

РАЗДЕЛ II БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Биотехнология растений

УДК 633.49:632/3:631.522/.524:577.2

DOI: 10.18384/2310-7189-2018-4-99-106

МАРКЕРЫ ГЕНОВ ЭКСТРЕМАЛЬНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К Y ВИРУСУ КАРТОФЕЛЯ У ДИКОРАСТУЩИХ ВИДОВ СЕКЦИИ *PEPOTA* РОДА *SOLANUM* L.

Бекетова М.П.¹, Рогозина Е.В.², Чалая Н.А.², Хавкин Э.Е.¹

¹ *Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии*

127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 42, Российская Федерация

² *Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт
генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова*

190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 42-44, Российская Федерация

Аннотация. Методы маркер-опосредствованной селекции позволяют ускорить создание сортов картофеля, устойчивых к Y вирусу картофеля (YVK), путем интрогрессии генов устойчивости к YVK (*Ry*) из дикорастущих сороричей картофеля. Распространение *Ry* генов среди клубнеобразующих видов *Solanum* изучено недостаточно. Два маркера, фланкирующие гены экстремальной устойчивости к YVK, *Ry_{sto}* и *Ry_{adg}*, были валидированы путем анализа сортов картофеля, исследованных создателями этих маркеров, а затем использованы для скрининга девяти дикорастущих видов *Solanum*. Помимо *S. stoloniferum*, маркер гена *Ry_{sto}* найден у *S. papita*, *S. polytrichon*, *S. hjertingii*, *S. bulbocastanum*, *S. brachycarpum* и *S. cardiophyllum*. Помимо *S. andigenum*, маркер гена *Ry_{adg}* был обнаружен у *S. demissum* и *S. stoloniferum*. Однако только в случае *S. stoloniferum* и близкородственного вида *S. papita* присутствие маркера гена *Ry_{sto}* согласовалось с экстремальной устойчивостью к YVK.

Ключевые слова: дикорастущие виды *Solanum*, Y вирус картофеля, экстремальная вирусоустойчивость, фланкирующие маркеры гена.

MARKERS OF GENES FOR EXTREME RESISTANCE TO POTATO VIRUS Y IN WILD POTATO SPECIES FROM THE SECTION PETOTA OF THE GENUS *SOLANUM* L.

M. Beketova¹, E. Rogozina², N. Chalaya², E. Khavkin¹

¹ Institute of Agricultural Biotechnology

ul. Timiryazevskaya 42, 127550 Moscow, Russia

² N.I. Vavilov Research Institute of Plant Industry

ul. Bolshaya Morskaya 42-44, 190000 St. Petersburg, Russia

Abstract. The methods of marker-assisted selection accelerate breeding potato varieties resistant to potato virus Y (PVY) by introgressing genes for PVY resistance (*Ry*) from wild potato relatives. The distribution of the *Ry* genes among the tuber-bearing *Solanum* species has been scarcely studied. Two markers flanking the genes for extreme resistance to YBK, *Ry_{sto}* and *Ry_{adg}*, are validated by analyzing potato varieties investigated by the originators of these markers, and then are used to screen nine wild *Solanum* species. In addition to *S. stoloniferum*, the *Ry_{sto}* gene marker is found in *S. papita*, *S. polytrichon*, *S. hjertingii*, *S. bulbocastanum*, *S. brachycarpum*, and *S. cardiophyllum*. In addition to *S. andigenum*, the *Ry_{adg}* marker is detected in *S. demissum* and *S. stoloniferum*. However, only in the case of *S. stoloniferum* and related species *S. papita*, the presence of the marker for *Ry_{sto}* gene correlated with extreme YBK resistance.

Key words: wild *Solanum* species, potato virus Y, extreme resistance, gene-flanking markers.

Введение

Среди патогенов картофеля заметное место принадлежит Y вирусу картофеля (YBK). Потепление климата создало благоприятные условия для распространения тли – переносчика этого вируса, и это сказалось на распространении заболевания и на росте экономических потерь. Создание устойчивых сортов – это наиболее эффективный и экологически безопасный путь борьбы с вирусными болезнями.

В процессе эволюции у растений сформировалось несколько типов устойчивости к вирусам. Наибольший интерес для селекционеров представляет экстремальная устойчивость (extreme resistance, ER), которая контролируется доминантными ER генами и заключается в подавлении инфекции на самых ранних стадиях заражения,

вне зависимости от штамма вируса [5; 12]. С идентификацией этих генов и начались первые попытки выявить источники этих генов и использовать их в селекционных программах [1; 7].

Устойчивость к вирусам присуща многим дикорастущим и культурным видам картофеля, однако различные проблемы, связанные с гибридизацией этих форм, ограничивают круг таких источников. Наиболее известны родительские гибридные формы MPI, несущие ER гены от таких видов, как *S. stoloniferum* и *S. andigenum* (*Ry_{sto}* и *Ry_{adg}*). Успешная селекция в этом направлении велась в Великобритании, Германии, Польше, Голландии и Венгрии [1; 7]. К настоящему времени эти гены только картированы, но не клонированы. Однако уже созданы фланкирующие эти гены молекулярные маркеры, которые позволяют проследить интро-

грессию генов устойчивости в сорта и гибриды картофеля и таким образом ускорить селекционный процесс [3; 4; 6; 8–11].

Дальнейшие успехи в создании устойчивых к ЮВК сортов картофеля методами интрогрессивной гибридизации будут определяться расширением пула охарактеризованных *Ry* генов у дикорастущих сородичей картофеля. Однако распространение *Ry* генов среди этих видов *Solanum* изучено недостаточно. Чтобы отчасти восполнить недостаток такой информации, мы провели скрининг девяти видов *Solanum*, используя валидированные маркеры ER генов *Ry_{sto}* и *Ry_{adg}*.

Материалы и методы

Клубни сортов картофеля и дикорастущих видов *Solanum* получены из коллекций ВИР¹ (С.-Петербург) и Института фитопатологии (Большие Вяземы, Моск. обл.).

Оценку устойчивости растений к ЮВК проводили сначала в полевых условиях, на высоком инфекционном

фоне. Образцы, не пораженные ЮВК в полевых условиях, оценивали методом искусственного заражения (инокуляция соком инфицированных растений табака и прививка на инфицированные растения табака). Результаты оценивали визуально по поражению растений и по накоплению вируса в растениях, которое контролировали методом ИФА [2].

Геномную ДНК выделяли из молодых листьев картофеля с помощью набора AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences, США). Концентрацию ДНК определяли с помощью UV/Vis NanoPhotometer P300 (IMPLEN, Германия). ПЦР амплификацию ДНК проводили в термоциклере MJ PTC-200 (Bio-Rad, США). Праймеры для амплификации генов *Ry_{sto}* и *Ry_{adg}* указаны в табл. 1. Ампликоны разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле в 1x TAE буфере в течение 40 мин при напряжении тока 6 В/см, и гели фотографировали в УФ с помощью прибора Gel Logic 100 Imaging System (Eastman Kodak Company, США).

Таблица 1

¹Маркеры генов экстремальной устойчивости к ЮВК

Ген и его локализация на хромосоме	Название маркера	Последовательности праймеров (5'-3')	Длина фрагмента	Библиография
<i>Ry_{sto}</i> XII	YES3-3A	F TAACTCAAGCGGAATAACCC R AATTCACCTGTTTACATGCTTCTTGTG	341	[8]
	YES3-3B	F TAACTCAAGCGGAATAACCC R CATGAGATTGCCTTTGGTTA	284	
<i>Ry_{adg}</i> XI	RYSC3	F ATACACTCATCTAAATTTGATGG R AGGATATACGGCATCATTTTTCCGA	321	[6]
	RYSC4	F AGTTCTAGTTGTGCTTGATAAC R AGGATATACGGCATCATTTTTCCGA	145	

¹ Всероссийский институт растениеводства, в настоящее время – Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова.

Результаты и обсуждение

Анализ сортов, которые были ранее исследованы авторами предлагаемых маркеров (табл. 2), свидетельствует о полном воспроизведении методик Kasai et al. [6] и Song et al. [8]. Сопоставление данных молекулярного анализа с родословными сортов позволяет проследить за источниками этих генов. Наиболее вероятным источником

гена Ry_{adg} у сортов Живицы и Atlantic служит *S. andigenum*. Наиболее вероятным источником гена Ry_{sto} в сортах Assia, Fanal, Heidrun, Medusa, Ute был *S. stoloniferum*. Сорт Vzura не является исключением, поскольку его материнская форма (PG 232 – источник гена Ry_{sto}) имеет в родословной два MPI гибрида, несущих материал *S. stoloniferum*.

Таблица 2

Верификация маркеров Ry генов на сортах картофеля

№	Сорт	Фенотип по реакции на УВК	Присутствие маркеров (по лит. данным)	Виды <i>Solanum</i> в родословных сортов*	Ry_{sto} YES3-3A	Ry_{sto} YES3-3B	Ry_{adg} RYSC3	Ry_{adg} RYSC4
1	Assia	Устойчив	Ry_{sto}	acl, dms, sto, vrn	1	1	0	0
2	Vzura	Устойчив	Ry_{sto}	adg, acl, dms	1	1	0	0
3	Fanal	Устойчив	Ry_{sto}	adg, acl, dms, sto	1	1	0	0
4	Heidrun	Устойчив	Ry_{sto}	acl, adg, dms, spg, sto	1	1	0	0
5	Meduza	Устойчив	Ry_{sto}	sto	1	1	0	0
6	Ute	Устойчив	Ry_{sto}	acl, sto, vrn	1	1	0	0
7	Atlantic	Восприимчив		adg, dms, chc	0	0	1	1
8	Живица	Устойчив	Ry_{adg}	adg, dms, vrn	0	0	1	1
9	Bintje	Восприимчив		tbr	0	0	0	0
10	Desiree	Восприимчив		tbr	0	0	0	0

* acl – *S. acaule*, adg – *S. andigenum*, chc – *S. chacoense*, dms – *S. demissum*, spg – *S. spagazzinii*, sto – *S. stoloniferum*, tbr – *S. tuberosum*, vrn – *S. vernei*, 1/0 – присутствие/отсутствие маркера.

Мы провели скрининг 31 образца дикорастущих форм картофеля, представляющих девять видов *Solanum* секция *Petota* из клоновой коллекции ВИР. Для большинства этих образцов параллельно была проведена оценка устойчивости к УВК.

Использованные нами маркеры не являются видоспецифичными (табл. 3). Помимо *S. stoloniferum*, мар-

кер гена Ry_{sto} найден у *S. papita*, *S. polytrichon*, *S. hjertingii*, *S. bulbocastanum*, *S. brachycarpum* и *S. cardiophyllum*. Помимо *S. andigenum*, маркер гена был обнаружен у *S. demissum* и *S. stoloniferum*. Однако только в случае *S. stoloniferum* и близкородственного вида *S. papita* присутствие маркера гена Ry_{sto} совпало с экстремальной устойчивостью к УВК.

Таблица 3

Скрининг дикорастущих видов *Solanum* с маркерами *Ry* генов

№	Вид и номер образца по каталогу ВИР (генотип)	Фено-тип *	Присутствие/отсутствие маркера (1/0)			
			<i>Ry_{sto}</i> YES3-3A	<i>Ry_{sto}</i> YES3-3B	<i>Ry_{adg}</i> RYSC3	<i>Ry_{adg}</i> RYSC4
1	<i>S. demissum</i> 15175 (622-17-15)	S	0	0	1	1
2	<i>S. demissum</i> 18521 (623-12-15)	S	0	0	1	1
3	<i>S. demissum</i> 18521 (623-18-15)	S	0	0	1	1
4	<i>S. demissum</i> 19997 (624-8-15)	S	0	0	0	0
5	<i>S. demissum</i> 19997 (624-10-15)	S	0	0	0	0
6	<i>S. demissum</i> 15174 (576-1-15)	S	0	0	0	0
7	<i>S. demissum</i> 15174 (576-5-15)	S	0	0	0	0
8	<i>S. polytrichon</i> 8815 (626-18-15)	R	1	1	0	0
9	<i>S. stoloniferum</i> 24420 (162)	ER	1	1	0	0
10	<i>S. stoloniferum</i> 24420 (172)	ER	1	1	0	0
11	<i>S. stoloniferum</i> 23652 (170)	S	1	1	0	0
12	<i>S. stoloniferum</i> 23652 (169)	S	1	1	0	0
13	<i>S. stoloniferum</i> 24263 (171)	R	1	1	0	0
14	<i>S. stoloniferum</i> 20106 (168)	ER	1	1	0	0
15	<i>S. stoloniferum</i> 24973 (628-2)	S	1	1	0	0
16	<i>S. stoloniferum</i> 24973 (628-3)	S	1	1	0	0
17	<i>S. stoloniferum</i> 24973 (628-16)	R	1	1	1	1
18	<i>S. stoloniferum</i> 3360 (25-10-2015)	ER	1	1	1	1
19	<i>S. stoloniferum</i> 3360 (25-9-2015)	ER	1	1	1	1
20	<i>S. papita</i> 21547 (167)	ER	1	1	0	0
21	<i>S. papita</i> 16888 (625-17)	S	0	0	0	0
22	<i>S. hjertingii</i> 15194 (138)	nd	1	1	0	0
23	<i>S. bulbocastanum</i> 24856 (271)	nd	1	1	0	0
24	<i>S. bulbocastanum</i> 24367 (267)	nd	1	1	0	0
25	<i>S. brachycarpum</i> 24196 (123)	S	1	1	0	0
26	<i>S. brachycarpum</i> 24196 (124)	S	0	0	0	0
27	<i>S. cardiophyllum</i> 16828 (229)	R	1	1	0	0
28	<i>S. cardiophyllum</i> 24375 (246)	S	1	1	0	0
29	<i>S. simplicifolium</i> 12658 (95)	S	0	0	0	0
30	<i>S. chacoense</i> 19759 (5)	ER	0	0	0	0
31	<i>S. chacoense</i> 19759 (6)	ER	0	0	0	0

Прим.: * ИФА – диагностика результатов искусственного заражения. ER (extreme resistance, экстремальная устойчивость) – иммунитет; R (resistant) – устойчивый при механической инокуляции; S (susceptible) – восприимчивый, nd – нет данных.

Заключение

У трех генотипов *S. stoloniferum*, два из которых характеризуются как ER формы, по данным ИФА, одновременно присутствуют маркеры двух генов (Ry_{sto} и Ry_{adg}). Присутствие в одном иммун-

ном растении двух генов устойчивости открывает перспективы использования таких образцов в качестве источников при пирамидировании хозяйственно ценных генов в будущих сортах.

Статья поступила в редакцию 23.05.2018

ЛИТЕРАТУРА

1. Bradshaw J.E. Potato breeding at the Scottish Plant Breeding Station and the Scottish Crop Research Institute: 1920–2008 // *Potato Res.* 2009. Vol. 52. P. 141–172.
2. Chrzanowska M. Evaluation of resistance and reaction of potato cultivars and breeders selections to Potato virus Y (PVY) strains // *The Methods of evaluation and selection applied in potato research and breeding.* Radzikow, Poland: Plant Breeding and Acclimatization Institute (IHAR), 2001. P. 75–77.
3. Flis B., Hennig J., Strzelczyk-Żyta D. et al. The $Ry-f_{sto}$ gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistant to Potato virus Y maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122 718 in PVY resistant potato cultivars // *Mol. Breeding.* 2005. Vol. 15 (1). P. 95–101.
4. Hosaka K., Hosaka Y., Mori M. et al. Detection of a simplex RAPD marker linked to resistance to potato virus Y in a tetraploid potato // *Am. J. Potato Res.* 2001. Vol. 78 (3). P. 191–196.
5. Karasev A.V., Gray S.M. Continuous and emerging challenges of Potato virus Y in potato // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2013. Vol. 51. P. 571–586.
6. Kasai K., Morikawa Y., Sorri V.A. et al. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene Ry_{adg} based on a common feature of plant disease resistance genes // *Genome.* 2000. Vol. 43 (1). P. 1–8.
7. Ross H. Potato breeding – problems and perspectives // *J. Plant Breed Suppl.* 13. Hamburg: Paul Parey, 1986. 132 p.
8. Song Y.-S., Schwarzfischer A. Development of STS markers for selection of extreme resistance (Ry_{sto}) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars // *Am. J. Potato Res.* 2008. Vol. 85 (2). P. 159–170.
9. Tiwari J.K., Singh B.P. Marker-assisted selection for virus resistance in potato: options and challenges // *Potato J.* 2012. Vol. 39 (2). P. 101–117.
10. Valkonen J.P.T., Wiegmann K., Hämäläinen J.H. et al. Evidence for utility of the same PCR-based markers for selection of extreme resistance to Potato virus Y controlled by $Rysto$ of *Solanum stoloniferum* derived from different sources // *Ann. Appl. Biol.* 2008. Vol. 152. P. 121–130.
11. Valkonen J.P.T. Elucidation of virus-host interactions to enhance resistance breeding for control of virus diseases in potato // *Breeding Sci.* 2015. Vol. 65 (1). P. 69–76.
12. Valkonen J.P.T., Gebhardt C., Zimnoch-Guzowska E., Watanabe K.N. Resistance to Potato virus Y in potato // C. Lacomme et al. (eds.) *Potato Virus Y: Biodiversity, Pathogenicity, Epidemiology and Management.* Springer, 2017. P. 207–241.

REFERENCES

1. Bradshaw J.E. Potato breeding at the Scottish Plant Breeding Station and the Scottish Crop Research Institute: 1920–2008. In: *Potato Res.*, 2009, vol. 52, pp. 141–172.
2. Chrzanowska M. Evaluation of resistance and reaction of potato cultivars and breeders selections to Potato virus Y (PVY) strains. In: *The Methods of evaluation and selection applied in potato research and breeding.* Radziko'w (Poland), Plant Breeding and Acclimatization Institute (IHAR), 2001, pp. 75–77.

3. Flis B., Hennig J., Strzelczyk-Żyta D. et al. The *Ry-f sto* gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistant to Potato virus Y maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122 718 in PVY resistant potato cultivars. In: *Mol. Breeding.*, 2005, vol. 15 (1), pp. 95–101.
4. Hosaka K., Hosaka Y., Mori M. et al. Detection of a simplex RAPD marker linked to resistance to potato virus Y in a tetraploid potato. In: *Am. J. Potato Res.*, 2001, vol. 78 (3), pp. 191–196.
5. Karasev A.V., Gray S.M. Continuous and emerging challenges of Potato virus Y in potato. In: *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2013, vol. 51, pp. 571–586.
6. Kasai K., Morikawa Y., Sorri V.A. et al. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ry_{adg}* based on a common feature of plant disease resistance genes. In: *Genome*, 2000, vol. 43 (1), pp. 1–8.
7. Ross H. Potato breeding – problems and perspectives. In: *J. Plant Breed Suppl.* 13. Hamburg, Paul Parey, 1986. 132 p.
8. Song Y.-S., Schwarzfischer A. Development of STS markers for selection of extreme resistance (*Ry_{sto}*) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars. In: *Am. J. Potato Res.*, 2008, vol. 85 (2), pp. 159–170.
9. Tiwari J.K., Singh B.P. Marker-assisted selection for virus resistance in potato: options and challenges. In: *Potato J.*, 2012, vol. 39 (2), pp. 101–117.
10. Valkonen J.P.T., Wiegmann K., Hämläinen J.H. et al. Evidence for utility of the same PCR-based markers for selection of extreme resistance to Potato virus Y controlled by *Rysto* of *Solanum stoloniferum* derived from different sources. In: *Ann. Appl. Biol.*, 2008, vol. 152, pp. 121–130.
11. Valkonen J.P.T. Elucidation of virus-host interactions to enhance resistance breeding for control of virus diseases in potato. In: *Breeding Sci.*, 2015, vol. 65 (1), pp. 69–76.
12. Valkonen J.P.T., Gebhardt C., Zimnoch-Guzowska E., Watanabe K.N. Resistance to Potato virus Y in potato. In: *C. Lacomme et al. (eds.) Potato Virus Y: Biodiversity, Pathogenicity, Epidemiology and Management.* Springer, 2017, pp. 207–241.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено в рамках КПНИ «Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации» АААА-А18-118012590092-4.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was carried out as part of the comprehensive research program “Development of potato breeding and seed production in the Russian Federation” (No. АААА-А18-118012590092-4).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Бекетова Мария Павловна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии;

e-mail: m.beketova@gmail.com

Рогозина Елена Вячеславовна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела генетических ресурсов картофеля Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР);

e-mail: rogozinaelena@gmail.com

Чалая Надежда Александровна – кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник Федерального исследовательского центра Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР);
e-mail: spb.chalaya@mail.ru

Хавкин Эмиль Ефимович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии;
e-mail: emil.khavkin@gmail.com

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Mariya P. Beketova – PhD in Biological Sciences, Senior Research Fellow, Institute of Agricultural Biotechnology,
e-mail: m.beketova@gmail.com

Elena V. Rogozina – Doctor of Biological Sciences, Leading Research Fellow, N.I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR);
e-mail: rogozinaelena@gmail.com

Emil E. Khavkin – Doctor of Biological Sciences, Head of Laboratory, Institute of Agricultural Biotechnology;
e-mail: emil.khavkin@gmail.com

Nadezhda A. Chalaya – PhD in Agricultural Sciences, Senior Research Fellow, N.I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR);
e-mail: spb.chalaya@mail.ru);

ПРАВИЛЬНАЯ ССЫЛКА НА СТАТЬЮ

Бекетова М.П., Рогозина Е.В., Чалая Н.А., Хавкин Э.Е. Маркеры генов экстремальной устойчивости к у вирусу картофеля у дикорастущих видов секции *Petota* рода *Solanum* L. // Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. 2018. № 4. С. 99–106.

DOI: 10.18384/2310-7189-2018-4-99-106

FOR CITATION

Beketova M., Rogozina E., Chalaya N., Khavkin E. Markers of Genes for Extreme Resistance to Potato Virus Y in Wild Potato Species From the Section *Petota* of the Genus *Solanum* L. In: *Bulletin of the Moscow State Regional University, Series: Natural Sciences*, 2018, no. 4, pp. 99–106.

DOI: 10.18384/2310-7189-2018-4-99-106