

УДК: 635.21: 581.16.163: 631.527.12: 577.21: 632. 91.2

ОЦЕНКА КОЛЛЕКЦИИ ДИГАПЛОИДОВ *SOLANUM TUBEROSUM* НА НАЛИЧИЕ R-ГЕНОВ К КОМПЛЕКСУ ПАТОГЕНОВ КАРТОФЕЛЯ С ПОМОЩЬЮ ПЦР АНАЛИЗА

Е.В. Воронкова, В.И. Лукша, Ю.В. Полюхович, А.В. Савчук,
О.В. Маханько, А.П. Ермишин

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Беларусь
E.Voronkova@igc.bas-net-by, A.Yermishin@igc.bas-net.by

Р Е З Ю М Е

Оценка коллекции из 37 первичных и 18 вторичных дигаплоидов картофеля с помощью ПЦР-маркеров к девяти R-генам картофеля, определяющим устойчивость к цистообразующей нематодe, PVX, PVY, PLRV и фитофторозу, показала наличие у многих образцов одновременно нескольких генов различного происхождения и/или направленности действия. Предварительный ПЦР анализ на наличие комплекса R-генов у сортов, предназначенных для получения первичных дигаплоидов, позволяет увеличить в популяции дигаплоидов концентрацию ценных генов, что делает такие популяции ценным материалом для селекции картофеля на диплоидном уровне.

Ключевые слова: дигаплоиды картофеля *Solanum tuberosum*, R-гены устойчивости к нематодe, вирусам и фитофторозу, ПЦР-анализ

В В Е Д Е Н И Е

Одним из основных преимуществ селекции картофеля на диплоидном уровне считается возможность привлечения в гибридизацию огромного разнообразия дикорастущих видов картофеля, большинство из которых являются диплоидами [1, 2]. Многие дикие виды картофеля рассматриваются как перспективные источники новых высокоэффективных генов устойчивости к разнообразным патогенам и неблагоприятным абиотическим условиям среды, а также как источники генов, способствующих повышению качества урожая культурного картофеля [1, 2, 3 и др.]. Однако основой для создания диплоидных селекционных образцов, безусловно, рассматриваются дигаплоиды картофеля *Solanum tuberosum*, которые являются источником культурных качеств и потенциальной урожайности будущих сортов [1, 2]. Очевидно, что использование в качестве такой основы дигаплоидов, уже несущих определенный набор генов устойчивости к болезням и вредителям, будет способствовать ускоренному созданию диплоидных источников с комплексом ценных генов, позволит избежать дополнительных циклов беккроссирования культурным картофелем, что является неизбежным при привлечении большинства диких видов с их нежелательными «дикарскими» признаками. Многие современные сорта картофеля созданы с использованием селекционного материала на основе некоторых диких и полукультурных видов

картофеля, таких как *S. tuberosum* ssp. *andigenum*, *S. chacoense*, *S. demissum*, *S. stoloniferum*, *S. phureja*, *S. spgazzinii* и некоторых других, известных как источники ряда ценных генов устойчивости и/или качества клубней [1, 2, 4]. Это обстоятельство способствует возможности создания популяций первичных дигаплоидов, содержащих наряду с генами *S. tuberosum* также и некоторые гены, в частности R-гены устойчивости к болезням и вредителям, от других видов, часто используемых селекционерами. В связи с этим оценка на наличие таких генов популяций дигаплоидов представляет несомненный интерес и позволит максимально ускорить получение диплоидных источников с комплексом генов устойчивости, происходящих от разных диких видов даже без привлечения межвидовых скрещиваний, или проводить межвидовые скрещивания для расширения генетической базы более целенаправленно.

Повысить эффективность поиска в популяциях картофеля известных ценных генов позволяет привлечение в селекцию новых современных методов, в частности, методов молекулярно-генетического анализа. Так, разработан ряд методов, позволяющих с высокой эффективностью выявлять гены, определяющие вертикальную устойчивость к болезням и вредителям картофеля (так называемые R-гены). Среди этих методов наиболее простым и эффективным является метод, основанный на полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК изучаемого организма с специфическими праймерами, называемыми также ПЦР-маркерами [3, 5]. ПЦР-маркеры создаются с учетом знаний последовательности участков ДНК, ассоциированных с конкретными генами, и позволяют выявлять в организме наличие этих 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, показана ее достаточно высокая эффективность [3, 5, 6 и др.]

В данной работе представлены результаты оценки коллекции первичных и вторичных дигаплоидов картофеля из коллекции ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» на наличие двух генов устойчивости к цистообразующей нематоды (*H1* от *S. andigenum* и *Gro1-4* от *S. spgazzinii*), двух генов устойчивости к PVY (*Ry_{and}* от *S. andigenum* и *Ry_{sto}* от *S. stoloniferum*), двух основных из четырех известных QTL устойчивости к PLRV (*PLRV1* и *PLRV4*), одного гена устойчивости к PVX (*Rx1* от *S. andigenum*) и двух генов устойчивости к фитофторозу (*Rl_{dms}* от *S. demissum* и *Rpi-blb1* от *S. bulbocastanum*).

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследования служили 37 первичных и 18 вторичных дигаплоидов картофеля *S. tuberosum* различного происхождения, большинство из которых получено в лаборатории генетики картофеля ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» на протяжении 1997-2007 гг. Данные о происхождении дигаплоидов представлены в таблице 2. Основу коллекции вторичных дигаплоидов составляют образцы, отобранные в качестве источников высокой функциональной мужской фертильности и способности к формированию нередуцированной пыльцы FDR-типа [7]. Вторичные

дигаплоиды DJ-03/8.2 и DJ-03/15, созданные с привлечением диких видов картофеля и оцененные по устойчивости к ряду патогенов, любезно предоставлены проф. Н. De Jong (Канада). Соматический тетраплоидный гибрид 551 *S.tuberosum*+*S.pinnatisectum* (далее (*tbr+pnt*) 551), на основе которого нами в 2007 году получен ряд первичных дигаплоидов, любезно предоставлен доктором L. Schilde-Rentschler (Тюбингенский университет, Германия). Гибрид получен путем слияния протопластов дигаплоида *S. tuberosum* В-15 и клона *S. pinnatisectum* [8].

Для изучения коллекции на наличие у образцов картофеля генов устойчивости к различным патогенам нами использован набор молекулярных ПЦР маркеров, основные сведения о которых приведены в таблице 1. Праймеры синтезированы фирмами SINTOL (Москва, Россия) и ПРАЙМТЕХ (Минск, Беларусь). Для рестрикционного анализа использовали, в соответствии с рекомендациями производителя, наборы ферментов фирмы «Fermentas» (Литва). Для ПЦР-анализа была использована BioTaq-polymerase и сопутствующие реактивы фирмы DIALAT Ltd (Москва, Россия). Реакцию амплификации фрагментов ДНК осуществляли на автоматическом программируемом термоциклере фирмы “PE Applied Biosystems” (США) (GenAmp System 2700). Выделение и очистку ДНК осуществляли с помощью готового набора для очистки ДНК «Genomic DNA Purification Kit» фирмы «Fermentas» (Литва) по модифицированной нами для картофеля методике [9]. Концентрацию и качество препаратов тотальной ДНК определяли путем электрофореза в агарозном геле с использованием стандартного маркера молекулярного веса 1-1,5-3 тыс. пар нуклеотидов (тыс.п.н.) («Сибэнзим», Россия). Описание модифицированных нами протоколов ПЦР приведены в [9]. Визуализацию продуктов амплификации и/или рестрикции осуществляли в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете. Длину амплифицированных фрагментов определяли с помощью стандартных маркеров длин фрагментов ДНК на 100-1000 и 100-3000 п.н. («Сибэнзим» или DIALAT Ltd, Россия).