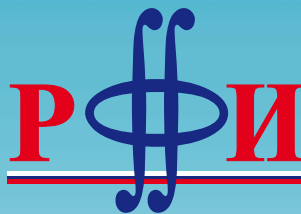




РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК



РОССИЙСКИЙ ФОНД  
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

## **МАТЕРИАЛЫ конференции**

### **ОРИЕНТИРОВАННЫЕ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ РЕАЛИЗАЦИЯ в АПК России**

28–30 октября 2009 года

Сергиев Посад 2009

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО  
РАЗНООБРАЗИЯ КУЛЬТУРНЫХ И ДИКИХ ВИДОВ КАРТОФЕЛЯ  
ПО УСТОЙЧИВОСТИ К ВИРУСНЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ И К РАКУ  
НА ОСНОВЕ СОВРЕМЕННЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ  
И ФИТОПАТОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ (08-04-13747)**

**Гавриленко Т.А.<sup>1</sup>, Афанасенко О.С.<sup>2</sup>, Антонова О.Ю.<sup>1</sup>,  
Рогозина Е.В.<sup>1</sup>, Хютти А.В.<sup>2</sup>, Шувалов О.Ю.<sup>1</sup>,  
Исламшина А.Р.<sup>1</sup>, Чалая Н.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ГНУ ГНЦ Всероссийский НИИ Растениеводства им. Н.И. Вавилова  
190000, С. Петербург, ул. Большая Морская, д. 44

<sup>2</sup>ГНУ Всероссийский НИИ Защиты растений  
196608, С. Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д.3  
Тел.: (812)4664404, факс: (812)5718762, E-mail: tatjana9972@yandex.ru

Задача повышения эффективности отбора новых источников и доноров для создания сортов, устойчивых к различным патогенам, особенно актуальна для картофеля. Потери урожая у восприимчивых сортов картофеля от таких заболеваний как рак и фитофтороз могут достигать 100% и от вирусных заболеваний – 80%.

Метод маркер вспомогательной селекции (MAS), основанный на использовании ДНК маркеров, тесно сцепленных с генами устойчивости, значительно интенсифицирует поиск и отбор растений, устойчивых к патогенам, позволяя: существенно увеличить выборку тестируемого материала; одновременно отбирать генотипы, потенциально устойчивые к разным патогенам, и как результат – значительно сократить временные затраты на создания новых форм с групповой устойчивостью [4]. Задачей настоящего исследования является изучение генетического разнообразия селекционных сортов, культурных и диких видов картофеля по устойчивости к вирусным (УВК, ХВК) и грибным (рак картофеля) заболеваниям на основе использования MAS и традиционных методов фитопатологического анализа.

*Материал* для исследования включал 107 селекционных сортов, 38 чилийских и 95 андийских аборигенных сортов, 177 об-

разцов культурных видов и 108 образцов диких видов картофеля.

*Фитопатологическая оценка устойчивости образцов картофеля к вирусным болезням* включала оценку образцов на наличие полевой устойчивости к мозаичным вирусам Y и X картофеля (YBK, XBK) с использованием метода иммуноферментного анализа (ELISA). Часть образцов была протестирована в теплице традиционными методами искусственного заражения – с использованием механической инокуляции и методом прививок. Для приготовления вирусного инокулюма использованы растения-накопители *Nicotiana tabacum* (сорт Samsun). Использованы обычный штамм XBK (источник инфекции сорт Osa, INAR, Roland), обычный штамм YBK (сорт Детскосельский), некротический штамм YBK (сорт Wilga). Диагностику вирусного поражения осуществляли методом ELISA спустя 4-5 недель после инокуляции. У растений определяли следующие типы реакции на вирусную инфекцию: восприимчивость, сверхчувствительность, полевую устойчивость и устойчивость при искусственном заражении.

*Фитопатологическая оценка устойчивости образцов к возбудителю рака картофеля – *Synchytrium endobioticum** включала оценку образцов двумя методами: 1) заражение ростков клубней испытуемых образцов от свежих раковых наростов, содержащих быстропрорастающие летние зооспорангии; 2) заражение клубней в “компосте”, содержащем зимние зооспорангии патогена. Для оценки ракоустойчивости учитывали: тип некроза на ростках клубней; стадия развития и количество зооспорангиев *S. endobioticum*. Использовали шкалу ОЕРР/ЕРРО. Для идентификации патотипного состава трех географических популяций (московской, белорусской и украинской) *S. endobioticum*, использовали объединенный тест-набор, состоящий из 20 сортов-дифференциаторов различного происхождения.

MAS. Все генотипы, участвующие в фитопатологической оценке, были в дальнейшем использованы и в молекулярном скрининге.

В настоящей работе были использованы маркеры, разработанные для молекулярного скрининга сортов картофеля по устойчивости к ХВК и УВК, а именно: CAPS маркеры CP60/DdeI<sub>350</sub> и GP122/EcoRV<sub>406</sub>, тесно сцепленные с генами *Rx1* и *Ry-f<sub>sto</sub>* соответственно, локализованными в XII хромосоме, и SCAR-маркер гена *Ry<sub>adg</sub>* (RYSC3), картированного в XI хромосоме [1, 3, 6, 8].

*Результаты фитопатологической оценки полевой устойчивости картофеля к УВК и ХВК.* Установлено, что в условиях естественного распространения инфекции 111 (63%) из 177 протестированных образцов культурных видов были поражены УВК. Растения диких видов картофеля были поражены УВК в меньшей степени (26%). ХВК поражает культурный картофель значительно реже (4%). Установлены случаи смешанной инфекции – поражения образцов культурных видов картофеля обоими вирусами. Образцы с полевой устойчивостью к УВК и ХВК в дальнейшем изучали с применением методов искусственного заражения.

*Результаты фитопатологической оценки устойчивости картофеля к УВК и ХВК при искусственном заражении.* Установлено, что при искусственном заражении растений методом механической инокуляции из 74 протестированных образцов 42 – оказались устойчивы к ХВК. Устойчивыми при искусственном заражении ХВК были все изученные образцы видов *S.curtilobum*, *S.juzepczukii* и значительная часть образцов видов *S.andigenum* (50%), *S.stenotomum* (60%), *S.chaucha* (86%). Наименее устойчивыми к ХВК при искусственном заражении были образцы видов *S.goniocalyx* и *S.tuberosum* (18–27%). Среди диких видов устойчивость к ХВК выявлена у 12 из 13 образцов, относящихся к 6 видам. Выявлены устойчивые к ХВК генотипы среди образцов 6 диких видов (*S.acaule*, *S.canasense*, *S.hondelmanii*, *S.oplocense*, *S.spegazzinii*, *S.vidaurrei*).

Проведено искусственное заражение УВК 68 генотипов 10 образцов видов *S.stoloniferum* и *S.pinatisectum*. У всех протестиро-

ванных образцов выявлены генотипы со сверхчувствительным и крайним типом устойчивости к ЮБК.

*Результаты фитопатологической оценки ракоустойчивости картофеля.* Определено, что три исследованные популяции возбудителя рака картофеля *S. endobioticum* принадлежат к первому патотипу. При оценке ракоустойчивости видообразцов картофеля для инокуляции использована московская популяция паразита, отличающаяся наибольшей агрессивностью. Проведена оценка на ракоустойчивость 48 коллекционных образцов картофеля методом заражения ростков клубней от свежих раковых наростов; 24 образца из этой выборки были оценены на ракоустойчивость методом заражения в “компосте”. При оценке устойчивости методом заражения от свежих раковых наростов выявлено 39 устойчивых образцов (1,2 группы по ОЕПП/ЕРРО), 5 – слабо устойчивых (3 группа) (к-8865, к-8863, к-8890 *S.goniocalyx*; к-9889 *S.stenotomum*; к-1726 *S.andigenum*) и 3 восприимчивых (группа 4) (к-8875 *S.goniocalyx*; к-2892 *S.andigenum*; к-7573 *S.tuberosum*). В осенне-зимний период 2009-2010 гг. будет продолжена оценка ракоустойчивости образцов.

*MAS с использованием маркеров RYSC3 и GP122-EcoRV<sub>406</sub> для отбора генотипов, несущих гены  $Ry_{adg}$  и  $Ry_{fsto}$  соответственно, контролирующую устойчивость к ЮБК.*

*Маркер RYSC3.* В настоящем исследовании маркерный фрагмент RYSC3–320 был детектирован у устойчивых сортов Эффект и Брянский деликатес. По литературным данным, фрагмент RYSC3-320 является маркером гена  $Ry_{adg}$ , локализованного в XI хромосоме и интрогрессированного в сорта от культурного вида *S.tuberosum* ssp. *andigena* [1, 4]. Также известно, что в непосредственной близости от гена  $Ry_{adg}$  локализован ген устойчивости к ЮБК –  $Ry_{sto}$ , идентифицированный у дикого мексиканского вида *S.stoloniferum* [2, <http://www.gabipd.org/database/maps.shtml>].

Среди изученных нами форм *S.tuberosum* ssp. *andigena* маркерный фрагмент RYSC3–320 встречался крайне редко (2% изученных образцов), однако данный маркер оказался широко представлен у *S.stoloniferum* и у других мексиканских видов – *S.demissum*, *S.tarnii*. Все образцы, у которых был идентифицирован маркерный фрагмент RYSC3–320, обладали полевой устойчивостью к YBK.

Полученные нами данные указывают на возможность использования маркера RYSC3 для детекции генов устойчивости к вирусу Y, интрогрессированных как от *S. stoloniferum*, так и от *S. tuberosum* subsp. *andigena*. Следует также отметить, что в последнее время появились данные от том, что картированные в XI хромосоме гены *Ry<sub>sto</sub>* и *Ry<sub>adg</sub>* на самом деле являются одним и тем же геном [8].

*Маркер GP122-EcoRV<sub>406</sub>*. По литературным источникам маркер GP122-EcoRV<sub>406</sub> тесно сцеплен с геном *Ry-f<sub>sto</sub>* XII хромосомы [8]. Данный маркер был обнаружен нами у селекционных сортов Брянский красный, Сокольский и Юбилей Жукова, а также у 6 андийских аборигенных сортов. Фрагмент GP122-EcoRV<sub>406</sub> выявлен у 3х из 8ми изученных образцов *S.stoloniferum*. Кроме того, данный фрагмент присутствовал у ряда образцов других диких видов.

Все образцы диких видов, у которых был детектирован фрагмент GP122-EcoRV<sub>406</sub>, оказались устойчивы к YBK. Однако для ряда генотипов, выявленных среди образцов культурных видов [*S. chaucha* (14 образцов) и *S. stenotomum* (7 образцов)], однозначной связи между наличием у них маркера GP122-EcoRV<sub>406</sub> и устойчивостью к YBK картофеля выявлено не было.

*Маркер CP60/DdeI<sub>350</sub>* тесно сцеплен с геном *Rx1* XII хромосомы, используется для скрининга сортов устойчивых к ХБК [4]. Данный маркер был обнаружен нами у селекционных сортов Незабудка и Алиса. Среди изученных видообразцов, фрагмент

CP60/DdeI<sub>350</sub> встречался как у устойчивых, так и у чувствительных к ХВК форм.

Начаты исследования по молекулярному скринингу образцов выборки с использованием маркера *Nl-25*, сцепленного с геном *SenI*, контролирующим устойчивость к патотипу 1 *S. endobioticum*.

### Заключение

1. Выявлен ряд селекционных сортов с маркерными компонентами генов, контролирующих устойчивость к YBK(*Ry<sub>adg</sub>*, *Ry<sub>f<sub>sto</sub></sub>*) или ХВК (*RxI*).

2. Среди изученных видообразцов картофеля выявлены генотипы, обладающие маркерами к разным генам, контролирующим устойчивость к вирусу Y (например, у образцов *S. stoloniferum* к-3360 и к-3533), а также генотипы с маркерами *R* генов устойчивости к разным вирусам – Y и X (*S. megistacrolobum* к-12550). Объединение в одном генотипе нескольких *R* генов обуславливает устойчивость таких форм к различным штаммам вирусов. Данные генотипы перспективны в селекции новых сортов картофеля устойчивых к разным вирусам.

3. Полученные нами данные показали, что часть маркеров, разработанных ранее для селекционных сортов картофеля, оказалась недостаточно эффективна при скрининге широкого видового разнообразия. Для поиска потенциально устойчивых форм среди образцов коллекции целесообразно использовать максимально возможное количество маркеров. Такой подход позволит также отобрать генотипы с групповой устойчивостью, в том числе, и к неродственным патогенам.

### Литература

- Bendahmane A., Kanyuka K., Baulcombe D.// Theor. Appl. Genet. 1997. 95: 153-162.  
Brigneti G., Garcia-Mas J., Baulcombe D.// Theor. Appl. Genet. 1997. 94: 198-203.  
Flis B., Hennig J., Strzelczyk-Zyta1 D., Gebhardt C., Marczewski W.// Molecular Breeding. 2005. 15: 95-101.

Gebhardt C., Bellin A., Henselewski A., Lehmann W., Schwarzfischer A., Valkonen J.//Theor.Appl.Genet.2006. 112: 1458–1464.

Hämäläinen J., Watanabe K., Valkonen J., Arihira A., Plaisted R., Pehu E., Miller L., Slack S.// Theor. Appl. Genet. 1997. 94: 192-197.

Kasai K., Morikawa Y., Sorri V., Valkonen J., Gebhardt C., Watanabe K.// Genome. 2000. 43: 1-8.

Song Y., Hepting L., Schweizer G., Hartl L., Wenzel G., Schwarzfischer A.// Theor. Appl. Genet. 2005. 111: 879–887.

Valkonen J., Wiegmann K., Hämäläinen J., Marczewski W., Watanabe K.// Annals of applied Biology. 2008. 152: 121-130.