F	AAGCTCTTGCCTAGTGCTC	506
	N 146 R	AGGCGGAACATGCCATG	
	N 195 F	TGGAAATGGCACCCACTA	337
	N 195R	CATCATGGTTTCACTTGTCAC	
	57 F	TGCCTGCCTCTCCGATTTCT	450
	57 R	GGTTCAGCAAAAGCAAGGACGTG	
<i>Gro1-4</i>	Gro 1-4 F	AAGCCACAACCTCTACTGGAG	602
	Gro 1-4 R	GATATAGTACGTAATCATGCC	
<i>Gpa2</i>	Gpa 2-1 F	TTTAGCACGGAATGTGGGGA	452
	Gpa 2-1 R	GTTTCCCCATCAAACTCAC	
<i>Rpi-blb 1</i>	Blb1-820 F	AACCTGTATGGCAGTGGCATG	820
	Blb1-820 R	GTCAGAAAAGGGCACTCGTG	
<i>R1_{dms}</i>	R1 F	CACTCGTGACATATCCTCACTA	1205
	R1 R	GTAGTACCTATCTTATTTCTGCAAGAAT	
<i>R3b_{dms}</i>	R3b F	GTCGATGAATGCTATGTTTCTCGAGA	378
	R3b R	ACCAGTTTCTTGCAATTCCAGATTG	
<i>Rpi-sto1</i>	Rpi-sto1-890 F	ACCAAGGCCACAAGATTCTC	890
	Rpi-sto1-890 R	CCTGCGGTTTCGGTTAATACA	

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 геледокументирования 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. Используемые 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 нематоды, фитофторозу картофеля были получены данные, приведенные в таблице 3.

С высокой частотой представлен маркер Ry364 (90 % – 27 образцов), позволяющий выявлять ген устойчивости к YBK (Ry_{chc}). 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 Rx_1 (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 нематоды отобрано 6 образцов. Образец D54 дикого вида *S. vernei* имеет в своем генотипе три маркера генов устойчивости: N146, N195, 57R; образец A6 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	Рак		Нематода				Фитофтороз картофеля					
	221R	PVX	RYSC3	Ry364	UBC811	UBC822	SC878	NI25	NI46	NI95	57R	Gro1-4	Gpa2-2	Blb1-820	R1	R3b	Rpi-sto1-890
Ipr48	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Л175-15	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Л175-16	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
A3	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Л132-8	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Л146-17	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Л139-2	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Л145-7	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Л170-4	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Л168-9	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
S.st	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
D54	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
Ivp35	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
A6	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Л177-20	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Л171-3	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Л175-17	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Л177-23	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Л139-5	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Л132-5	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Л139-11	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Л146-1	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Л145-3	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
S.b	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
A15	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Л131-36	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
Л131-41	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
Л123	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Л132-10	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Л146-11	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

образце D54 (*S. vernei*) был обнаружен маркер Gra2-2 гена устойчивости *Gra2* 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 %): Л45-7, 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, Gra2-2, Blb1-820, R1, R3b, Rpi-sto1-890) показал перспективность поиска материала с комплексом генов устойчивости к ХБК, УБК, СБК, МБК, раку картофеля, золотистой и бледной нематодой, 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 УБК), *Ns* (к СБК), *Rm* (к МБК), *Sen1* (к раку картофеля), *H1*, *Gro1-4* (к золотистой картофельной нематодой), *R3b_{dm}* (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 ХБК, УБК, СБК, МБК, раку картофеля, золотистой и бледной картофельной нематодой, 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. Ермашин [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2017. – Т. 61. – № 5. – С. 80–89.
5. Использование RAPD-маркеров в интрогрессивной 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.