

А. В. Левый, Е. В. Воронкова, Ю. В. Полюхович, А. П. Ермишин

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ДНК-МАРКЕРЫ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОФТОРОЗУ И К Y-ВИРУСУ У ОБРАЗЦОВ ДИКОГО АЛЛОТЕТРАПЛОИДНОГО ВИДА КАРТОФЕЛЯ *SOLANUM STOLONIFERUM*

Мексиканский аллотетраплоидный дикий вид картофеля *Solanum stoloniferum* Schldl. (серия *Longipedicellata*) представляет собой источник ряда ценных для селекции генов. Однако естественные репродуктивные барьеры между *S. stoloniferum* и культурным картофелем существенно затрудняют интрогрессию генов этого вида в селекционный материал. Ранее нами впервые показана возможность получения диплоидных гибридов в скрещиваниях между *S. stoloniferum* и диплоидными линиями *S. tuberosum*, что значительно упрощает этот процесс. Однако неясно, какие из ценных генов дикого вида, расположенные на разных геномах, удастся перенести к диплоидным межвидовым гибридам.

Целью настоящего исследования было отобрать генотипы аллотетраплоидного вида с максимально широкой представленностью ДНК-маркеров генов устойчивости к фитофторозу и Y-вирусу. Отобранные генотипы будут вовлечены в гибридизацию с диплоидами *S. tuberosum*, что позволит изучить перенос маркеров с геномом А (или В) дикого вида в диплоидные гибриды, в том числе при использовании других методов вовлечения в селекцию генофонда *S. stoloniferum*.

В результате изучения 26 образцов *S. stoloniferum* выделен PI 205522, у которого имелись маркеры к генам устойчивости к фитофторозу (*Rpi-sto1*) и Y-вирусу картофеля (*Ry-sto* и *Ry-fsto*). Отсутствие расщепления по маркерам у потомства от самоопыления PI 205522 свидетельствует о гомозиготном состоянии этих генов. Сиквенс фрагмента маркера 1521/518 образца PI 205522 показал его гомологию (99 %) с известными последовательностями гена *Rpi-sto1* *S. stoloniferum* и *Rpi-blb1* *S. bulbocastanum* образцов этих видов, имеющих высокую устойчивость к фитофторозу.

Ключевые слова: картофель, *Solanum stoloniferum*, ДНК-маркеры, гены устойчивости, PVY (вирус Y картофеля), фитофтороз.

A. V. Levy, E. V. Voronkova, Y. V. Polyukchovich, A. P. Yermishin

Institute of Genetic and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

REPRESENTATIVENESS OF DNA-MARKERS OF LATE BLIGHT AND PVY-RESISTANCE GENES IN ACCESSIONS OF WILD ALLOTETRAPLOID POTATO SPECIES *SOLANUM STOLONIFERUM*

Wild allotetraploid potato species from Mexico *Solanum stoloniferum* Schldl. (series *Longipedicellata*) is considered to be a source of the range of valuable for breeding genes. Nevertheless, natural reproductive barriers between *S. stoloniferum* and cultivated potatoes considerably hamper introgression of genes of this species into breeding material. We were the first who demonstrated earlier the possibility of production of diploid hybrids in crosses between *S. stoloniferum* and *S. tuberosum* diploid lines that can substantially simplify this process. However, it is not clear which of the wild species genes situated on different genomes may be transferred to diploid interspecific hybrids. The purpose of the study was to select wild species genotypes with the widest range of DNA-markers of LB- and PVY-resistance genes. They will be used in crosses with *S. tuberosum* diploid lines to investigate the transfer of the markers along with A (or B) genome of the wild species to diploid hybrids as well as in application of other methods of involvement of *S. stoloniferum* into breeding.

As a result of study 26 accessions of wild allotetraploid species *S. stoloniferum*, the PI 205522 had been selected carrying markers of *Rpi-sto1*, *Ry-sto* and *Ry-fsto* genes. Lack of segregation on the markers in offspring from self-pollination of PI 205522 indicated about homozygous state of these genes. Sequence of the part of the 1521/518 marker in PI 205522 had shown its homology (99 %) with known sequences of genes *Rpi-sto1* of *S. stoloniferum* and *Rpi-blb1* of *S. bulbocastanum* of the accessions of these species having high LB-resistance.

Keywords: potato, *Solanum stoloniferum*, DNA-markers, resistance genes, PVY (potato virus Y), LB (late blight).

Введение. Мексиканский вид картофеля *Solanum stoloniferum* Schldl. (серия *Longipedicellata*) представляет собой источник ряда ценных генов, включение которых в генетический пул культурного картофеля *S. tuberosum* позволило бы селекционерам в значительной степени продвигаться в создании сортов, устойчивых к болезням, вредителям и неблагоприятным факторам внешней среды. Однако естественные репродуктивные барьеры между *S. stoloniferum* и культурным картофелем существенно затрудняют интрогрессию ценных генов этого вида в селекционный материал.

S. stoloniferum, как и другие представители серии *Longipedicellata*, является полным (геномным) аллоплоидом с геномом AABB с дисомным наследованием признаков и относится к классификационной группе 4x (2EBN) видов, которая считается наиболее древней среди представителей серии *Petota*. В силу его дисомности и эффективной ploидности (или EBN, от англ. *endosperm balance number*), равной 2, он не может свободно скрещиваться с тетраплоидным *S. tuberosum*, являющимся тетрасомным 4x (4EBN) видом. Этот вид при отсутствии презиготных барьеров легко скрещивается с дигаплоидами *S. tuberosum* (2x (2EBN)) и другими 2x (2EBN) видами с образованием триплоидных 3x (2EBN) гибридов. Такие триплоиды являются жизнеспособными, однако в силу значительных нарушений мега- и микроспорогенеза, как правило, полностью стерильны, что явилось эволюционной причиной обособления аллотетраплоидов от диплоидных видов картофеля [1].

Для вовлечения в селекцию генофонда *S. stoloniferum* и других аллополиплоидных видов используют сложные схемы скрещиваний, включающие манипуляции с ploидностью, а также различные методы биотехнологии растений [2–9]. Однако такие подходы сопряжены не только с технической сложностью получения фертильных жизнеспособных гибридов, но и со сложностью дальнейшего их использования в селекции. К их недостаткам следует отнести прежде всего то, что отбор по селекционно-ценным признакам (интрогрессия селекционно-ценных генов дикого вида) проводится среди высокополиплоидного (в лучшем случае тетраплоидного) и анеуплоидного селекционного материала, для которого характерно сложное расщепление. Требуется достаточно много времени для стабилизации ploидности селекционного материала на тетраплоидном уровне, элиминации нежелательных признаков дикого вида. Многие из методов преодоления межвидовых барьеров технически сложны и в большинстве случаев недостаточно результативны.

В лаборатории генетики картофеля Института генетики и цитологии НАН Беларуси изучена возможность получения диплоидных гибридов в скрещиваниях между *S. stoloniferum*, а также дикими аллотетраплоидными видами картофеля *S. acaule*, *S. fendleri*, *S. polytrichon* и дигаплоидами *S. tuberosum* [10–12]. Впервые установлено, что среди межвидовых гибридов наряду с ожидаемыми триплоидами можно отобрать диплоидные генотипы, способные скрещиваться с дигаплоидами *S. tuberosum*. Полученные диплоидные гибриды являются жизнеспособными и могут легко использоваться в дальнейших скрещиваниях на диплоидном уровне.

Данные, полученные с применением SSR- и RAPD-маркеров, подтвердили интрогрессию видоспецифических локусов дикого и культурного родительских видов как в триплоидные, так и в диплоидные межвидовые гибриды на основе аллотетраплоидных видов. Потеря части локусов дикого вида при неизменном уровне локусов культурного картофеля позволила сделать вывод, что образование диплоидных гибридов при скрещивании аллотетраплоидных видов с дигаплоидами *S. tuberosum*, вероятно, происходит путем оплодотворения моноплоидной (n , 1EBN, содержащей геном A или B(A')) яйцеклетки аллотетраплоидного вида нормальной пылью (n , 1EBN, содержащей геном A) дигаплоида *S. tuberosum* [12].

В силу того, что получение диплоидных межвидовых гибридов на основе аллотетраплоидных видов, очевидно, связано с переносом в селекционный материал лишь одного из геномов (предположительно генома A), возникает вопрос: какие из ценных генов дикого вида можно перенести с помощью этого метода, а какие – невозможно. Для ответа на этот вопрос необходимо точно установить: 1) какой из геномов дикого аллотетраплоидного вида представлен в диплоидных гибридах (A, B или тот и другой у разных генотипов); 2) с какой частотой могут быть представлены в гибридах определенные гены (например, гены устойчивости к болезням), имеющиеся у родительского дикого вида. Последний показатель зависит от аллельного состояния гена (гомозигота или гетерозигота) у родительских генотипов и его геномной локализации. В контексте изучаемой проблемы второй аспект представляет наибольший интерес: если выяснится, что у диплоидных гибридов встречается исключительно геном A, то гены, расположенные на геноме B, будет невозможно интрогрессировать в селекционный материал с помощью этого метода.

Для *S. stoloniferum* разработан ряд ДНК-маркеров, использование которых может быть полезным при изучении указанной проблемы. Во-первых, имеются весьма специфичные SCAR-маркеры

COSII 5B и FLintB₄₆₉, которые применяются в филогенетических исследованиях для идентификации генома В аллотетраплоидных диких видов картофеля [13]. Во-вторых, нашли применение в селекции ДНК-маркеры генов устойчивости к Y-вирусу картофеля (PVY), интрогрессированные в сорта картофеля от *S. stoloniferum* [14, 15]. Наконец, у *S. stoloniferum* выявлен функциональный гомолог гена *Rpi-blb1* долговременной устойчивости к фитофторозу широкого спектра действия мексиканского диплоидного 1 EBN вида *S. bulbocastanum*. Для его идентификации (он был обозначен как *Rpi-stol*) вполне пригодны ДНК маркеры, разработанные для детекции *Rpi-blb1* [16].

Цель настоящей работы – изучение представленности ДНК-маркеров генов устойчивости к фитофторозу *Rpi-stol* и PVY (*Ry-sto* и *Ry-fsto*) у образцов коллекции *S. stoloniferum*. Предполагалось выделить образцы, имеющие наибольшее количество названных маркеров. Эти образцы будут использованы при изучении особенностей интрогрессии генетического материала дикого аллотетраплоидного вида *S. stoloniferum* в селекционный материал путем получения диплоидных гибридов при их гибридизации с фертильными дигиплоидами *S. tuberosum*, а также при использовании других методов получения межвидовых гибридов.

Материалы и методы исследования. Объектом исследований являлись 26 образцов дикого аллотетраплоидного вида картофеля *S. stoloniferum* (семена получены из генетического банка по картофелю NRSP-6, США).

Выделение и очистку ДНК осуществляли из листьев выращиваемых в теплице растений с использованием наборов DNA purification Kit производства фирмы Thermo Scientific (ЕС) в соответствии с рекомендациями производителя и рядом модификаций, разработанных специально для выделения ДНК из свежесобранных зеленых листьев картофеля [17]. Измерение концентрации и степени очистки ДНК выполняли на спектрофотометре Ultrospec 3300.

Проводили ПЦР-анализ ДНК образцов *S. stoloniferum* на наличие ДНК-маркеров генов *Ry-sto* и *Ry-fsto* устойчивости к PVY и гену *Rpi-stol* устойчивости к фитофторозу. Для детекции локусов генов *Ry-sto* и *Ry-fsto* использовали ДНК-маркеры SCARysto₄₁₀₀ и CAPS GP122/*EcoRV*₇₁₈ соответственно [14, 15], для детекции локусов гена *Rpi-stol* – маркеры 517/1519₇₅₀, RB₈₂₀ и 1521/518₇₀₄ [16]. Синтез праймеров осуществлен в ОДО «Праймтех» (г. Минск). Реакции амплификации проводили на автоматическом программируемом термоциклере фирмы PE Applied Biosystems (США) (GenAmp System 2700). Праймеры и режимы ПЦР описаны в методических рекомендациях [17, 18]. Специфические фрагменты ДНК идентифицировали после горизонтального электрофореза продуктов амплификации в 1,5 %-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия в течение 1–1,5 ч при напряжении в 80 В и силе тока 6 мА. Визуализацию фрагментов проводили в ультрафиолетовом свете с использованием прибора гель-документирования Quantum ST4 1100.

Секвенировали фрагмент ДНК размером 671 п. н. гена *Rpi-stol*, полученного в результате амплификации праймера 1521/518₇₀₄ у *S. stoloniferum* PI 205522 с использованием автоматического генетического анализатора ABI Prism 310/3130/3130xl согласно методике, описанной в руководстве [19]. Редактирование суммарной нуклеотидной последовательности и анализ результатов

```

361 AGTCTGAATGCTTTGAAAAGTCTAAAAATTC AATTGTGTTGCGCACTAGAGAGTCTCCCT 420 S. stoloniferum PI205522. локус 517/1519750
3320 AGTCTGAATGCTTTGAAAAGTCTAAAAATTC AATTGTGTTGCGCACTAGAGAGTCTCCCT 3379 S. stoloniferum Rpi-pta1EU884422.1
3320 AGTCTGAATGCTTTGAAAAGTCTAAAAATTC AATTGTGTTGCGCACTAGAGAGTCTCCCT 3379 S. stoloniferum Rpi-sto1 EU884421.1
85967 AGTCTGAATGCTTTGAAAAGTCTAAAAATTC AATTGTGTTGCGCACTAGAGAGTCTCCCT 6026 S. bulbocastanum Rpi-blb1 AY426259.
3320 AGTCTGAATGCTTTGAAAAGTCTAAAAATTC AATTGTGTTGCGCACTAGAGAGTCTCCCT 3379 S. bulbocastanum Rpi-blb1 (RGA2) AY336128.1
9179 AGTCTGAATGCTTTGAAAAGTCTA----- GCACTAGAGAGTCTCCCT 89220 S. bulbocastanum хромосома VIII AY303171.1

```

Фрагмент секвенированного локуса 1521/518₇₀₄ образца PI 205522 *S. stoloniferum* и соответствующих последовательностей ДНК разных генотипов *S. stoloniferum* и *S. bulbocastanum*, представленных в базах данных NCBI. Показано наличие делеции размером 18 п. н. у неустойчивого к фитофторозу образца *S. bulbocastanum* AY303171.1 в области ДНК, комплементарной обратному праймеру (выделена серым цветом) для идентификации маркера 1 and 1' [21], сцепленного с признаком высокой устойчивости к фитофторозу. У образца PI 205522 делеция в области ПЦР ДНК-маркера отсутствует

A fragment of the sekvenir locus 1521/518704 of sample PI 205522 *S. stoloniferum* and corresponding DNA sequences of different genotypes of *S. stoloniferum* and *S. bulbocastanum*, represented in NCBI databases. It was shown the existence of deletion size 18 p. n. from unsustainable to phytophthorosis sample *S. bulbocastanum* AY 303171.1 in the field of DNA, complementary reverse Primer (dimmed) for identification of marker 1 and 1' [21], concatenated with a sign of high resistance to phytophthorosis. Sample PI 205522 deletion in the field of DNA PCR-marker is missing

секвенирования осуществляли с помощью пакета программ Chromas Pro Version 1.5, степень идентичности полученных последовательностей последовательностям, включенным в базу данных NCBI, – при помощи пакетов программ NCBI Standard Nucleotide BLAST по процедуре blastn [20].

Результаты и их обсуждение. Результаты ПЦР-анализа ДНК образцов *S. stoloniferum* на наличие ДНК-маркеров генов *Ry-sto* и *Ry-fsto* устойчивости к PVY и гену *Rpi-stol* устойчивости к фитофторозу представлены в таблице.

Результаты ПЦР-анализа ДНК образцов *S. stoloniferum* на наличие ДНК-маркеров генов *Ry-sto* и *Ry-fsto* устойчивости к PVY и *Rpi-stol* устойчивости к фитофторозу
The results of PCR-analysis of DNA samples of *S. stoloniferum* on DNA markers of genes *Ry-sto* and *Ry-fsto* resistance to PVY and *Rpi-stol* resistance to late blight

Образец	ПЦР-маркеры генов устойчивости к PVY		ПЦР-маркеры гена <i>Rpi-stol</i>		
	SCARysto4 ₁₀₀	GP122/ <i>EcoRV</i> ₇₁₈	517/1519 ₇₅₀	RB ₈₂₀	1521/518 ₇₀₄
PI 160224	+	0	0	0	0
PI 160225	+	0	0	0	0
PI 160226	+	+	0	0	+
PI 160372	+	0	0	0	0
PI 161152	+	0	0	0	0
PI 186544	+	+	0	0	0
PI 195164	+	0	0	0	0
PI 195167	+	0	0	0	+
PI 201849	+	+	0	0	+
PI 201855	+	0	0	0	+
PI 205510	+	0	0	0	0
PI 205522	+	+	+	+	+
PI 230477	+	0	0	0	0
PI 230490	+	+	0	0	+
PI 230557	+	0	0	0	+
PI 239411	+	0	0	0	0
PI 243458	+	+	0	0	+
PI 275252	+	0	0	0	0
PI 310964	+	0	0	0	0
PI 310980	+	+	0	0	0
PI 473534	+	+	0	0	+
PI 498287	+	0	0	0	0
PI 558462	+	0	0	0	0
PI 586948	+	0	0	0	0
PI 595472	+	0	0	0	0
PI 653763	+	+	0	0	0

Результаты свидетельствуют о наличии полиморфизма среди образцов *S. stoloniferum* по наличию ДНК-маркера гена *Ry-fsto* устойчивости к PVY и ДНК-маркеров гена *Rpi-stol* устойчивости к фитофторозу. Исследования показали, что образцы *S. stoloniferum* PI 160226, PI 201849, PI 205522, PI 230490, PI 243458, PI 473534 являются вероятными носителями как маркеров генов *Ry-sto* и *Ry-fsto* устойчивости к PVY, так и гена *Rpi-stol* устойчивости к фитофторозу. Наибольший интерес представляет образец PI 205522, у которого представлены все изученные ДНК маркеры.

Поскольку *S. stoloniferum* практически не образует клубни в условиях Беларуси, были получены семена от самоопыления этого и других образцов дикого вида. Детекция маркеров генов *Ry-fsto* и *Rpi-stol* у 28 растений, выращенных из семян PI 205522, показала отсутствие расщепления по маркерам обоих генов, что свидетельствует об их гомозиготном состоянии у данного образца и его самоопыленного потомства. Следовательно, при расчете частоты переноса этих генов в межвидовые гибриды с участием сеянцев PI 205522 фактор их аллельного состояния можно не учитывать.

В потомстве от самоопыления других образцов *S. stoloniferum*, у которых были детектированы маркеры гена *Rpi-stol* (см. таблицу), имело место расщепление (т. е. исходные растения являлись гетерозиготными по этому гену). Такие генотипы представляют интерес для изучения сопряженности наличия маркеров названного гена у гибридов с уровнем полевой устойчивости к фитофторозу.

По результатам BLAST-анализа последовательности нуклеотидов фрагмента маркера 1521/518₇₀₄ образца PI 205522 *S. stoloniferum* высокие степени перекрытия выявлены с двумя известными образцами *S. stoloniferum* – EU884421.1 и EU884422.1 (93 %) и с тремя образцами *S. bulbocastanum* – AY426259.1, AY336128.1 и AY303171.1 (99 %). С обоими образцами *S. stoloniferum* и с первыми двумя образцами *S. bulbocastanum* степень совпадения последовательности нуклеотидов составила 99 %, с третьим образцом этого вида – 97 %. Сравнение последовательности анализируемого фрагмента ДНК, ограниченного областью маркера 1 and 1' [21], сцепленного с признаком высокой устойчивости к фитофторозу, выявила высокую степень совпадения (99 %) с обоими образцами *S. stoloniferum* и с первыми двумя образцами *S. bulbocastanum* (отмечена лишь одна замена цитозина на аденин у этого образца по сравнению с известными). Образец *S. bulbocastanum* AY303171.1 имел делецию 18 п. н. в области, которую амплифицирует обратный праймер маркера 1and 1', которая характерна для рецессивного аллеля гена *Rpi-blb1* (см. рисунок), не дающего устойчивости к фитофторозу [16].

Как показали проведенные исследования, у всех изученных образцов *S. stoloniferum* присутствовал ДНК-маркер SCARysto4₁₀₀ гена *Ry_{sto}*. (см. таблицу). По-видимому, последовательность ДНК-маркера является специфической для генома *S. stoloniferum* и может быть сцеплена как с доминантным, так и рецессивным аллелем гена *Ry_{sto}*. При разработке маркера использовалась расщепляющаяся популяция, полученная в результате гибридизации высокоустойчивого к PVY венгерского сорта White Lady, происходящего от межвидового гибрида на основе *S. stoloniferum* [22]. Маркер SCARysto4₁₀₀ относится к ДНК-маркерам генов устойчивости, которые представляют собой последовательности ДНК, расположенные в непосредственной близости от гена, благодаря чему косегрегируют с ним в потомстве этого сорта и других сортов, происходящих от межвидового гибрида, являющегося источником этого гена. Последовательности маркеров интрогрессированы в селекционный материал от диких видов непосредственно с генами, маркерами которых они являются, и попадают в новые сорта в процессе селекции, как правило, совместно. Однако в генофонде диких видов, от которых они интрогрессированы, они могут быть не сцеплены с генами устойчивости [21].

Таким образом, для того чтобы выяснить, ассоциирован ли маркер SCARysto4₁₀₀ у образцов *S. stoloniferum* с устойчивостью к PVY, необходимы дополнительные испытания. Для целей нашего исследования этот вопрос значения не имеет: любой из имеющихся в распоряжении маркеров образцов дикого вида может быть использован в изучении особенностей переноса соответствующего гена в диплоидные межвидовые гибриды 4x *S. stoloniferum* × 2x *S. tuberosum*.

В отличие от SCAR-маркера ysto4₁₀₀, маркер CAPS GP122/*EcoRV*₇₁₈ гена *Ry-fsto* был представлен лишь у части образцов *S. stoloniferum* (у 9 из 26), что предполагает его связь с признаком устойчивости к патогену у этого дикого вида. Однако и такое предположение требует подтверждения. Для дальнейших исследований нами отобраны семена образца PI 205522, являющиеся носителями маркера GP122/*EcoRV*₇₁₈.

Поскольку гены *Ry-sto* и *Ry-fsto* уже достаточно давно используются в селекции картофеля и представлены у ряда сортов, проблема их повторной интрогрессии в селекционный материал не является актуальной. Для нас представляют интерес лишь маркеры данных генов. Это не относится к гену *Rpi-sto1*: насколько нам известно, в литературе отсутствуют сведения о переносе этого гена в генетический пул культурного картофеля, по крайней мере традиционными методами, отличными от генно-инженерных. Поэтому нами использовано одновременно несколько маркеров этого гена и проведено секвенирование полученных продуктов амплификации, чтобы убедиться, что речь идет о функционально активных аллелях. Предполагается в ближайшее время проведение полевых испытаний семян и гибридов – носителей маркеров данного гена, а также разработка новых подходов для его интрогрессии в селекционный материал, не ограниченных получением диплоидных гибридов 4x *S. stoloniferum* × 2x *S. tuberosum*.

Так как ни ген *Rpi-blb1*, ни его гомолог *Rpi-sto1* в настоящее время не представлены в коммерческих сортах картофеля, ДНК-маркеров для их идентификации в рамках маркер-ассоциированного отбора не разработано. М. Wang [16] предложен набор из трех маркеров для идентификации этого гена у образцов диких видов, который использован в настоящем исследовании.

Прямой (F) праймер маркера 517/1519₇₅₀ расположен выше стартового кодона гена, а обратный (R) – в области интрона (т. е. область амплификации затрагивает NBS-домен и часть интрона). Маркер RB₈₂₀ (BLB1F/R) соответствует LRR-области гена. Прямой праймер маркера 1521/518₇₀₄ захватывает часть области LRR, которую амплифицирует RB₈₂₀, а обратный праймер расположен ниже стоп-кодона. Таким образом, этот набор маркеров покрывает значительную часть гена и прилегающие к нему районы.

Маркеры гена *Rpi-sto1* представлены у образцов *S. stoloniferum* не так часто, как маркеры генов устойчивости к PVY и соответствующий гомолог гена мексиканского диплоидного вида *S. bulbocastanum*. Ген *Rpi-sto1* с помощью всех трех пар праймеров детектирован только у одного образца *S. stoloniferum* (PI 205522) из 26 проанализированных (см. таблицу) и у 28 семян его потомства от самоопыления. У 8 образцов дикого вида присутствовал один из маркеров (1521/518₇₀₄). Амплификацию только отдельных маркеров можно объяснить наличием аллельных вариантов гена *Rpi-sto1* у изученного набора образцов дикого вида, которые способны амплифицировать лишь часть из использованных маркеров.

М. Wang [16] выявлены 2 образца *S. stoloniferum* (из 11 проанализированных), у которых присутствовали все 3 вышеупомянутых маркера гена *Rpi-sto1*, у 1 образца – только маркер 1521/518₇₀₄. У *S. bulbocastanum*, по данным этого автора, частота гена *Rpi-blb1* составила 56 % (из 249 изученных генотипов).

По мнению [16], доминантный аллель гена *Rpi-sto1*, с которым связана высокая устойчивость к фитофторозу, отличается от рецессивного аллеля делецией в 18 п. н. Из-за этого маркер 1521/518₇₀₄ у неустойчивых генотипов амплифицируется лишь частично, до места делеции. Также было показано, что неустойчивые генотипы не амплифицируют маркер 1 and 1' [21]), расположенный в пределах 1521/518₇₀₄. Это дало основание предположить, что делеция затрагивает область, которую амплифицирует один из праймеров 1 and 1'. Секвенированный нами фрагмент 1521/518704 полностью включает область маркера 1 and 1'. Его последовательность практически полностью совпадает с аналогичной последовательностью ДНК клонированного гена *Rpi-sto1* двух образцов *S. stoloniferum* и гена *Rpi-blb1* двух образцов *S. bulbocastanum*, выделенных из генотипов, обладающих высокой устойчивостью к фитофторозу. Один из образцов *S. bulbocastanum* (AY 303171.1) из международных баз данных имел делецию 18 п. н., которая затрагивала последовательность, амплифицируемую обратным праймером маркера 1 and 1'. Очевидно, этот образец имеет рецессивный аллель гена *Rpi-blb1*. Полученные нами результаты подтвердили значительную ценность для селекции отобранного нами образца PI 205522: интрогрессия в селекционный материал имеющегося у него аллеля гена *Rpi-sto1* имеет большое практическое значение.

Локализация в геноме *S. stoloniferum* генов устойчивости к PVY неизвестна. Однако можно предположить, что они расположены на геноме А, так как успешно интрогрессированы в селекционный материал. Получение диплоидных гибридов между *S. stoloniferum* и дигиплоидами *S. tuberosum* и анализ их ДНК на предмет наличия маркеров этих генов и маркеров генома В (например, COSII 5B и FLintB₄₆₉ [13]) позволит получить точный ответ на этот вопрос. Что касается гена *Rpi-sto1*, с высокой степенью вероятности можно предположить, что он расположен на геноме В, который гомологичен геномам диплоидных мексиканских видов картофеля, в частности *S. bulbocastanum*. Следовательно, его интрогрессия вышеназванным диплоидным межвидовым гибридам может быть затруднена. Вероятно, потребуется разработка новых методов решения этой проблемы.

Заключение. Таким образом, в результате изучения представленности ДНК-маркеров генов устойчивости к PVY и фитофторозу у 26 образцов дикого аллотетраплоидного вида картофеля *S. stoloniferum* установлено, что у всех изученных образцов присутствовал маркер SCARysto4₁₀₀ гена *Ry-sto* устойчивости к PVY. Маркер GP122/*EcoRV*₇₁₈ гена *Ry-fsto* устойчивости к PVY был представлен у 9 образцов. Все использованные маркеры гена *Rpi-sto1* высокой долговременной устойчивости к фитофторозу имелись только у образца PI 205522. У этого образца присутствовали также оба маркера генов устойчивости к PVY, что дало основание отобрать его для дальнейшего

изучения особенностей интрогрессии генов устойчивости к болезням дикого вида в селекционный материал при использовании разных методов получения межвидовых гибридов. Отсутствие расщепления по маркерам генов *Ry-fsto* и *Rpi-sto1* у потомства от самоопыления PI 205522 свидетельствует о гомозиготном состоянии этих генов у данного образца. Сиквенс фрагмента 671 п. н. маркера 1521/518₇₀₄ PI 205522 показал его гомологию (99 %) с известными последовательностями гена *Rpi-sto1* *S. stoloniferum* и *Rpi-blb1* *S. bulbocastanum*, ранее идентифицированными у образцов с высокой устойчивостью к фитофторозу.

Благодарность

Статья подготовлена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Б16Р-103).

Acknowledgement

Work supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (Project no. B16R-103).

Список использованных источников

1. Ермишин, А. П. Генетические особенности аллотетраплоидных диких видов картофеля (*Solanum*) как объекта селекции / А. П. Ермишин // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2014. – № 1. – С. 23–31.
2. Lamm, R. Investigation of some tuber-bearing *Solanum* hybrids / R. Lamm // Hereditas. – 1953. – Vol. 39, N 2. – P. 97–112.
3. Camadro, E. L. Germplasm transfer from the wild tetraploid species *Solanum acaule* Bitt. to the cultivated potato, *S. tuberosum* L. using 2n eggs / E. L. Camadro, J. C. Espinillo // Am. Potato J. – 1990. – Vol. 67. – P. 737–750.
4. Brown, C. R. Introgression of *Solanum acaule* germplasm from the endosperm balance number 2 gene pool into the cultivated endosperm balance number 4 potato gene pool via triplandroids / C. R. Brown, K. Adiwilaga // Genome. – 1990. – Vol. 33. – P. 273–278.
5. Iwanaga, M. Breaking of the cross ability barriers between disomic tetraploid *Solanum acaule* and tetrasomic tetraploid *S. tuberosum* / M. Iwanaga, R. Freyre, K. Watanabe // Euphytica. – 1991. – Vol. 52, N 3. – P. 183–191.
6. Watanabe, K. N. Potato germ plasm enhancement with disomic tetraploid *Solanum acaule*. I. Efficiency of introgression / K. N. Watanabe, C. Arbizu, P. Schmiediche // Genome. – 1992. – Vol. 35, N 1. – P. 53–57.
7. Potato germplasm enhancement with disomic tetraploid *Solanum acaule*. II Assessment of breeding value of tetraploid F₁ hybrids between tetrasomic tetraploid *S. tuberosum* and *S. acaule* / K. N. Watanabe [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 1994. – Vol. 88, N 2. – P. 135–140.
8. Characterization of somatic hybrids between tetraploid *Solanum tuberosum* L. and dihaploid *S. acaule* / T. Yamada [et al.] // Breeding Sci. – 1997. – Vol. 47. – P. 229–236.
9. Rokka, V.-M. Interspecific somatic hybrids between wild potato *Solanum acaule* Bitt. and anther-derived dihaploid potato (*Solanum tuberosum* L.) / V.-M. Rokka // Plant Cell Reports. – 1998. – Vol. 18. – P. 82–88.
10. Воронкова, Е. В. Диплоидные гибриды между аллотетраплоидными дикими видами картофеля *Solanum acaule* Bitt., *Solanum stoloniferum* Schldt. и дигаплоидами *Solanum tuberosum* L. / Е. В. Воронкова, В. М. Лисовская, А. П. Ермишин // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 8. – С. 1065–1073.
11. Лисовская, В. М. Интрогрессия генетического материала диких аллотетраплоидных видов картофеля в диплоидные селекционные формы *Solanum tuberosum* L.: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.07 / В. М. Лисовская, Ин-т генетики и цитологии Нац. акад. навук Беларусі. – Минск, 2009. – 20 с.
12. Ермишин, А. П. Представленность специфических RAPD-локусов родительских видов у триплоидных и диплоидных гибридов между аллотетраплоидными видами картофеля и дигаплоидами *Solanum tuberosum* L. / А. П. Ермишин, Е. В. Воронкова // Докл. Нац. акад. навук Беларусі. – 2014. – Т. 58, № 2. – С. 97–103.
13. Соколова, Е. А. Молекулярные маркеры генов устойчивости и геномов-доноров устойчивости картофеля к фитофторозу: метод. указания / Е. А. Соколова, О. А. Фадиная, Э. Е. Хавкин; Всерос. науч.-исслед. ин-т с.-х. биотехнологии Россельхозакад. – М.: [б. и.], 2013. – 25 с.
14. Development of a locus-specific marker and localization of the *Ry_{sto}* gene based on linkage to a catalase gene on chromosome XII in the tetraploid potato genome / I. Cernak [et al.] // Breed. Sci. – 2008. – Vol. 58. – P. 309–314.
15. *Ry-fsto* gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistant to Potato virus Y maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122₇₁₈ in PVY resistant potato cultivars / B. Flis [et al.] // Mol. Breed. – 2005. – Vol. 15. – P. 95–101.
16. Wang, M. Diversity and evolution of resistance genes in tuber-bearing *Solanum* species. PhD thesis / M. Wang; University of Wageningen. – Wageningen, 2007. – P. 43–58.
17. Оценка исходного материала картофеля для селекции на устойчивость к болезням и вредителям с помощью специфических ПЦР-маркеров: метод. рекомендации / А. П. Ермишин [и др.]. – Минск: Право и экономика, 2010. – 60 с.
18. Методы вовлечения в селекцию 1 EBV диких диплоидных видов картофеля и скрининга селекционного материала на наличие генов устойчивости к фитофторозу: метод. рекомендации / А. П. Ермишин [и др.]. – Минск: Право и экономика, 2014. – 58 с.
19. Воронкова, Е. В. Методы молекулярно-генетического анализа для оценки потенциальной токсичности и аллергенности белковых продуктов трансгенов генно-инженерных растений (на примере ГМ-картофеля, устойчивого к колорадскому жуку): метод. рекомендации / Е. В. Воронкова, В. И. Лукша, А. П. Ермишин. – Минск: Право и экономика, 2014. – 72 с.

20. NCBI Standard Nucleotide BLAST [Электронный ресурс] // NCBI. – Режим доступа: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. – Дата доступа: 09.06.2016.

21. Marker-assisted selection for the broad-spectrum potato late blight resistance conferred by gene RB derived from a wild potato species / L. M. Colton [et al.] // *Crop Sci.* – 2006. – Vol. 46. – P. 589–594.

22. Cernak, I. Analysis of the applicability of molecular markers linked to the PVY extreme resistance gene Ry_{sto} , and the identification of new markers / I. Cernak // *Acta Biol. Hungarica.* – 2008. – Vol. 59, N 2. – P. 195–203.

References

1. Yermishin A. P. Genetic features of allotetraploid wild potato species (*Solanum*) as an object of selection. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], 2014, no. 1, pp. 23–31. (in Russian).
2. Lamm R. Investigation of some tuber-bearing *Solanum* hybrids. *Hereditas*, 1953, vol. 39, no. 2, pp. 97–112.
3. Camadro E. L., Espinillo J. C. Germplasm transfer from the wild tetraploid species *Solanum acaule* Bitt. to the cultivated potato, *S. tuberosum* L. using 2n eggs. *American Potato Journal*, 1990, vol. 67, pp. 737–750.
4. Brown C. R., Adiwilaga K. Introgression of *Solanum acaule* germplasm from the endosperm balance number 2 gene pool into the cultivated endosperm balance number 4 potato gene pool via triplandroids. *Genome*, 1990, vol. 33, pp. 273–278.
5. Iwanaga M., Freyre R., Watanabe K. Breaking of the cross ability barriers between disomic tetraploid *Solanum acaule* and tetrasomic tetraploid *S. tuberosum*. *Euphytica*, 1991, vol. 52, no. 3, pp. 183–191.
6. Watanabe K. N., Arbizu C., Schmiediche P. Potato germ plasm enhancement with disomic tetraploid *Solanum acaule*. I. Efficiency of introgression. *Genome*, 1992, vol. 35, no. 1, pp. 53–57.
7. Watanabe K. N., Watanabe K. N., Orrillo M., Vega S., Masuelli R., Ishiki K. Potato germplasm enhancement with disomic tetraploid *Solanum acaule*. II Assessment of breeding value of tetraploid F_1 hybrids between tetrasomic tetraploid *S. tuberosum* and *S. acaule*. *Theoretical and Applied Genetic*, 1994, vol. 88, no. 2, pp. 135–140.
8. Yamada T., Misoo S., Ishii T., Takaoka K., Kamijima O. Characterization of somatic hybrids between tetraploid *Solanum tuberosum* L. and dihaploid *S. acaule*. *Breeding Science*, 1997, vol. 47, pp. 229–236.
9. Rokka, V.-M. Interspecific somatic hybrids between wild potato *Solanum acaule* Bitt. and anther-derived dihaploid potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Reports*, 1998, vol. 18, pp. 82–88.
10. Voronkova E. V., Lisovskaya V. M., Yermishin A. P. Diploid hybrids between allotetraploid wild potato species *Solanum acaule* Bitt., *Solanum stoloniferum* Schltld. and dihaploids *Solanum tuberosum* L. *Genetika* [Genetics], 2007, vol. 43, no. 8, pp. 1065–1073. (in Russian).
11. Lisovskaya V. M. The introgression of the genetic material of wild allotetraploid potato species into diploid selection forms *Solanum tuberosum* L., Abstract of Ph. D. dissertation, Genetics. *Institut genetiki i tsitologii Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi* [Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus], Minsk, 2009, 20 p. (in Russian).
12. Yermishin A. P., Voronkova E. V. Representation of specific RAPD loci of parental species in triploid and diploid hybrids between allotetraploid potato species and digaploid *Solanum tuberosum* L. *Doklady Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2014, vol. 58, no. 2, pp. 97–103. (in Russian).
13. Sokolova E. A., Fadina O. A., Khavkin E. E. Molecular markers of resistance genes and donor genomes of potato resistance to late blight: methodical guidelines. Moscow, All-Russian Scientific Research Institute of Agricultural Biotechnology of the Russian Academy of Agricultural Sciences, 2013, 25 p. (in Russian).
14. Cernak I., Decsi K., Nagy S., Wolf J., Polgar Z., Gulyas G., Hirata Yu., Taller J. Development of a locus-specific marker and localization of the Ry_{sto} gene based on linkage to a catalase gene on chromosome XII in the tetraploid potato genome. *Breeding Science*, 2008, vol. 58, pp. 309–314.
15. Flis B., Hennig J., Strzelczyk-Zyta D., Gebhardt C., Marczewski W. Ry_{fsto} gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistant to Potato virus Y maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122₇₁₈ in PVY resistant potato cultivars. *Molecular Breeding*, 2005, vol. 15, pp. 95–101.
16. Wang M. Diversity and evolution of resistance genes in tuber-bearing *Solanum* species: Ph. D. thesis. University of Wageningen, Wageningen, 2007, pp. 43–58.
17. Yermishin A. P., Voronkova E. V., Savchuk A. V., Luksha V. I., Poliukchovich Y. V., Makchanko O. V., Lisovskaya V. M. Evaluation of the initial potato material for breeding for resistance to diseases and pests with the help of specific PCR markers: methodological recommendations. Minsk, Law and Economics, 2010, 60 p. (in Russian).
18. Yermishin A. P., Poliukchovich Y. V., Voronkova E. V., Savchuk A. V., Gukasjan O. N., Drobiazina P. E., Sokolova E. A., Fadina O. A., Khavkin E. E. Methods of involving wild diploid species of potatoes in the selection of 1 EBN and screening of breeding material for the presence of resistance genes to late blight: guidelines. Minsk, Law and Economics, 2014, 58 p. (in Russian).
19. Voronkova E. V., Luksha V. I., Yermishin A. P. Methods of molecular genetic analysis for assessing the potential toxicity and allergenicity of protein products of transgenes of genetically engineered plants (GM-potato, resistant to the Colorado beetle): methodological recommendations. Minsk, Law and Economics, 2014, 72 p. (in Russian).
20. NCBI Standard Nucleotide BLAST. *NCBI*. Available: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> (Accessed: 09.06.2016).
21. Colton L. M., Groza H. I., Wielgus S. M., Jiang J. Marker-assisted selection for the broad-spectrum potato late blight resistance conferred by gene RB derived from a wild potato species. *Crop Science*, 2006, vol. 46, pp. 589–594.
22. Cernak I. Analysis of the applicability of molecular markers linked to the PVY extreme resistance gene Ry_{sto} , and the identification of new markers. *Acta Biologica Hungarica*, 2008, vol. 59, no. 2, pp. 195–203.

Информация об авторах

Левый Александр Васильевич – аспирант. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: a30413@mail.ru.

Воронкова Елена Васильевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: E.Voronkova@igc.by.

Полюхович Юлия Владимировна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: yuliy1612@yandex.ru.

Ермишин Александр Петрович – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ermishin@igc.by.

Для цитирования

ДНК-маркеры генов устойчивости к фитофторозу и к Y-вирусу у образцов дикого аллотетраплоидного вида картофеля *Solanum stoloniferum* / А. В. Левый [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 2. – С. 46–54.

Information about the authors

Levy Alexander Vasilievich – Postgraduate student. Institute of Genetic and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a30413@mail.ru.

Voronkova Elena Vasilievna – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Institute of Genetic and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: E.Voronkova@igc.by.

Polyukchovich Yuliya Vladimirovna – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Genetic and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yuliy1612@yandex.ru.

Yermishin Alexander Petrovich – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Genetic and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ermishin@igc.by.

For citation

Levy A. V., Voronkova E. V., Polyukchovich Y. V., Yermishin A. P. DNA-markers of late blight and Y resistance genes in accessions of wild allotetraploid potato species *Solanum stoloniferum*. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], 2017, no. 2, pp. 46–54.