

БИОЛОГИЯ

УДК 577.21:632.38:635.21:631.524.86

Е. А. ВОЛУЕВИЧ, Н. В. ПАВЛЮЧУК

ОТБОР УСТОЙЧИВЫХ К М-ВИРУСУ ГЕНОТИПОВ КАРТОФЕЛЯ
(*SOLANUM TUBEROSUM*) С ПОМОЩЬЮ ПЦР

(Представлено членом-корреспондентом А. В. Кильчевским)

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

Поступило 12.03.2014

Введение. М-вирус картофеля является одним из наиболее распространенных вирусов, поражающих эту культуру практически во всех районах выращивания [1–4]. Наряду с Y- и L-вирусами он включен в «Перечень особо опасных вредителей, болезней растений и сорняков» Республики Беларусь [5]. М-вирус картофеля может снижать урожай клубней на 40–75 %, а при смешанной инфекции и более [6].

Наиболее перспективный способ защиты картофеля от виروزов – выведение и возделывание устойчивых сортов. Для оптимизации селекции необходимо иметь доноры с генами устойчивости, к которым разработаны молекулярные маркеры. Устойчивость к М-вирусу контролируется двумя известными генами. Ген *Rm* индуцирует сверхчувствительную реакцию, однако после механической инокуляции на листьях устойчивых сортов могут появляться некротические пятна. Ген *Gm* обуславливает крайнюю устойчивость к М-вирусу картофеля, поэтому в сортах картофеля с данным геном вирус не распространяется после механической инокуляции. Для идентификации этих генов Marczewski с соавт. предложили несколько ПЦР-маркеров [7]. Однако остается открытым вопрос о том, какие из известных маркеров лучше подходят для отбора устойчивых к М-вирусу генотипов. В связи с этим нашей целью являлась разработка методов детекции генов устойчивости к М-вирусу картофеля и использование их для поиска источников резистентности к этому патогену.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования служили сорта картофеля отечественной и зарубежной селекции, а также гибриды, созданные в РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству» и отобранные как устойчивые к М-вирусу на искусственном инфекционном фоне.

Выделение и очистку ДНК проводили с использованием готовых наборов Genomic DNA Purification Kit (Thermoscientific, EU) согласно методике, предлагаемой производителем, с внесением определенных модификаций.

Идентификацию генов *Rm* и *Gm* осуществляли с помощью оптимизированных нами методик, предложенных Marczewski с соавт. [7]. Они основаны на использовании SCAR маркера SC878₈₈₅, сцепленного с геном *Gm*, а также трех маркеров к гену *Rm*: GP250₅₁₀, GP283₃₂₀, UBC822₁₀₇₉.

Результаты и их обсуждение. ПЦР-анализ сортов и гибридов с использованием маркера SC878₈₈₅ к гену *Gm* показал наличие диагностического фрагмента длиной 885 п. н. только у двух гибридов 1М-8 и 1М-9, отобранных как устойчивые на инфекционном фоне к М-вирусу (рис. 1). Полученные результаты согласуются с данными польских исследователей, которые указывают на то, что ген *Gm* пока присутствует только в селекционном материале [8; 9].

Для выявления гена *Rm* была проведена оценка эффективности использования CAPS маркеров GP250₅₁₀, GP283₃₂₀, GP38, SC864₈₁₆, а также ISSR маркера UBC822₁₀₇₉. Положительными кон-

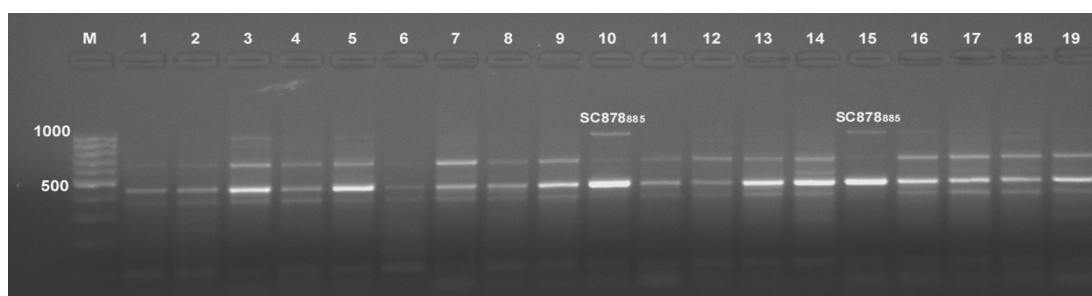


Рис. 1. Результаты разделения методом электрофореза продуктов амплификации ДНК сортов и гибридов картофеля с маркером SC878₈₈₅; M – маркер молекулярного веса (100–1000 п. н.); лунка 1 – сорт Янка; 2 – Блакит; 3 – Рагнеда; 4 – Дельфин; 5 – Синтез; 6 – Явар; 7 – Росинка; 8 – Одиссей; 9 – Выток; 10 – гибрид 1М-8; 11 – Ponto; 12 – Арта; 13 – Веснянка; 14 – Нептун; 15 – гибрид 1М-9; 16 – Журавинка; 17 – Криница; 18 – Живица; 19 – Бриз. При наличии гена *Gm* амплифицируется фрагмент длиной 885 п. н.

тролями служили сорта польской селекции Triada и Korona с геном *Rm*. Согласно полученным данным, лучшими диагностическими маркерами оказались GP250₅₁₀, GP283₃₂₀ и UBC822₁₀₇₉. Маркеры GP38, SC864₈₁₆ были не эффективны. Это может быть обусловлено тем, что на генетической карте хромосомы 11 картофеля они находятся достаточно далеко от гена *Rm*: на расстоянии 8сМ и 27сМ соответственно. Напротив, маркеры GP250₅₁₀ и GP283₃₂₀ расположены на расстоянии 0,8сМ к гену *Rm*. Результаты ПЦР-анализа, полученные при использовании отобранных маркеров, подтверждают их пригодность для выявления устойчивых к М-вирусу генотипов картофеля (таблица).

**Присутствие в сортах картофеля маркерных локусов
к гену *Rm* сверхчувствительной устойчивости к М-вирусу**

Сорт	Степень устойчивости в баллах	Наличие/отсутствие (+/-) маркера GP250 ₅₁₀	Наличие/отсутствие (+/-) маркера GP283 ₃₂₀	Наличие/отсутствие (+/-) маркера UBC822 ₁₀₇₉
Явар	9	+	+	+
Дельфин	8	+	+	+
Нептун	8	-	+	+
Криница	8	+	+	-
Дубрава	8	+	-	+
Атлант	8	+	+	-
Бриз	8	-	+	+
Прамень	8	+	-	+
Сузорье	8	-	-	+
Орбита	8	-	-	+
Ветразь	8	-	-	+
Колорит	8	+	-	-
Живица	8	-	-	+
Талисман	8	-	-	+
Скарб	8	-	+	+
Одиссей	8	+	-	-
Журавинка	8	+	-	-
Аксамит	8	+	-	-
Каприз	8	-	-	+
Верас	8	-	-	-
Блакит	8	-	-	-
Росинка	8	-	-	-
Дар	8	+	-	-
Ласунак	8	-	-	-
Уладар	7	+	-	+
Апоста	н/о	-	-	+
Фазан	н/о	+	-	-
Лазарь	н/о	-	+	-
Carolla	н/о	+	-	-

Сорт	Степень устойчивости в баллах	Наличие/отсутствие (+/-) маркера GP250 ₅₁₀	Наличие/отсутствие (+/-) маркера GP283 ₃₂₀	Наличие/отсутствие (+/-) маркера UBC822 ₁₀₇₉
Binella	н/о	+	-	-
Ponto	5	+	-	-
Heidrun	н/о	-	+	-
Assia	н/о	-	-	-
Berber	н/о	+	-	+
Krasa	н/о	+	+	+
Karmoran	н/о	+	-	-
Янка	7	+	-	-
Выток	5	+	-	+
Лилея	5	+	-	+
Зарница	5	-	+	-
Веснянка	5	+	-	-
Синтез	5	+	-	-
Акцент	5	-	+	-
Универсал	5	+	-	+
Рагнеда	3-5	-	-	-
Манифест	н/о	+	-	+
Радео	н/о	+	-	-
Ламбада	н/о	-	-	-
Pirola	н/о	-	+	-
Kama	н/о	-	-	+
Albatros	н/о	+	-	+
Арта	8	-	-	-
Meridian	н/о	+	+	+
Mariella	8	+	-	+
Planta	н/о	-	+	-
Ресурс	н/о	-	+	+
Prof. Wohltman	н/о	-	+	+
Monza	н/о	+	-	-
Vineta	н/о	-	-	+
Rita	н/о	-	-	-
Carla	н/о	+	-	+
Olga	н/о	+	+	-
Monalisa	н/о	-	-	+
Molli	н/о	-	+	+
Пранса	н/о	+	-	+
Ли́ра	н/о	-	-	-
Triada	9	+	+	-
Korona	9	-	-	+
Pentland Dell	н/о	-	-	-
Pentland Ivory	н/о	+	-	-
Maris Peer	н/о	-	-	-
Никулинский	н/о	-	+	-

Примечания: степень устойчивости приведена согласно каталогам [10; 11]: 3 балла – низкая устойчивость; 5 – средняя; 7 – относительно высокая; 8 – высокая; 9 – очень высокая; н/о – не определено.

ПЦР-анализ коллекции сортов картофеля на наличие маркера UBC822₁₀₇₉ к гену *Rm* (рис. 2) показал, что частота его встречаемости была сходной с маркером GP250₅₁₀ (таблица). Однако использование только одного из трех маркеров не достаточно, так как коэффициенты корреляции между присутствием (или отсутствием) маркерной полосы и оценкой сортов по фенотипу не являются достоверными. В связи с этим селекционный материал следует тестировать лучшей парой маркеров GP283₃₂₀ и UBC822₁₀₇₉ ($r = 0,7$ при $P < 0,01$).

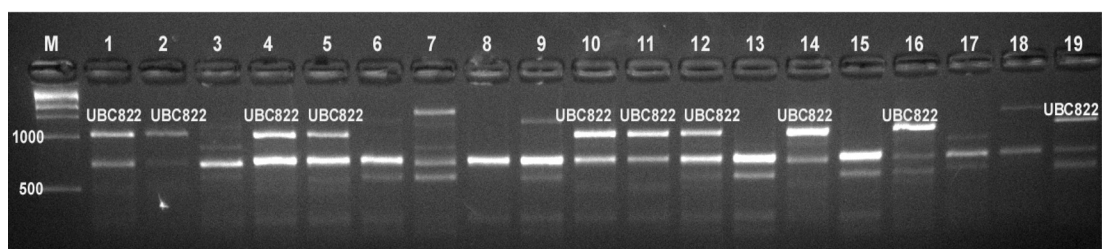


Рис. 2. Результаты электрофореза продуктов амплификации ДНК сортов картофеля с маркером UBC822₁₀₇₉; M – маркер молекулярного веса (100–1000–3000 п. н.); лунка 1 – сорт картофеля Meridian; 2 – Выток; 3 – Лира; 4 – Нептун; 5 – Mariella; 6 – Журавинка; 7 – Криница; 8 – Дар; 9 – Колорит; 10 – Живица; 11 – Бриз; 12 – Sante; 13 – Зарница; 14 – Лилея; 15 – Quarta; 16 – Талисман; 17 – Heidrun; 18 – Ponto; 19 – Kogona (положительный контроль, несущий ген *Rm*). При наличии гена *Rm* образуется фрагмент длиной 1079 п. н.

Сопоставление данных по устойчивости сортов, представленных в каталогах [10; 11], и результатов проведенного нами молекулярного тестирования показало, что устойчивость большинства сортов к М-вирусу обусловлена геном *Rm*. Так, 25 сортов из 30 с высокой степенью устойчивости к М-вирусу (7–9 баллов) несли маркерные локусы к гену *Rm* (таблица). Из 72 исследованных сортов у 34 генотипов был выявлен один маркерный фрагмент, а у 22 – два. Сорта Явар, Дельфин, Краса, Meridian несли по три маркерных фрагмента к гену *Rm*.

Заключение. Таким образом, показано, что ген сверхчувствительности *Rm* достаточно широко представлен в отечественных и зарубежных сортах картофеля в отличие от гена крайней устойчивости *Gm*, который является редким и пока встречается только в селекционном материале. Разработанные методы ПЦР-детекции этих генов и выделенные доноры устойчивости рекомендуются для использования в селекционных программах.

Литература

1. Proll E., Leiser R. M., Ostermann W. D., Spaar D. // Potato Res. 1981. Vol. 24. P. 1–10.
2. Zavriev S. K., Kanyuka K. V., Levay K. E. // J. of General Virology. 1991. Vol. 72. P. 9–14.
3. Rupasov V. V., Morozov S. Y., Kanyuka K. V., Zavriev S. K. // J. of General Virology. 1989. Vol. 70. P. 1861–1869.
4. Русецкий Н. В., Козлов В. А., Чащинский А. В. // Земляробства і ахова раслін. 2007. № 4. С. 44–47.
5. Перечень особо опасных вредителей, болезней растений и сорняков: Постановление Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь № 48 от 22 августа 2006 г.
6. Brunt A. A. // Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed potatoes. Dordrecht, 2001. P. 101–108.
7. Marczewski W., Strzelczyk-Zyta D., Hennig J., Witek K. // Theor. Appl. Genet. 2006. Vol. 112. P. 1232–1238.
8. Zimnoch-Guzowska E. // Potato Research. 2010. Vol. 53. P. 199–252.
9. Chrzanowska M., Michalak K., Zagorska H., Szajko K. // Biuletyn Instytutu hodowli i aklimatyzacji roślin. 2011. N 260/261. P. 309–324.
10. Сорта картофеля: Каталог 2005 / Л. Н. Вологодина и др. Минск, 2005. – 118 с.
11. Сорта картофеля: Каталог 2007 / Н. Н. Гончарова и др. Минск, 2007. – 96 с.

E. A. VOLUEVICH, N. V. PAVLYUCHUK

Voluevitch@yandex.ru

SELECTION OF M-VIRUS RESISTANT GENOTYPES OF POTATO (*SOLANUM TUBEROSUM*) BY THE PCR METHOD

Summary

The methods for identifying M-virus resistance genes of potato were developed. Gene *Gm* of extreme PVM resistance is rare and available for the present only in breeding material. On the contrary, hypersensitivity gene *Rm* is quite widely represented in Belarusian and foreign potato cultivars providing their resistance to this pathogen. Potato cultivars and hybrids, selected for the availability of markers GP250₅₁₀, GP283₃₂₀, UBC822₁₀₇₉ to gene *Rm* and marker SC878₈₈₅ to gene *Gm*, are the valuable donors of resistance to this virus and are recommended for use in breeding.