

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 635.21:575.222.73:577.21:631.527.3:632.938.1

Поступила в редакцию 17.10.2017

Received 17.10.2017

Е. В. Воронкова, В. И. Лукша, А. В. Левый, О. Н. Гукасян, А. П. Ермишин

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ДНК-МАРКИРОВАНИЕ НОВОГО ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ К PVY, ИНТРОГРЕССИРОВАННОГО В ГЕНОМ КУЛЬТУРНОГО КАРТОФЕЛЯ ОТ ДИКОГО АЛЛОТЕТРАПЛОИДНОГО ВИДА *SOLANUM STOLONIFERUM*

Аннотация. Изучена расщепляющаяся по признаку экстремальной устойчивости к Y-вирусу картофеля популяция межвидовых гибридов, полученных с использованием дикого аллотетраплоидного вида *Solanum stoloniferum*. RAPD-ПЦР-анализ некоторых высокоустойчивых гибридов показал наличие специфического фрагмента OPA18₆₀₀, отсутствовавшего у неустойчивых к вирусу образцов, а изучение нуклеотидной последовательности этого фрагмента с помощью автоматического анализатора позволило выявить его полную идентичность с последовательностью гена пероксидазы пятого типа культурного картофеля и высокую схожесть (более 90 %) с генами медного шаперона разных видов рода *Solanum*. Полученные данные свидетельствуют о функциональной схожести изученной последовательности с генами ответа растительной клетки на стрессовое воздействие патогенов. Последовательность картирована на хромосоме V. Учитывая наличие расщепления в популяции по локусу OPA18₆₀₀ при моногенном наследовании признака устойчивости и его гомологии с генами, кодирующими пероксидазы, предполагается, что данная последовательность не является частью собственно R-гена устойчивости к PVY, а относится к локусу, близко расположенному к гену NBS-LRR-типа и cosegregантно с ним наследуемому. Это дает основание для создания на основе выявленной нуклеотидной последовательности сиквенс-специфического ПЦР-маркера для идентификации источников устойчивости к PVY среди гибридов, полученных на основе аллотетраплоидного вида *S. stoloniferum*.

Ключевые слова: картофель, *Solanum stoloniferum*, межвидовые гибриды, устойчивость к PVY, ДНК-маркирование

Для цитирования: ДНК-маркирование нового гена устойчивости к PVY, интрогрессированного в геном культурного картофеля от дикого аллотетраплоидного вида *Solanum stoloniferum* / Е. В. Воронкова [и др.] // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2018. – Т. 63, № 1. – С. 64–72.

E. V. Voronkova, V. I. Luksha, A. V. Levy, O. N. Gukasian, A. P. Yermishin

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

DNA-MARKING OF THE NOVEL PVY RESISTANCE GENE INTROGRESSED INTO GENOME OF CULTIVATED POTATOES FROM WILD ALLOTETRAPLOID SPECIES *SOLANUM STOLONIFERUM*

Abstract. It has been revealed by means of RAPD-PCR analysis that some genotypes of segregating population of interspecific hybrids originated from wild allotetraploid potato species *Solanum stoloniferum* that had extreme resistance to potato virus Y (PVY) possessed specific fragment OPA18₆₀₀ which was absent in susceptible to PVY hybrids. The DNA sequence analysis of this fragment has shown its full identity to the nucleotide sequence of peroxidase V type gene of cultivated potatoes and high homology (more than 90 %) with genes of copper shaperon of different *Solanum* species. This indicates on functional similarity of studied sequence with genes of plant cell response on stresses caused by pathogen. The sequence is mapped to V chromosome. Taking into consideration the fact of segregation on OPA18₆₀₀ at monogenic inheritance of the character of PVY resistance and of its homology with peroxidase gene, it was supposed that this sequence is not a fragment of PVY resistance R-gene of NBS-LRR-type but is nearby located and cosegregated with such unknown R-gene. This founds the development of sequence-specific PCR-marker for identification of genotypes with PVY resistance among the interspecific hybrids originated from *S. stoloniferum*.

Keywords: potato, *Solanum stoloniferum*, interspecies hybrids, PVY resistance, DNA-marking

For citation: Voronkova E. V., Luksha V. I., Levy A. V., Gukasian O. N., Yermishin A. P. DNA-marking of the novel PVY resistance gene introgressed into genome of cultivated potatoes from wild allotetraploid species *Solanum stoloniferum*. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2018, vol. 63, no. 1, pp. 64–72 (in Russian).

Введение. Среди возбудителей болезней картофеля особое место занимает Y-вирус картофеля (PVY). При поражении им растений возможна потеря от 10 до 80 % урожая, а при синергидном взаимодействии с другими вирусами – практически полная его потеря [1]. Для этого вируса характерна широкая распространенность в мире и генетическое разнообразие выделенных

изолятов [2]. Проблема его контроля осложняется возможностью распространения вирусной инфекции как посредством клубней при репродуцировании и размножении семенного картофеля, так и путем переноса сосущими насекомыми [1, 2].

Наиболее перспективным методом защиты картофеля от PVY является выращивание сортов, несущих эффективные гены устойчивости к этому патогену, и прежде всего генов экстремальной (крайней) устойчивости (ER – extremal resistance) [3–9]. Одним из наиболее ценных источников ER-генов является мексиканский аллотетраплоидный дикий вид картофеля *Solanum stoloniferum* Schlecht. & Bouchet [3–7]. Однако, несмотря на то что этот вид используют в селекции достаточно давно, из-за жестких репродуктивных барьеров лишь небольшое количество его генов удалось интрогрессировать культурному картофелю. Расширение генетического разнообразия *S. stoloniferum* в селекционном материале, в том числе интрогрессия новых генов устойчивости к PVY, будет способствовать созданию сортов картофеля с высокой устойчивостью к широкому спектру штаммов PVY, так как обеспечит возможность «пирамидирования» разных ER-генов в одном генотипе.

В ходе исследований, проведенных в лаборатории генетики картофеля ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», обнаружен новый тип диплоидных гибридов, образующийся при скрещивании аллотетраплоидных диких видов и дигиплоидов культурного картофеля *S. tuberosum*, что дает возможность существенно расширить использование генофонда аллотетраплоидных видов в селекции. В частности, получены уникальные диплоидные межвидовые гибриды картофеля на основе *S. stoloniferum*, обладающие высокой устойчивостью к обычному и некротическому штаммам Y-вируса. Молекулярно-генетический анализ не выявил у них ПЦР-маркеров известных генов *Rysto* и *Ryf-sto* [6, 7] дикого вида, что предполагает интрогрессию в гибриды нового гена устойчивости к PVY. Генетический анализ расщепляющейся по устойчивости к PVY гибридной популяции показал доминантный моногенный характер наследования признака [10].

Цель исследования – разработка сиквенс-специфического ДНК-маркера, пригодного для детекции нового гена устойчивости к PVY в селекционном материале картофеля в рамках программ маркер-ассоциированной селекции.

В задачи настоящей работы входило выявление ПЦР-локусов межвидовых гибридов на основе *S. stoloniferum*, косегрегирующих с экстремальной устойчивостью к PVY, определение нуклеотидной последовательности одного из них и анализ ее схожести с известными последовательностями ДНК, представленными в международных базах данных. Предполагалось, что полученные данные позволят ответить на следующие вопросы: 1) является ли изучаемый фрагмент ДНК составной частью нового гена устойчивости к PVY или этот локус сцеплен с этим геном; 2) если второе, то играет ли этот локус активную роль в механизме устойчивости, или является нейтральным маркером, косегрегирующим с геном устойчивости.

Материалы и методы исследования. В качестве материала использовали ДНК 87 гибридов, отобранных в расщепляющейся по признаку ER к PVY популяции IGC 08/13.n., полученной при опылении устойчивого к PVY генотипа IGC 02/183.17 (BC1 (sto × tbr) × tbr) аналогичным по происхождению неустойчивым IGC 02/185.1. Отбор высокоустойчивых и чувствительных к вирусной инфекции гибридов осуществляли по результатам тестирования методом ELISA первого и второго клубневых поколений гибридов популяции IGC 08/13.n. после искусственного заражения обычным (PVY⁰) штаммом Y-вируса. К группе ER отнесли 10 гибридов с оптической плотностью при ELISA 0,0–0,009, к группе неустойчивых (S) – генотипы с оптической плотностью более 1,8 [10].

Полиморфизм ДНК-локусов, ассоциированных с устойчивостью к PVY, определяли с использованием набора из 19 RAPD-праймеров серий OPA, OPB, OPC, OPD и OPE (Operon Technologies, Alameda, California, США) и двух ISSR праймеров – UBC857 и UBC864 (University of British Columbia, Канада). Праймеры синтезированы в ОДО «Праймтех» (г. Минск, Беларусь).

Выделение и очистку ДНК без обработки РНК-азой проводили с использованием наборов DNA purification Kit производства фирмы Thermo Scientific (Европейский союз) в соответствии с рекомендациями производителя и рядом модификаций, разработанных нами специально для выделения ДНК из растительных тканей картофеля [11]. Концентрацию и степень очистки ДНК проверяли на спектрофотометре и путем нанесения на агарозный гель. Во втором случае для опре-

деления молекулярного веса ДНК образцов использовали маркер молекулярного веса M1000 (DIALAT Ltd, г. Москва, Россия).

Реакционная смесь для одной ПЦР-реакции при проведении RAPD-анализа в пересчете на 10 мкл содержала: 1 мкл $10 \times$ буфера для BioTaqpolymerase, DIALAT Ltd (г. Москва, Россия); 0,2 мкМ праймера; 4 мМ $MgCl_2$; 0,2 мМ каждого dNTP; 1 ед. BioTaqpolymerase (DIALAT Ltd) и 20 нг ДНК исследуемого образца. Программа для ПЦР-реакции: денатурация – 5 мин при 94 °С; далее 35 циклов по 30 с при 94 °С, 30 с при 36 °С и 1 мин при 72 °С; финальная элонгация в течение 7 мин при 72 °С. Длину амплифицированных фрагментов ДНК определяли при горизонтальном электрофорезе в агарозном геле с добавлением бромистого этидия, используя стандартный маркер длин фрагментов ДНК 100 bp + 1,5 Kb + 3 Kb (M27) (DIALAT Ltd).

Уровень взаимосвязи признаков наличия RAPD-фрагментов определенного размера и устойчивости к патогену определяли на основании величины коэффициента корреляции по Спирмену (r_s).

Секвенированию подвергали ПЦР-фрагмент OPA18₆₀₀, наличие которого у образцов в высокой степени коррелировало с наличием ER. Соответствующие фрагменты выделяли из ДНК гибридов IGC 08/13.16, IGC 08/13.31, IGC 08/13.51 и IGC 08/13.79, отобранных, по данным ELISA, как обладающие экстремальной устойчивостью к вирусу. Выделение ПЦР-фрагмента OPA18₆₀₀ из геля и очистку осуществляли отдельно для каждого из генотипов с помощью набора Nucleo Spin ExtractII Nucleic Acid and Protein Purification Kit (Macherey Nagel, Германия). Секвенирование фрагментов осуществляли в ЦКП «Геном» (ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси») на автоматическом анализаторе Applied Biosystems 3500 с использованием реактивов из Applied Biosystems Inc. BigDye Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit.

Для получения точных данных о нуклеотидной последовательности ПЦР-локусов с помощью автоматического анализатора проводили трехкратное секвенирование одновременно четырех названных выше устойчивых к PVY гибридов с последующим суммарным анализом, позволяющим соединить фрагменты в единый контиг. Редактирование суммарной нуклеотидной последовательности и анализ результатов секвенирования осуществляли с помощью пакета программ Chromas Pro Version 1.5. Степень идентичности полученных последовательностей последовательностям, включенным в базы данных NCBI и EBI, определяли при помощи пакетов программ NCBI Standard Nucleotide BLAST по процедуре blastn и пакетов программ поисковой системы FASTA по процедуре Nucleotide Similarity Search, TFASTX ENA sequence EMBL-EBI.

Результаты и их обсуждение. Первым этапом создания сиквенс-специфических ПЦР-маркеров для идентификации генов является поиск полиморфизмов по каким-либо молекулярным локусам, наличие которых коррелирует с соответствующим фенотипическим признаком в определенной выборке генотипов [12, 13].

В нашей работе по маркированию признака экстремальной устойчивости к Y-вирусу в расщепляющейся популяции диплоидных межвидовых гибридов картофеля, созданных при участии *S. stoloniferum*, использованы 18 RAPD и 2 ISSR праймеры. Данные RAPD ПЦР-анализа представлены в табл. 1. Полиморфизм, который позволял бы выявлять все без исключения резистентные генотипы с помощью данного набора произвольных ПЦР-маркеров нами не обнаружен. Наиболее полиморфными оказались праймеры OPA3 и OPA18, с помощью которых выявлено наличие специфических RAPD-локусов размером 1800 и 600 п. н. соответственно у значительной части устойчивых генотипов и его отсутствие у всех неустойчивых. Результаты корреляционного анализа подтвердили наличие высокодостоверной (при $p < 0,01$) зависимости между присутствием у гибридов фрагментов OPA3₁₈₀₀ и OPA18₆₀₀ и высокой устойчивостью к PVY ($r_s = 0,765$ и $r_s = 0,731$ соответственно). Несмотря на то что частота встречаемости у ER гибридов локуса OPA3₁₈₀₀ была несколько выше, для дальнейшего анализа с целью создания на его основе сиквенс-специфического маркера нами выбран фрагмент OPA18₆₀₀, отличающийся не только наличием высокой корреляции с ER, но и оптимальным размером для осуществления качественного секвенирования на основе амплифицированного фрагмента без дополнительного клонирования фрагментов локуса в *Escherichia coli*.

Анализ секвенированного фрагмента OPA18₆₀₀ с помощью двух поисковых систем – американской BLAST и европейской FASTA, охватывающих основные электронные базы данных по известным нуклеотидным и аминокислотным последовательностям растений, позволил вы-

Таблица 1. Распределение RAPD ПЦР-маркеров, специфичных для высокоустойчивых и неустойчивых к PVY⁰ генотипов картофеля из BSA-популяции IGC 08/13.nTable 1. Distribution of RAPD PCR-markers specific for highly resistant and susceptible to PVY⁰ potato genotypes from the IGC 08/13.n BSA population

№ генотипа	Генотип	Показатель оптической плотности при ELISA	RAPD-праймер и размер специфического фрагмента				
			OPA18 (600 п. н.)	OPA18 (1870 п. н.)	OPA3 (1800 п. н.)	OPA4 (360 п. н.)	OPD20 (720 п. н.)
1R	IGC 08/13.1	0,0	0	0	0	0	+
2R	IGC 08/13.12	0,0	0	0	0	0	0
3R	IGC 08/13.16	0,0	+	0	0	0	0
4R	IGC 08/13.24	0,0	0	0	0	+	0
5R	IGC 08/13.29	0,0	+	0	+	0	0
6R	IGC 08/13.31	0,0	+	+	+	0	0
7R	IGC 08/13.51	0,004	+	0	+	0	+
8R	IGC 08/13.76	0,001	0	0	+	0	0
9R	IGC 08/13.78	0,006	0	0	+	0	+
10R	IGC 08/13.79	0,0	+	0	+	0	0
BR	Смесь ДНК иммунных генотипов		+	0	+	0	0
S1	IGC 08/13.5	>2,0	0	+	0	+	+
S2	IGC 08/13.8	>2,0	0	0	0	+	0
S3	IGC 08/13.9	>2,0	0	+	0	0	0
S4	IGC 08/13.18	>2,0	0	+	0	+	0
S5	IGC 08/13.21	>2,0	0	0	0	0	0
S6	IGC 08/13.22	>2,0	0	+	0	+	0
S7	IGC 08/13.33	>2,0	0	+	0	+	0
S8	IGC 08/13.37	> 2,0	0	+	0	+	+
S9	IGC 08/13.38	> 2,0	0	+	0	+	+
S10	IGC 08/13.44	>2,0	0	0	0	+	+
S11	IGC 08/13.46	>2,0	0	+	0	+	+
S12	IGC 08/13.48	>2,0	0	+	0	+	0
S13	IGC 08/13.49	>2,0	0	+	0	+	+
S14	IGC 08/13.52	>2,0	0	0	0	+	+
S15	IGC 08/13.55	>2,0	0	+	0	+	0
S16	IGC 08/13.56	>2,0	0	+	0	+	+
S17	IGC 08/13.69	>2,0	0	0	0	+	+
S18	IGC 08/13.71	>2,0	0	+	0	+	0
BS	Смесь ДНК неустойчивых генотипов		0	+	0	+	+

Примечание. Генотипы: 1R–10R – с ER, устойчивые к вирусу (resistant); S1–S18 – неустойчивые к вирусу (susceptible); BR и BS – смесь (bulk) ДНК соответственно всех устойчивых и всех неустойчивых генотипов, включенных в анализ.

явить высокий уровень гомологии его 3'-концевого фрагмента размером около 200 нуклеотидов (от 30 до 40 % секвенированной области) с представленными в базах данных транскрибируемыми последовательностями нуклеотидов, кодирующих аминокислотную последовательность медного шаперона (СШ или АТХ1-белок транспорта меди) нескольких видов растений рода *Solanum* и полную идентичность последовательности гена пероксидазы пятого типа *S. tuberosum* (табл. 2). Выявлено также высокое перекрытие сиквентов OPA18₆₀₀ (до 74 %) с различными представителями рода *Solanum*, для которых в настоящее время осуществлено полногеномное секвенирование (картофель *S. tuberosum* и два вида томатов – *S. lycopersicum* и *S. pennellii*). Во всех случаях обнаружена гомология OPA18₆₀₀ и нуклеотидных последовательностей, характерных для хромосомы V. При этом ожидаемо наибольшая степень гомологии оказалась с последовательностью *S. tuberosum* (для различных клонированных фрагментов до 94,3 % гомологии).

Хотя мы связываем наличие экстремальной устойчивости к вирусной инфекции у межвидовых гибридов с присутствием генетического материала, интрогрессированного им от *S. stoloniferum*, следует отметить, что они являются потомством от беккроссирования межвидовых гибридов

Т а б л и ц а 2. Уровень гомологии нуклеотидной последовательности, ассоциированной с экстремальной устойчивостью к Y-вирусу картофеля, с нуклеотидными последовательностями представителей рода *Solanum*, представленными в электронных базах данных NCBI и EBI

Table 2. The homology level of the nucleotide sequence associated with extreme resistance to the potato virus Y, with nucleotide sequences of the genus *Solanum* members, represented in electronic databases NCBI and EBI

Название известной ДНК/кДНК последовательности и ее происхождение	№ прототипа по NCBI и EBI (код доступа)	Уровень идентичности, %	Уровень перекрытия последовательностей, %
<i>Solanum tuberosum</i> , белок транспорта меди ATX1-типа (LOC102580838), мРНК	XM006345830.1	93	41
<i>Solanum lycopersicum</i> , медный шаперон (CCH), мРНК	NM_001247418.1	91	36
<i>Solanum chacoense</i> , медный шаперон, мРНК, полная редакция	EU526019.1	92	30
<i>Solanum chacoense</i> , медный шаперон, мРНК, полная редакция	EM_PL:EU526019	92,4	27
<i>Solanum tuberosum</i> , пероксидаза типа 5 (LOC102594431), мРНК	XM_006345938.1	100	6
EST289948, смешанный элиситор томата ВТИ <i>Lycopersicon esculentum</i> кДНК, клон cLET40E21, последовательность мРНК	EM_EST:AW096768	91	33
YTT13 <i>Lycopersicon esculentum</i> , листья, инокулированные <i>Phytophthora infestans</i> ; <i>Solanum lycopersicum</i> кДНК, последовательность мРНК	EM_EST:GT866010	91,4	27
<i>Solanum pennellii</i> , хромосома 5, полный геном	HG975444.1	90	43
<i>Solanum lycopersicum</i> , хромосома 5, полный геном	HG975517.1	90	74
<i>Solanum tuberosum</i> , хромосома 5, клон RH086I12	EM_HTG:AC238150	94,3	46
<i>Solanum tuberosum</i> , хромосома 5, клон RH203M15	EM_HTG:AC238416	94,3	46
<i>Solanum pennellii</i> , хромосома 5, полный геном	EM_PL:HG975444	89,7	38
<i>Solanum lycopersicum</i> , хромосома 5, полный геном	EM_PL:HG975517	89,7	38

F1 sto × tbr дигиплоидами культурного картофеля (tbr), т. е. несут двойную дозу генома *S. tuberosum*. Известно, что нуклеотидная последовательность различных геномов рода *Solanum* достаточно консервативна, гомология между ними составляет 80 % и более [12]. Поэтому присутствие генетического материала аллотетраплоидного вида, в особенности его А-генома, родственного *S. tuberosum*, при фрагментном анализе сиквенсов может быть малозаметным. Очевидно, этим объясняется и высокая, до 90 %, гомология изучаемого фрагмента с нуклеотидными последовательностями хромосомы V двух видов томатов – *S. pennellii* и *S. lycopersicum*.

На хромосоме V картофеля картировано более 10 R-генов и QTL, связанных с устойчивостью к разным патогенам: вирусам, цистообразующим нематодам и фитофторозу, которые образуют несколько кластеров, так называемых «горячих точек резистентности» (RHS – resistance hot spot). В один из таких кластеров входят два картированных гена устойчивости к X-вирусу – *Rx2* и *Nb*, обеспечивающие устойчивость соответственно ER и HS типа, и ген *R1* устойчивости к фитофторозу от *S. demissum* [12, 13]. Также на хромосоме V расположены еще несколько генов устойчивости к PVX, выявленные у разных видов картофеля [3, 5, 12, 13]. На хромосоме V не описано картированных генов устойчивости к PVY. Однако наличие нескольких различных по происхождению генов устойчивости к X-вирусу, а также присутствие на этой хромосоме гена *R1* от *S. demissum* свидетельствует о возможности обнаружения в этой же группе сцепления новых неизвестных генов устойчивости к другим вирусам, в частности к PVY от *S. stoloniferum*.

На структурное сходство секвенированного фрагмента OPA18₆₀₀ с последовательностями генов устойчивости указывает гомология с такими известными последовательностями, как пероксидаза типа 5 (LOC102594431), клонированная у *Solanum tuberosum*, EST289948 – смешанный элиситор, клонированный у томата ВТИ *Lycopersicon esculentum* (современное название *S. lycopersicum*), и, очевидно, фрагмент кДНК, клонированный из листьев генотипа YTT13 *Lycopersicon esculentum*, инокулированных *Phytophthora infestans* (табл. 2). По-видимому, секвенированная нами последовательность имеет структуру, свойственную последовательностям, кодирующим элиситорные белки, роль которых в формировании NBS-LRR устойчивости хорошо известна [14]. В частнос-

ти, пероксидазы участвуют во включении механизма узнавания на ранних этапах взаимодействия организма-реципиента и патогена по принципу «ген-на-ген» и способствуют возникновению реакции гиперчувствительности и программируемой гибели пораженной клетки за счет оксидативного взрыва, сопровождающегося выбросом свободных радикалов кислорода [14]. Экспериментально показано возникновение такого оксидативного механизма в формировании защитных функций клетки в ответ на проникновение аминокислот капсидного белка или других генных продуктов вируса табачной мозаики (TMV), вируса мозаики цветной капусты (CaMV) и вирусов группы *Potexvirus* [14]. Известно, что этот механизм включается не только при атаке вирусной инфекции, но и при воздействии на растения специфических элиситорных факторов других патогенов, например бактерий, что объясняет высокую (порядка 91 %) схожесть сиквенса OPA18₆₀₀ со смешанным элиситором томата или последовательностью кДНК, выявленной в инокулированных возбудителем фитофтороза листьях томата.

Высоким оказался уровень идентичности исследуемого локуса с последовательностями медного шаперона (СШ) и белка транспорта меди АТХ1, который является аналогом СШ [15]. Как видно из представленных на рисунке данных сравнения последовательностей, отличие, как правило, связано с однонуклеотидными заменами. Причем более высокая частота замен характерна для последовательностей как СШ, так и хромосомы V различных видов томата и, очевидно, связана с видоспецифическими особенностями сиквенса. В то время как идентичность полученного нами сиквенса и нуклеотидной последовательности пероксидазы картофеля оказалась полной (табл. 2, рисунок), обе они имеют одно и то же отличие от других близких по строению нуклео-

277	CCGCGATCAATGTACTTGGCCATCTATGTCATAGAAAATAACACTAAAATTCTCAA-CAAC	335	OPA18-600
	CCGCGATCAATGTACTTGGCCATCTATGTCATAGAAAATAACACTAAAATTCTCAA-CAAC		<i>S. tuberosum</i> chromosome 5
77015140	CCGCGATCAATGTACTTGGCCATCTATGTCATAGAAAATAACACTAAAATTCTCAA-CAAC	77015081	<i>S. pennellii</i> chromosome 5
64151066	CCGCGATCAATGTACTTGGCCATCTATGTCATAGAAAATAACACTAAAATTCTCAA-CAAC	64151007	<i>S. lycopersicum</i> chromosome 5
519	CAATGTACTTGGCCATCTATGTCATAGAAAATAACACTAAAATTCTCAA-CAAC	460	<i>S. tuberosum</i> copper transport protein ATX1-like
379	CATAGAAAATAACACTAAAATTCTCAA-CAAC	320	<i>S. lycopersicum</i> copper chaperone
336	TTATTGCAATTCTGATTTCAA-CTATTACATAGGGGAATCTTGATAAGCTCCACTATTG	394	OPA18-600
	TTATTGCAATTCTGATTTCAA-CTATTACATAGGGGAATCTTGATAAGCTCCACTATTG		<i>S. tuberosum</i> chromosome 5
77015080	TTATTGCAATTCTGATTTCAA-CTATTACATAGGGGAATCTTGATAAGCTCCACTATTG	77015021	<i>S. pennellii</i> chromosome 5
64151006	TTATTGCAATTCTGATTTCAA-CTATTACATAGGGGAATCTTGATAAGCTCCACTATTG	64150947	<i>S. lycopersicum</i> chromosome 5,
459	TTATTGCAATTCTGATTTCAA-CTATTACATAAGGGGAATCTTGATAAGCTCCACTATTG	400	<i>S. tuberosum</i> copper transport protein ATX1-like
319	TTATTGCAATTCTGATTTCAA-CTATTACATAGGGGAATCTTGATAAGCTCCACTATTG	260	<i>S. lycopersicum</i> copper chaperone
419	TTATTGCAATTCTGATTTCAA-CTATTACATAGGGGAATCTTGATAAGCTCCACTATTG	360	<i>S. chacoense</i> copper chaperone
395	CTCAAGCCTTAACATACAATTCC--AGCCATTATACACGAA-TCAAGCTGGACTAGCCGCT	453	OPA18-600
	CTCAAGCCTTAACATACAATTCC--AGCCATTATACACGAA-TCAAGCTGGACTAGCCGCT		<i>S. tuberosum</i> chromosome 5
77015020	CTCAAGCCTTAACATACAATTCC--AGCCATTATACACGAA-TCAAGCTGGACTAGCCGCT	77014961	<i>S. pennellii</i> chromosome 5
64150946	CTCAAGCCTTAACATACAATTCC--AGCCATTATACACGAA-TCAAGCTGGACTAGCCGCT	64150888	<i>S. lycopersicum</i> chromosome 5
399	CTCAAGCCTTAACATACAATTCC--AGCCATTATACACGAA-TCAAGCTGGACTAGCCGCT	341	<i>S. tuberosum</i> copper transport protein ATX1-like
259	CTCAAGCCTTAACATACAATTCC--AGCCATTATACACGAA-TCAAGCTGGACTAGCCGCT	201	<i>S. lycopersicum</i> copper chaperone
359	CTCAAGCCTTAACATACAATTCC--AGCCATTATACACGAA-TCAAGCTGGACTAGCCGCT	301	<i>S. chacoense</i> copper chaperone
	GCT 142		<i>S. tuberosum</i> peroxidase 5-like
454	TCTGTTTGAGCCGATTGCGCTGCTTCCCAGAAAAGATGTGGCTTTCCAGTCTTCGAC	510	OPA18-600
	TCTGTTTGAGCCGATTGCGCTGCTTCCCAGAAAAGATGTGGCTTTCCAGTCTTCGACACA		<i>S. tuberosum</i> chromosome 5
77014960	TCTGTTTGAGCCGATTGCGCTGCTTCCCAGAAAAGATGTGGCTTTCCAGTCTTCGACACA	77014901	<i>S. pennellii</i> chromosome 5
64150887	TCTGTTTGAGCCGATTGCGCTGCTTCCCAGAAAAGATGTGGCTTTCCAGTCTTCGACACA	64150828	<i>S. lycopersicum</i> chromosome 5,
340	TCTGTTTGAGCCGATTGCGCTGCTTCCCAGAAAAGATGTGGCTTTCCAGTCTTCGACACA	281	<i>S. tuberosum</i> copper transport protein ATX1-like
200	TCTGTTTGAGCCGATTGCGCTGCTTCCCAGAAAAGATGTGGCTTTCCAGTCTTCGACACA	141	<i>S. lycopersicum</i> copper chaperone
300	TCTGTTTGAGCCGATTGCGCTGCTTCCCAGAAAAGATGTGGCTTTCCAGTCTTCGACACA	241	<i>S. chacoense</i> copper chaperone
143	TCTGTTTGAGCCGATTGCGCTGCTTCCCAGAAAAGATGTGGCTTTCCAGTCTTCGAC	81	<i>S. tuberosum</i> peroxidase 5-like
511	-----ACAGCGTCTGGTTGAACATTGCCCTTCCAGGTCACCT 547		OPA18-600
	GTCTTGAGAACAGCGTCTGGTTGAACATTGCCCTTCCAGGTCACCT		<i>S. tuberosum</i> chromosome 5
77014900	GTCTTGAGAACAGCGTCTGGTTGAACATTGCCCTTCCAGGTCACCT 77014855		<i>S. pennellii</i> chromosome 5
64150827	GTCTTGAGAACAGCGTCTGGTTGAACATTGCCCTTCCAGGTCACCT 64150783		<i>S. lycopersicum</i> chromosome 5
380	GTCTTGAGAACAGCGTCTGGTTGAACATTGCCCTTCCAGGTCACCT 244		<i>S. tuberosum</i> copper transport protein ATX1-like
140	GTCTTGAGAACAGCGTCTGGTTGAACATTGCCCTTCCAGGTCACCT 124		<i>S. lycopersicum</i> copper chaperone
142	G		<i>S. chacoense</i> copper chaperone
80	-----ACAGCGTCTGGTTGAACATTGCCCTTCCAGGTCACCT 44		<i>S. tuberosum</i> peroxidase 5-like

Соответствие нуклеотидной последовательности локуса OPA18-600 последовательностям, зарегистрированным в электронных базах данных: хромосомы V (chromosome 5) картофеля *S. tuberosum* и томатов *S. pennellii* и *S. lycopersicum*; медного шаперона (copper chaperone, copper transport protein ATX1-like) картофеля видов *S. tuberosum* и *S. chacoense* и томата *S. lycopersicum*; пероксидазы картофеля *S. tuberosum* пятого типа (peroxidase 5-like)

Concordance of the nucleotide sequence of the locus OPA18-600 to sequences recorded in electronic databases: chromosome V (chromosome 5) of potato *S. tuberosum* and tomatoes *S. pennellii* and *S. lycopersicum*; copper chaperone, copper transport protein ATX1-like of potato species of *S. tuberosum* and *S. chacoense* and tomato *S. lycopersicum*; peroxidase 5-like type of potato *S. tuberosum*

тидных последовательностей, выявленных при поиске в базах данных, а именно наличие делеции размером 12 нуклеотидов.

Высокий уровень сходства с последовательностями ССН и АТХ1 на первый взгляд кажется несколько неожиданным. Шапероны представляют собой группу белков, весьма различных по своей структуре, но при этом обладающих общим свойством – взаимодействовать с другими белками, изменяя их структуру. Основная функция ССН – обеспечение гомеостаза ионов меди в клетке, в частности удаление их избытка [15]. Однако известно об антиоксидантной роли многих белков типа шаперонов, например группы белков температурного шока, поддерживающих гомеостаз клетки при воздействии стрессовых факторов [14].

Показана также роль белков-шаперонов в активации киназно-РНК-азного комплекса в эндоплазматическом ретикулуме при стрессовом воздействии на клетки. Это объединяет их в протекторной функциональности с пероксидазами. Так, защитная функция медного шаперона при взаимодействии растения и патогена была экспериментально продемонстрирована на примере растений томата, зараженных бактерией *Botritis cinerea* [15], а также на примере *Saccharomyces cerevisiae* и *Arabidopsis thaliana*. При этом в обоих случаях она заключалась в защите клеток от активных атомов кислорода наряду с функцией транспорта ионов меди. Предполагается также, что функционально шаперон связан с сигнальной системой рецептора этилена, который, как известно, является одним из наиболее значимых элиситоров и при абиотическом стрессе, и при взаимодействии растение–патоген [14].

По-видимому, изученная нами нуклеотидная последовательность локуса OPA18₆₀₀, сходная по строению с известными последовательностями медного шаперона и особенно пероксидазы, соответствует им по выполняемой функции и связана с кодированием сигнального белка-протектора с окислительными свойствами. Такой белок может быть одновременно элиситором для запуска работы R-гена устойчивости к PVY типа NBS-LRR (в соответствии с гипотезой наличия медиаторов при взаимодействии «ген-на-ген» [14]) и выполнять роль протектора при высвобождении свободных радикалов кислорода, сопровождающих реакцию гиперчувствительности, что предотвращает гибель инфицированных клеток. Результаты исследованной нами расщепляющейся популяции IGC08/13.n при заражении Y-вирусом картофеля показали отсутствие выраженной реакции гиперчувствительности у устойчивых генотипов [10].

Таким образом, есть основания полагать, что изученная последовательность локуса OPA18₆₀₀ не является частью собственно R-гена устойчивости к PVY, о чем свидетельствует наличие расщепления среди устойчивых гибридов по этому локусу. Очевидно, она относится к гену, близко расположенному к гену устойчивости к PVY типа NBS-LRR, и, возможно, образует с ним единый кластер, в пользу чего свидетельствует моногенный характер расщепления по признаку устойчивости в гибридной популяции. Выявленный при секвенировании фрагмент ДНК может служить основой для создания на его основе сиквенса-специфического ПЦР-маркера для идентификации источников устойчивости к PVY среди гибридов, полученных на основе аллотетраплоидного вида *S. stoloniferum*.

Заключение. Изучение расщепляющейся по признаку экстремальной устойчивости к Y-вирусу картофеля популяции гибридов, являющихся вторым беккроссным поколением диплоидных гибридов между дигаплоидами культурного картофеля и аллотетраплоидным мексиканским видом картофеля *S. stoloniferum*, с помощью ПЦР-анализа с произвольными праймерами позволило выявить у некоторых высокоустойчивых гибридов наличие специфического фрагмента OPA18₆₀₀, отсутствующего у неустойчивых к вирусу образцов. Анализ нуклеотидной последовательности этого фрагмента с помощью автоматического анализатора показал его полную идентичность последовательности гена пероксидазы пятого типа культурного картофеля и высокую схожесть (более 90 %) с генами медного шаперона разных видов рода *Solanum*, что говорит в пользу функциональной схожести изученной последовательности с генами ответа растительной клетки на стрессовое воздействие патогенов. Высокая идентичность нуклеотидной последовательности локуса OPA18₆₀₀ последовательности нуклеотидов, характерной для хромосомы V разных видов *Solanum*, для которых ранее было осуществлено полногеномное секвенирование, позволяет предположить его принадлежность к данной группе сцепления и тем самым подтверждает наличие

у гибридов фактора устойчивости к PVY, отличного от картированных ранее генов устойчивости *Rysto* и *Ryf-sto*, расположенных на хромосоме XII. Несмотря на наблюдаемое нами расщепление по локусу OPA18₆₀₀ среди устойчивых гибридов, свидетельствующее, по-видимому, о том, что он не является частью собственно R-гена устойчивости к PVY, его гомология с пероксидазами и моногенный характер наследования признака устойчивости к PVY в гибридной популяции являются подтверждением того, что секвенированная последовательность относится к локусу, близко расположенному к гену NBS-LRR типа и косегрегантно с ним наследуемому. Это дает основание для создания на основе выявленной нуклеотидной последовательности сиквенс-специфического ПЦР-маркера для идентификации источников устойчивости к PVY среди гибридов, полученных на основе аллотетраплоидного вида *S. stoloniferum*.

Благодарности. Авторы статьи выражают благодарность кандидату биологических наук А. В. Савчук за помощь в проведении экспериментов, результаты которых легли в основу данной статьи.

Acknowledgements. The authors of the article express their gratitude to the Ph. D. (Biol.) A. V. Savchuk for the help in carrying out the experiments, the results of which formed the basis of this article.

Список использованных источников

1. Иванюк, В. Г. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / В. Г. Иванюк, С. А. Банадысев, Г. К. Журомский. – Минск : Белпринт, 2005. – 695 с.
2. Ohshima, K. Studies on the molecular evolution of potyviruses / K. Ohshima // J. of Gen. Plant Pathology. – 2013. – Vol. 79, N 6. – P. 448–452.
3. Solomon-Blackburn, R. M. Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a traditional and molecular approaches / R. M. Solomon-Blackburn, H. Barker // Heredity. – 2001. – Vol. 86, N 1. – P. 17–35.
4. Cockerham, G. Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y / G. Cockerham // Heredity. – 1970. – Vol. 25, N 3. – P. 309–348.
5. Росс, Х. Селекция картофеля. Проблемы и перспективы / Х. Росс ; пер. с англ. В. А. Лебедева ; ред. И. М. Яшина. – М. : Агропромиздат, 1989. – 183 с.
6. *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.] // Molecular Breeding. – 2005. – Vol. 15, N 1. – P. 95–101.
7. Song, Y.-S. Development of STS markers for selection of extreme resistance (*Rysto*) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars / Y.-S. Song, A. Schwarzfischer // Amer. J. of Potato Research. – 2008. – Vol. 85, N 2. – P. 159–170.
8. Szajko, K. *Ny-1* and *Ny-2* genes conferring hypersensitive response to potato virus Y (PVY) in cultivated potatoes: mapping and marker-assisted selection validation for PVY resistance in potato breeding / K. Szajko, D. Strelczyk-Zyta, W. Marczewski // Molecular Breeding. – 2014. – Vol. 34, N 1. – P. 267–271.
9. Блоцкая, Ж. В. Штаммовоспецифические особенности Y-вируса картофеля (PVY) / Ж. В. Блоцкая // Земледелие и защита растений. – 2014. – № 4. – С. 49–50.
10. Диплоидные гибриды между *Solanum tuberosum* и *S. stoloniferum* как источник устойчивости к фитофторозу и Y-вирусу картофеля / Е. В. Воронкова [и др.] // Иммуногенетическая защита сельскохозяйственных культур от болезней: теория и практика : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 125-летию со дня рождения Н. И. Вавилова, Большие Вяземы Моск. обл., 17–21 июля 2012 г. / Рос. акад. с.-х. наук, Всерос. науч.-исслед. ин-т фитопатологии. – Большие Вяземы, 2012. – С. 325–334.
11. Оценка исходного материала картофеля для селекции на устойчивость к болезням и вредителям с помощью специфических ПЦР-маркеров: метод. рекомендации / А. П. Ермишин [и др.] ; под ред. А. П. Ермишина. – Минск : Право и экономика, 2010. – 60 с.
12. Gebhardt, C. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome / C. Gebhardt, J. P. T. Valkonen // Annu. Rev. Phytopathology. – 2001. – Vol. 39, N 1. – P. 79–102.
13. Genetics of resistance to pest and disease / I. Simko [et al.] // Potato biology and biotechnology: advances and perspectives / ed. : D. Vreugdenhil [et al.]. – Amsterdam, 2007. – P. 117–155.
14. Ronde, D. Dominant resistance against plant viruses / D. Ronde, P. Butterbach, R. Kormelink // Frontiers in Plant Science. – 2014. – Vol. 5. – P. 1–17.
15. Company, P. Identification of a copper chaperone from tomato fruits infected with *Botrytis cinerea* by differential display / P. Company, C. González-Bosch // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2003. – Vol. 304, N 4. – P. 825–830.

References

1. Ivaniuk V. G., Banadysev S. A., Juromsky G. K. *Potato protection against diseases, pests and weeds*. Minsk, Belprint Publ., 2005. 695 p. (in Russian).
2. Ohshima K. Studies on the molecular evolution of potyviruses. *Journal of General Plant Pathology*, 2013, vol. 79, no. 6, pp. 448–452. DOI: 10.1007/s10327-013-0488-9

3. Solomon-Blackburn R. M., Barker H. Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a traditional and molecular approaches. *Heredity*, 2001, vol. 86, no. 1, pp. 17–35. DOI: 10.1046/j.1365-2540.2001.00799.x
4. Cockerham G. Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y. *Heredity*, 1970, vol. 25, no. 3, pp. 309–348. DOI: 10.1038/hdy.1970.35
5. Ross H. Potato Breeding. Problems and Perspectives. Berlin, Hamburg, Parey, 1986. 132 p. (Russ. ed.: Ross H. *Selektsiya kartofelya. Problemy i perspektivy*. Moscow, Agropromizdat Publ., 1989. 183 p.)
6. Flis B., Hennig J., Strzelczyk-Żyta 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, no. 1, pp. 95–101. DOI: 10.1007/s11032-004-2736-3
7. Song Y.-S., Schwarzfischer A. Development of STS markers for selection of extreme resistance (Rysto) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars. *American Journal of Potato Research*, 2008, vol. 85, no. 2, pp. 159–170. DOI: 10.1007/s12230-008-9012-8
8. Szajko K., Strzelczyk-Żyta D., Marczewski W. *Ny-1* and *Ny-2* genes conferring hypersensitive response to potato virus Y (PVY) in cultivated potatoes: mapping and marker-assisted selection validation for PVY resistance in potato breeding. *Molecular Breeding*, 2014, vol. 34, no. 1, pp. 267–271. DOI: 10.1007/s11032-014-0024-4
9. Blotskaja J. V. Strain specific characteristics of potato Y-virus. *Zemledelie i zashchita rastenii = Agriculture and Plant Protection*, 2014, no. 4, pp. 49–50. (in Russian).
10. Voronkova E. V., Chashinsky A. V., Pavliuchuk N. V., Kozlov V. A., Savchuk A. V., Poliukhovich Y. V., Gukasian O. N., Yermishin A. P. Diploid hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum stoloniferum* as a source of late blight and PVY resistance. *Immunogeneticheskaya zashchita sel'skokhozyaistvennykh kul'tur ot boleznei: teoriya i praktika: materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 125-letiyu so dnya rozhdeniya N. I. Vavilova, Bol'shie Vyazemy Moskovskoi oblasti, 17–21 iyulya 2012 g.* [Proceedings of the International Scientific and Practical Conference «Immunogenetic Control of Plant Diseases Agriculture: the Theory and Practice» (July 17–21, 2012)]. *Bol'shie Vyazemy*, 2012, pp. 325–334 (in Russian).
11. Yermishin A. P., Voronkova E. V., Savchuk A. V., Luksha V. I., Poliukhovich Y. V., Makhan'ko O. V., Lisovskaja V. M. *Assessment of the initial potato material for breeding for resistance to diseases and pests using specific PCR markers: methodological recommendations*. Minsk, Pravo i ekonomika Publ., 2010. 60 p. (in Russian).
12. Gebhardt C., Valkonen J. P. T. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annual Review of Phytopathology*, 2001, vol. 39, no. 1, pp. 79–102. DOI: 10.1146/annurev.phyto.39.1.79
13. Simko I., Jansky S., Stephenson S., Spooner D. Genetics of resistance to pest and disease. *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives*. Amsterdam, 2007, pp. 117–155. DOI: 10.1016/B978-044451018-1/50049-X
14. Ronde D., Butterbach P., Kormelink R. Dominant resistance against plant viruses. *Frontiers in Plant Science*, 2014, vol. 5, pp. 1–17. DOI: 10.3389/fpls.2014.00307
15. Company P., González-Bosch C. Identification of a copper chaperone from tomato fruits infected with *Botrytis cinerea* by differential display. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, vol. 304, no. 4, pp. 825–830. DOI: 10.1016/s0006-291x(03)00680-6

Информация об авторах

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.

Лукша Виктория Ивановна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: V.Luksha@igc.by.

Левый Александр Васильевич – аспирант. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: A30413@mail.ru.

Гукасян Ольга Николаевна – науч. сотр. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь).

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.

Information about the authors

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

Victoria I. Luksha – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: V.Luksha@igc.by.

Alexander V. Levy – Postgraduate student. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: A30413@mail.ru.

Olga N. Gukasian – Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

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