

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ *Solanum pinnatisectum* Dun. И *S. chacoense* Bitt. ПО РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ВИРУСУ КАРТОФЕЛЯ Y И РЕЗУЛЬТАТАМ ДНК-АНАЛИЗА

© 2019 г. Е. В. Рогозина¹*, П. С. Ульянич¹, В. А. Волков¹, Н. А. Чалая¹, Е. К. Потокина^{1,2}

¹Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений
им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, 190121 Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: erogozina@vir.nw.ru

Поступила в редакцию 10.04.2019 г.

После доработки 12.06.2019 г.

Принята к публикации 19.06.2019 г.

Картофель *Solanum tuberosum* L. располагает наибольшим разнообразием культурных и дикорастущих сородичей, генетическая природа которых исследована недостаточно. В настоящей работе изучена резистентность видов *S. chacoense* Bitt. и *S. pinnatisectum* Dun. к YVK и осуществлен поиск ДНК-маркеров, сцепленных с генами устойчивости. Впервые представительные популяции двух диплоидных клубненосных *Solanum* spp. охарактеризованы по резистентности к YVK и наличию ДНК-маркеров, сцепленных с генами сверхустойчивости (*Ry*) или сверхчувствительности (*Ny*), локализованными в сегменте длинного плеча хромосомы 9. Изучены девять образцов *S. chacoense* и шесть образцов *S. pinnatisectum* из коллекции ВИР. Растения 168 генотипов *S. chacoense* и 170 генотипов *S. pinnatisectum* оценены по устойчивости к искусственному заражению YVK. Установлены различия в разделении двух дикорастущих видов картофеля на фенотипические классы при заражении YVK. Разнообразие видимых реакций растений *S. chacoense* при инфицировании YVK отличается от однотипных симптомов, наблюдаемых у *S. pinnatisectum*. ДНК-анализ проведен для 170 генотипов *S. chacoense* и 44 генотипов *S. pinnatisectum* с использованием маркеров *Ry*186, *S*1d11 и *ST*220, сцепленных с генами, детерминирующими устойчивость к вирусам у сортов, селекционных клонов картофеля или видов рода *Solanum* L. У большинства генотипов *S. chacoense* и *S. pinnatisectum* амплифицирован маркер *ST*220, сцепленный с геном *Nx_{phu}* у линии *IvP*35 вида *S. phureja* Juz. et Buk. и геном *Sw*-5 у томата. *STS*-маркер *Ry*186, сцепленный с геном *Ry_{chc}* у японских сортов, созданных на основе *S. chacoense*, обнаружен у незначительного числа генотипов *S. chacoense* и ассоциации маркер–признак не выявлено. Разработан *CAPS*-маркер *S*1d11/*Acs*I, различающий устойчивые и восприимчивые к YVK генотипы обоих дикорастущих видов картофеля. Растения двух дикорастущих клубнеобразующих видов *Solanum* L. впервые массово обследованы на наличие маркера гена *GBSSI* (гена гранул-связанной крахмалсинтазы). У значительной части генотипов (15% *S. pinnatisectum* и 25% *S. chacoense*) маркер гена, который контролирует биосинтез амилозы в формирующихся крахмальных гранулах, не выявлен. По способности формировать клубни между генотипами, которые обладают и не обладают маркером *GBSS*, значимых различий не выявлено, что свидетельствует о наличии аллельного варианта гена *GBSSI* у видов *S. chacoense* и *S. pinnatisectum*.

Ключевые слова: клубнеобразующие дикие виды *Solanum* L., вирусы картофеля, *R*-гены устойчивости, полимеразная цепная реакция, полиморфизм ДНК-маркеров.

DOI: 10.1134/S0016675819110134

Возделываемый в сельскохозяйственном производстве картофель (*Solanum tuberosum* L. subsp. *tuberosum*) вместе с другими видами, образующими клубни и сходными по морфологии надземных органов, относится к подсекции *Potatoe* G. Don. в составе секции *Petota* Dumort. рода *Solanum* L. В сравнении с другими важнейшими сельскохозяйственными культурами картофель располагает наибольшим разнообразием культурных и дикорастущих сородичей [1]. Естественные местообитания

видов секции *Petota* Dumort. рода *Solanum* L. приурочены к разным эколого-географическим районам на обширной территории, простирающейся от южных районов США (38° с.ш.) до побережья Чили и архипелага Чилоэ (41° ю.ш.), в пределах 16 стран Центральной и Южной Америки [2].

Клубнеобразующие виды рода *Solanum* L. обладают широким спектром признаков устойчиво-

сти к неблагоприятным факторам среды, отсутствующих у коммерчески возделываемого картофеля, в том числе устойчивостью к болезням и вредителям. Основным методом селекции картофеля — это межвидовая гибридизация, которая позволяет осуществить интрогрессию генетического материала (обеспечивающего наследование целевого признака) от родственных видов *Solanum* в геном культурного картофеля [3]. Картофель — вегетативно размножаемая культура, восприимчивая к вирусным заболеваниям, среди которых повсеместно серьезные экономические потери вызывает инфицирование вирусом картофеля Y (YBK) [4]. Устойчивые к YBK формы найдены среди дикорастущих клубнеобразующих *Solanum* spp. Генетические исследования диких родичей *Solanum* L. проведены на ограниченном числе видов. Молекулярно-генетический скрининг коллекций существенно расширяет знания о составе R-генов у дикорастущих форм картофеля [5].

Селекция на резистентность к YBK основана на сверхустойчивости (extreme resistance), контролируемой геном *Ry*, или на сверхчувствительности (hypersensitivity), детерминированной геном *Ny* [6]. Сверхустойчивость (иммунитет) к YBK контролируют гены *Ry_{sto}* (источник — *S. stoloniferum* Schlecht.), *Ry_{chc}* (*S. chacoense* Bitt.) и *Ry_{adg}* (*S. tuberosum* ssp. *andigena* Juz. et Buk.), переданные в российские и зарубежные сорта и селекционные клоны от разных источников [3, 6]. Сверхчувствительность к определенным штаммам YBK, характерная для некоторых европейских сортов и селекционных клонов, унаследована от *S. demissum* Lindl., *S. chacoense* и *S. tuberosum* [6] и обнаружена у вида *S. sparsipilum* (Bitt.) Juz. et Buk. [7]. Гены сверхустойчивости и сверхчувствительности локализованы в кластерах на хромосомах 4, 9, 11 и 12.

В современной селекции большое значение имеет использование MAS (Marker-assisted-selection — отбор с помощью молекулярных маркеров) для идентификации форм с генами, детерминирующими ценные признаки. Интенсификация селекционного процесса картофеля на основе MAS-технологии является одной из приоритетных задач современных генетико-селекционных исследований. Для обнаружения генов *Ry* и *Ny* разработаны фланкирующие ДНК-маркеры [6]. Результаты тестирования селекционного материала в США и Канаде с помощью маркеров генов *Ry_{sto}* и *Ry_{adg}* свидетельствуют о необходимости новых более специфичных маркеров генов иммунитета к YBK [8, 9]. Молекулярный скрининг генетических коллекций и сортов российской селекции выявил разную частоту форм с генами *Ry_{sto}*, *Ry_{chc}* и *Ry_{adg}*, в зависимости от селекционного центра — оригинатора изученного материала [10–12]. Однако результаты анализа сортов и селекцион-

ных клонов с использованием молекулярных маркеров, опубликованные в литературе, не всегда сопровождаются сведениями об устойчивости исследованных сортов и селекционных клонов к YBK.

Исходные образцы — формы *S. stoloniferum*, *S. andigenum*, *S. chacoense* и *S. demissum*, использованные как источник генетического материала в селекции на устойчивость к YBK, не сохранились. Валидация ДНК-маркеров проводится главным образом на сортах и селекционных клонах гибридного происхождения. Поэтому особый интерес представляют исследование генетической природы устойчивости клубнеобразующих видов рода *Solanum* L. к YBK и поиск ДНК-маркеров, надежно сцепленных с целевым локусом у диких родичей картофеля. Цель настоящей работы — изучение резистентности видов *S. chacoense* и *S. pinnatisectum* к вирусу картофеля Y и поиск ДНК-маркеров, сцепленных с генами устойчивости. Впервые представительные популяции двух диплоидных клубненосных *Solanum* spp. охарактеризованы по устойчивости к YBK и наличию ДНК-маркеров, сцепленных с генами *Ry*, *Ny*, локализованными в одном участке хромосомы 9.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал исследования — образцы вида *S. chacoense* кк-2732, 2861, 3060, 7394, 19769, 21848, 21849, 21854, 22638 и вида *S. pinnatisectum* кк-4455, 4459, 15254, 19157, 21955, 23569 из коллекции ВИР. Изучали семенное потомство (25–30 семян каждого образца) и растения первой клубневой репродукции.

Фитопатологический анализ. Оценка резистентности к YBK проведена стандартными методами искусственного заражения — механической инокуляции (все растения *S. pinnatisectum* и *S. chacoense*) и прививки (растения *S. pinnatisectum*, устойчивые при механической инокуляции). Источник инфекции — картофель сорта Детско-сельский и клон *S. chacoense* к-21321, пораженные обычным YBK⁰ и некротическим YBK^N штаммами вируса соответственно. Для накопления вирусной инфекции, приготовления инокулята и как подвой при испытании прививкой использовали растения *Nicotiana tabacum* L. (сорт Самсун). Механическую инокуляцию растений *S. chacoense* и *S. pinnatisectum* проводили дважды с интервалом 7–8 дней. Использовали общую суспензию сока растений табака, инфицированных обычным YBK⁰ и некротическим YBK^N штаммами. Результаты оценивали через две-три недели после второго заражения визуально по симптомам вирусного поражения и методом иммуноферментного анализа (ИФА) (Enzyme-linked-Immuno-sorbent Assay, ELISA) в модификации “двойной сэндвич” [13].

Использовали диагностические наборы НПО “Биотехнология” ВНИИКХ им. А.Г. Лорха (Коренево, Московская обл.). Контроль – растения *N. tabacum* L. непораженные и инфицированные Y-вирусом. Диагностику поражения YBK проводили дважды: у семян и растений первой клубневой репродукции.

Молекулярные методы анализа. ДНК выделяли из свежих листьев с использованием СТАВ-буфера и 2-меркаптоэтанола по протоколу Doyle et al. [14]. Для выделения ДНК 100–150 мг материала измельчали путем замораживания в жидком азоте и гомогенизации в автоматической мельнице. Реакционная смесь ПЦР состояла из 2.5 мкл $10\times$ *Taq*-буфера с $MgCl_2$, 1 мкл смеси dNTP (10 мМ), 0.5 мкл каждого из праймеров (10 мМ), 0.5 мкл *Taq*-полимеразы (5 ед./мкл) и 2 мкл ДНК (10–30 нг/мкл). Объем доводили до 25 мкл деионизированной водой.

Использовали маркеры Ry186, S1d11 и СТ220, сцепленные с генами, детерминирующими устойчивость к вирусам и локализованными в сегменте длинного плеча хромосомы 9 [6]. STS-маркер Ry186 был разработан Takeuchi с соавт. (2008 г.) и демонстрировал частоту рекомбинации 0.203% с геном устойчивости *Ry_{chc}* [цит. по 15]. Этот маркер оказался сцепленным с геном *Ry_{chc}* у японских сортов Saikai 35 и Konafubuki (последний создан на основе сверхустойчивого к YBK образца *S. chacoense*) [15, 16], а также с геном *Ny-Smira*, контролирующим сверхчувствительность сорта Sarpo Mira к штамму YBK^{NTN}, который вызывает некротическое поражение клубней [17]. CAPS-маркер S1d11 сцеплен с геном *Ny-1*, детерминирующим сверхчувствительность сортов Albatros, Koga, Neptune, Niagara и Sekwana к штамму YBK^N [18]. RFLP-маркер СТ220 сцеплен с локализованными в том же участке 9-й хромосомы геном *Nx_{phu}*, детерминирующим сверхчувствительность линии IvP35 клубнеобразующего вида *S. phureja* Juz. et Buk. к вирусу картофеля X (ХБК) [19], и геном *Sw-5*, контролирующим устойчивость томата к вирусу бронзовости или пятнистого увядания (TSWV, tomato spotted wilt virus) [20].

Для амплификации маркера Ry186 использовали праймеры (5'-TGGTAGGGATATTTTCCSTTAGA-3', 5'-GCAAATCCTAGGTTATCAACTCA-3') и условия реакции, предложенные Mori с соавт. [15]. Протокол амплификации: 1 цикл (10 мин – 94°C), 35 циклов (30 с – 94°C, 30 с – 55°C, 1 мин – 72°C), 1 цикл (5 мин – 72°C). В качестве положительного контроля при постановке ПЦР для определения маркера Ry186 использован маркер GBSS гена *GBSSI* (гена гранул-связанной крахмалсинтазы), согласно рекомендации Mori с соавт. [15]. В анализ включены сорта Башкирский и Белоснежка, у которых детектирован маркер Ry186 [10].

Для амплификации маркера СТ220 использовали праймеры (5'-AAGCGAATTATCTGTCAAC-3' и 5'-GTTCCCTGACCATTACAAAAGTAC-3'), предложенные van der Voort с соавт. [21]. Программа амплификации включала 1 цикл денатурации (95°C – 3 мин), 35 циклов (95°C – 30 с, 60°C – 45 с, 72°C – 90 с), 1 цикл элонгации (72°C – 10 мин).

Результаты ПЦР для маркеров Ry186 и СТ220 анализировали методом электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле.

Для амплификации маркера S1d11 использовали праймеры (5'-GCCAAAAGGGTAGGAAAAATG-3' и 5'-TCATCTTCACGAATCGGACTAAA-3') по протоколу ПЦР, предложенному Szajko с соавт. [18]: 1 цикл денатурации (95°C – 3 мин), 35 циклов (95°C – 25 с, 54°C – 35 с, 72°C – 90 с), 1 цикл элонгации (72°C – 5 мин).

Для секвенирования последовательностей маркеров S1d11 и СТ220 продукт ПЦР очищали и концентрировали с использованием магнитных частиц AMPure XP по протоколу Agencourt AMPure XP [22]. Подготовку проб для секвенирования проводили с использованием набора BigDye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific). Состав реакционной смеси был адаптирован для генетического анализатора Нанофор-05 (Синтол) и включал: 1.2 мкл $5\times$ Sequencing Buffer, 0.3 мкл Ready Reaction Mix, 0.3 мкл (10 мМ) праймера, 4.5 мкл деионизированной воды и 2 мкл очищенного ПЦР-продукта. Необходимая концентрация ПЦР-продукта доводилась согласно руководству BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit USER GUIDE [23]. Программа амплификации и дальнейшая очистка продукта реакции с использованием 125 мМ EDTA выполнялись в соответствии с рекомендациями производителя.

Продукт ПЦР, полученный для маркера S1d11, подвергался рестрикции с эндонуклеазой *AcsI*. Реакция рестрикции для *AcsI* имела следующий состав: 1 мкл SEBuffer W, 0.1 мкл *AcsI* (20 ед./мкл), 1 мкл BSA (1 мг/мл), 2.9 мкл деионизированной воды, 5 мкл продукта ПЦР (10–20 нг/мкл). Реакционная смесь инкубировалась при 50°C в течение 3 ч, с последующей инактивацией фермента при 80°C (20 мин). Результаты рестрикции анализировали методом электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле. Длину фрагментов определяли с помощью маркера длин GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программы Statistica Basic Academic 13 (ЗАО СтатСофт Раша). Оценку связи ДНК-маркеров и признака устойчивости к YBK выполняли путем анализа таблиц сопряженности с помощью критерия согласия Пирсона (χ^2 , хи-квадрат) с поправкой Йетса на непрерывность. Опровержение H_0 -гипотезы об

Таблица 1. Результаты искусственного заражения *S. chacoense* и *S. pinnatisectum* УВК

| Номер образца по каталогу ВИР | Растений всего | Из них при визуальной диагностике | | | | Распределение на фенотипические классы* | | | |
|-------------------------------|----------------|-----------------------------------|--------------|----|----|---|------------|---------------------|---------------|
| | | без симптомов | с симптомами | | | растений всего | из них | | |
| | | | Л | С | Г | | устойчивых | сверхчувствительных | восприимчивых |
| <i>S. chacoense</i> | | | | | | | | | |
| 2732 | 20 | 5 | 4 | 9 | 2 | 9 | 1 | 4 | 4 |
| 2861 | 20 | 0 | 4 | 16 | 0 | 12 | 1 | 6 | 5 |
| 3060 | 19 | 3 | 5 | 10 | 1 | 8 | 1 | 2 | 5 |
| 7394 | 21 | 0 | 10 | 9 | 2 | 14 | 0 | 2 | 12 |
| 19769 | 20 | 10 | 4 | 6 | 0 | 17 | 8 | 2 | 7 |
| 21848 | 13 | 0 | 6 | 6 | 1 | 5 | 0 | 2 | 3 |
| 21849 | 19 | 0 | 7 | 12 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| 21854 | 19 | 5 | 3 | 9 | 2 | 8 | 1 | 1 | 6 |
| 22638 | 16 | 1 | 10 | 5 | 0 | 8 | 0 | 2 | 6 |
| <i>S. pinnatisectum</i> | | | | | | | | | |
| 4455 | 30 | 22 | 5 | 0 | 3 | 3 | 3 | 0 | 0 |
| 4459 | 30 | 26 | 4 | 0 | 0 | 10 | 9 | 0 | 1 |
| 15254 | 25 | 9 | 2 | 0 | 14 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 19157 | 30 | 13 | 3 | 0 | 14 | 6 | 4 | 0 | 2 |
| 21955 | 30 | 27 | 0 | 0 | 3 | 14 | 14 | 0 | 0 |
| 23569 | 25 | 7 | 7 | 0 | 11 | 6 | 4 | 0 | 2 |

Примечание. Л – локальная реакция (точечные некрозы на инокулированных листьях); С – системная реакция (некроз жилок, некротические пятна на верхних листьях, мозаика и морщинистость); Г – гибель растений.

* По результатам ИФА.

отсутствии связи между параметрами происходит при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Фитопатологическая оценка

Растения 338 генотипов двух диплоидных *Solanum* spp.: 168 генотипов девяти образцов *S. chacoense* и 170 генотипов шести образцов *S. pinnatisectum* оценены по резистентности к УВК и установлены различия между видами по реакции на искусственное заражение вирусом (табл. 1). В семьях растений *S. chacoense* через неделю после механической инокуляции наблюдали разнообразие видимых симптомов: появление крапчатости, затем морщинистой мозаики или точечные некрозы на инокулированных листьях, некроз жилок на инокулированных и вышерасположенных листьях, некротизацию вышерасположенных листьев и/или полегания, опадение листьев, иногда гибель растения. В семьях растений *S. pinnatisectum* после механической инокуляции наблюдали опадение листьев и/или гибель растений.

В результате распространения некрозов погибли лишь некоторые растения образцов *S. chacoense* кк-2732, 3060, 7394, 21848 и 21854, тогда как заражение растений *S. pinnatisectum* вызвало массовую гибель в семьях образцов кк-15254, 19157 и 23569 (табл. 1). Отсутствие внешних симптомов заболевания было характерно для большинства растений в семьях образцов *S. pinnatisectum* кк-4455, 4459 и 21955, тогда как среди растений *S. chacoense* только в семье к-19769 половина растений не имела внешних симптомов вирусного заражения, в остальных – растений без симптомов поражения было значительно меньше или совсем не наблюдали. У большинства растений *S. chacoense* образца к-22638 отмечена локальная реакция на заражение, в семьях образцов к-2861 и к-21849 у значительной части растений наблюдалось проявление системной реакции. Среди исследованных образцов *S. chacoense* наибольшее разнообразие реакций на заражение УВК характерно для семей кк-2732, 3060 и 21854, в каждой из которых выявлены растения визуально здоровые, с локальной или системной реакцией, мозаичностью или быстрой некротизацией, приводящей к гибели растений.

Данные иммуноферментного анализа подтверждают различия в резистентности *S. chacoense* и *S. pinnatisectum* к ЮВК. В изученной выборке растений двух дикорастущих родичей по результатам двухлетних испытаний 91 генотипа *S. chacoense* выявлено 12 устойчивых, 21 сверхчувствительных и 58 восприимчивых к ЮВК, среди 43 генотипов *S. pinnatisectum* — 34 устойчивых и 9 восприимчивых. Среди растений *S. chacoense*, без симптомов или с некротической реакцией на заражение вирусом, установлено наличие ЮВК в соке 27–100% проверенных генотипов в зависимости от образца. Сверхчувствительные генотипы *S. chacoense* выявлены в семьях образцов кк-2732, 2861, 3060, 19769 и 21854 (табл. 1). Диагностика методом ИФА растений *S. pinnatisectum*, без симптомов вирусного поражения, установила отрицательную реакцию всех растений образца к-21955 и положительную (наличие ЮВК) в соке 7–73% проверенных генотипов остальных образцов. Сверхустойчивые к ЮВК генотипы *S. pinnatisectum* выявлены в семьях образцов кк-4455, 4459, 19157, 21955 и 23569. У некоторых генотипов образца к-15254 *S. pinnatisectum* и образца к-21854 *S. chacoense* не отмечены симптомы вирусного поражения, но обнаружена положительная реакция ИФА на ЮВК, что свидетельствует об их толерантности к вирусу.

Анализ полиморфизма ДНК-маркеров, сцепленных с генами устойчивости

Анализ с использованием ДНК-маркеров был проведен для 170 генотипов *S. chacoense* и 44 генотипов *S. pinnatisectum*. В дополнение к исследуемой выборке *S. chacoense* обследованы на наличие ДНК-маркеров два клона — 3-41-6 и 3-42-2 образца к-19759 *S. chacoense*, выделенных ранее в коллекции ВИР и использованных как источники устойчивости к ЮВК при создании межвидовых гибридов — доноров селекционно-ценных признаков картофеля. Проанализирован полиморфизм трех ДНК-маркеров, сцепленных с устойчивостью к вирусам у картофеля и томата и локализованных в коротком сегменте на хромосоме 9 [6]. В их числе: CAPS-маркер S1d11, сцепленный с геном сверхчувствительности *Ny-1* [18], STS-маркер Ry186, сцепленный с генами *Ry_{che}*, *Ny-Smira* [16, 17], и RFLP-маркер СТ220, который у видов семейства пасленовые (*Solanaceae* Juss) сцеплен с локусами генов *Nx_{phu}* и *Sw-5*, контролирующими устойчивость к ХВК и TSWV [19, 20]. В нашем исследовании впервые растения двух дикорастущих клубнеобразующих видов *Solanum* L. обследованы на наличие маркера гена *GBSSI* (гена гранул-связанной крахмалсинтазы), который рекомендован как положительный контроль при постановке ПЦР для определения маркера Ry186 [15].

Для детекции полиморфизма CAPS-маркера S1d11 у сортов картофеля ранее использовалась ре-

стриктаза *MnII*. У дикорастущих видов картофеля полиморфные сайты могли различаться, поэтому перед массовым скринингом выборки мы провели секвенирование ПЦР-продукта S1d11 у шести образцов *S. chacoense*, контрастных по устойчивости к ЮВК. В результате в амплифицированной последовательности 386 пн были выявлены два полиморфных сайта, служивших мишенями для эндонуклеазы рестрикции *AcsI*. Полученный CAPS-маркер S1d11/*AcsI* разделил выборку из 95 генотипов *Solanum* spp. на две группы, различающиеся по профилю рестрикции (+) и (–) (рис. 1). Генотипы, имеющие в профиле рестрикции фрагмент размером ~256 пн (+), показывали достоверную корреляцию с устойчивостью. Генотипы, не имеющие этого фрагмента в профиле рестрикции (–), показали восприимчивость к ЮВК. Ассоциация выявленных групп с устойчивостью к ЮВК при искусственном заражении оказалась статистически достоверной (табл. 2).

Маркер СТ220 был амплифицирован у большинства генотипов *S. chacoense* и *S. pinnatisectum* (85 и 98% соответственно), не показав ассоциации с исследованным фенотипом. Секвенирование ПЦР-продукта СТ220 у восьми образцов, контрастных по устойчивости, и анализ полученных последовательностей не выявили нуклеотидного полиморфизма у генотипов *S. chacoense* и *S. pinnatisectum*, который можно было использовать как мишень для эндонуклеаз.

Маркер Ry186 был амплифицирован у сортов Башкирский и Белоснежка, у семи генотипов *S. chacoense* (шесть в семье к-7394 и один — в семье к-2732) и не обнаружен у *S. pinnatisectum*. При этом маркерный фрагмент GBSS, использованный как позитивный контроль ПЦР, выявлен у большинства генотипов *S. chacoense* (75%) и *S. pinnatisectum* (85%), в том числе у 11 из 14 генотипов *S. chacoense*, устойчивых к ЮВК, но не имеющих маркера Ry186. По способности формировать клубни между генотипами, которые обладают и не обладают маркером GBSS, значимых различий не выявлено.

Ассоциации маркеров СТ220 и Ry186 с устойчивостью растений двух видов *Solanum* L. к ЮВК не установлено (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые представительные популяции двух дикорастущих клубнеобразующих видов *Solanum* L. охарактеризованы по резистентности к ЮВК и наличию ДНК-маркеров, картированных в локусе хромосомы 9. Установлены различия в разделении двух дикорастущих видов картофеля на фенотипические классы при заражении ЮВК. Разнообразие видимых реакций растений *S. chacoense* отличает представителей этого вида от растений *S. pinnati-*

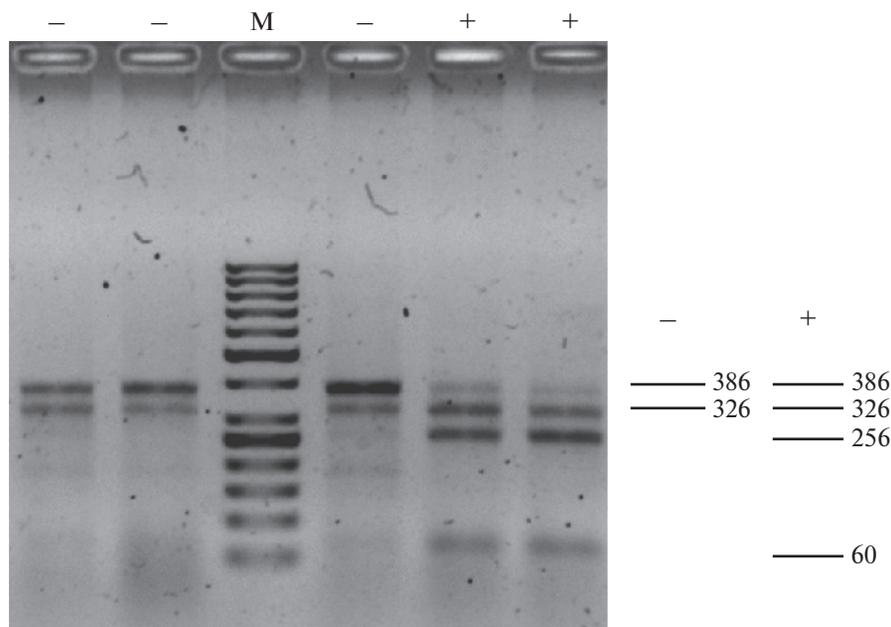


Рис. 1. Профили рестрикции, выявленные с помощью CAPS-маркера S1d11/AcsI, среди образцов картофеля, показавших устойчивость (+) и восприимчивость (-) к ЮВК. М – маркер длин фрагментов ДНК.

sectum с однотипной симптоматикой при инфицировании ЮВК.

Вид *S. chacoense* относится к серии Yungasensa Cogn., *S. pinnatisectum* – к серии Pinnatisecta

(Rudb.) Hawkes, между их представителями явно выражены морфологические отличия наземных органов; ареалы серий находятся в разных эколого-географических регионах. Вид *S. chacoense*

Таблица 2. Число генотипов *S. chacoense* и *S. pinnatisectum* с идентифицированными ДНК-маркерами в разных фенотипических классах

| ДНК-маркер | Фенотип | | Критерий χ^2 Пирсона* (<i>p</i> -уровень) |
|-------------------------|------------|---------------|--|
| | устойчивый | восприимчивый | |
| <i>S. chacoense</i> | | | |
| CT220 (+) | 10 | 40 | 3.98 (0.05) |
| (-) | 4 | 2 | |
| Ry186 (+) | 0 | 1 | 0.28 (0.60) |
| (-) | 14 | 37 (4 н.д.) | |
| S1d11/AcsI (+) | 12 | 3 | 29.17 (0.00) |
| (-) | 2 | 39 | |
| <i>S. pinnatisectum</i> | | | |
| CT220 (+) | 28 | 8 | 0.49 (0.48) |
| (-) | 1 | 0 | |
| Ry186 (+) | 0 | 0 | н.д. |
| (-) | 29 | 8 | |
| S1d11/AcsI (+) | 29 | 0 | 31.33 (0.00) |
| (-) | 0 | 8 | |

Примечание. (+) и (-) – контрастные молекулярные фенотипы. н.д. – нет данных.

* С поправкой Йетса.

произрастает в Южной Америке, на территории нескольких стран — Аргентины, Боливии, Бразилии, Парагвая, Перу и Уругвая. Ареал *S. pinnatisectum* находится на территории другого континента — в Мексике. Виды имеют разные EBN (endosperm balance number — показатель балансового числа эндосперма) и по результатам молекулярного генотипирования относятся к разным клатам [2], т.е. являются эволюционно отдаленными дикими клубненосными родичами *Solanum* L. Обнаруженные нами различия в реакции на заражение YBK отражают несходство генетической природы двух *Solanum* spp.

ДНК-анализ с использованием трех маркеров, сцепленных с генами устойчивости сортового картофеля к YBK, клубнеобразующего вида *S. phureja* к ХВК и томата к TSWV, обнаруживает согласованность в распределении каждого ДНК-маркера у исследованных генотипов двух клубнеобразующих дикорастущих видов *Solanum* L. Маркер СТ220 амплифицируется у подавляющего большинства генотипов *S. chacoense* и *S. pinnatisectum*, хотя полиморфизма в амплифицированной последовательности ДНК обнаружить не удалось. Этот маркер описан как сцепленный с генным кластером *Sw-5*, который первоначально был идентифицирован как доминантный локус гена, контролирующего устойчивость томата сорта Stevens (созданного на основе дикого вида *Solanum peruvianum* Mill.) к тосповирусу TSWV. Позднее у томата с кластером *Sw-5* обнаружена устойчивость к широкому кругу тосповирусов. В составе кластера найдены пять паралогов, кодирующих белки с доменами NB и LRR, и идентифицирован иммунный рецептор против TSWV [24]. Выявление в нашем исследовании ДНК-последовательности, соответствующей маркеру СТ220 у генотипов филогенетически удаленных *Solanum* spp., указывает на ее консервативность у рода *Solanum* L.

Маркер *Ry186*, сцепленный с геном *Ry_{chc}* у сортов картофеля японской селекции, резистентность которых к YBK обеспечила интрогрессия генетического материала *S. chacoense*, редко встречается у образцов этого вида. Маркер *Ry186* не найден у другого исследованного нами клубнеобразующего вида — *S. pinnatisectum*. Обнаружение маркера *Ry186* у отечественных сортов картофеля [10] необходимо дополнить результатами анализа их сегрегирующего потомства для подтверждения его диагностической ценности. Полученные в нашем исследовании формы *S. chacoense* с контрастной реакцией на инфицирование YBK являются основой для дальнейшего изучения, картирования и идентификации *R*-генов.

Сопряженный молекулярный и фитопатологический скрининг обширной выборки *S. chaco-*

ense и *S. pinnatisectum* позволил разработать CAPS-маркер *S1d11/AcsI*, надежно различающий генотипы двух родственных клубнеобразующих видов по резистентности к YBK. Валидация маркера *S1d11/AcsI* на генетически разнообразном материале — источниках устойчивости к YBK в коллекции ВИР позволит уточнить его универсальность и возможность использования в практической селекции.

При массовом скрининге двух дикорастущих клубнеобразующих видов *Solanum* L. маркер гена *GBSSI* (гена гранул-связанной крахмалсинтазы) у значительной части (15–25%) генотипов *Solanum* spp. не обнаружен. Невыявление у растений *S. chacoense* и *S. pinnatisectum* ДНК-маркера одного из генов, ассоциированных с метаболизмом крахмала, представляет определенный интерес, хотя нельзя полностью исключить и вероятность неудачной ПЦР. Ген *GBSSI* (гранул-связанной крахмалсинтазы), контролирующей биосинтез амилозы в формирующихся крахмальных гранулах, выявлен и охарактеризован во многих сортах картофеля, его инактивация позволяет получить картофель, клубни которого содержат преимущественно амилопектин [25]. В настоящем эксперименте не отмечено достоверных различий в клубнеобразовании между генотипами с *GBSS*-маркером и без маркера у обоих диких видов. Полученные нами результаты по детекции *GBSS*-маркера могут быть объяснены наличием аллельного варианта гена *GBSSI* у дикорастущих диплоидных видов *S. chacoense* и *S. pinnatisectum*.

Авторы выражают благодарность Е.Н. Юркиной за сохранение клоновых растений *S. chacoense* и *S. pinnatisectum*.

Работа поддержана грантом РФФИ (№ 18-016-00138) “Молекулярно-генетический анализ локусов, ассоциированных с устойчивостью видов и гибридов секции *Petota* рода *Solanum* L. к фитофторозу и Y вирусу картофеля”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vincent H., Wiersema J., Kell S. et al. A prioritized crop wild relative inventory to help underpin global food security // Biol. Conservation, 2013. V. 167. P. 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.08.011>
2. Spooner D., Ghislain M., Simon R. et al. Systematics, diversity, genetics, and evolution of wild and cultivated

- potatoes // *Bot. Rev.* 2014. V. 80. P. 283–383.
<https://doi.org/10.1007/s12229-014-9146-y>
3. *Ross H.* Potato breeding – Problems and perspectives // *Advances in Plant Breeding. Suppl. 13 to J. Plant Breeding.* Berlin; Hamburg: Publ. Paul Parey, 1986. 132 p.
 4. *Tsedaley B.* A review paper on Potato Virus Y (PVY) biology, economic importance and its managements // *J. Biol., Agriculture and Healthcare.* 2015. V. 5. № 9. P. 110–126.
 5. *Sokolova E., Pankin A., Beketova M. et al.* SCAR markers of the R-genes and germplasm of wild *Solanum* species for breeding late blight-resistant potato cultivars // *Plant Genet. Resources.* 2011. V. 9. № 2. P. 309–312.
<https://doi.org/10.1017/S1479262111000347>
 6. *Valkonen J.P.T., Gebhardt C., Zimnoch-Guzowska E., Watanabe K.* Resistance to Potato virus Y in potato // *Potato Virus Y: Biodiversity, Pathogenicity, Epidemiology and Management.* Springer, 2017. P. 207–241.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-58860-5_8
 7. *Moury B., Caromel B., Johansen E. et al.* The helper component proteinase cistron of potato virus Y induces hypersensitivity and resistance in potato genotypes carrying dominant resistance genes on chromosome IV // *MPMI.* 2011. V. 24. № 7. P. 787–797.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-10-10-0246>
 8. *Fulladolsa A., Navarro F., Kota R. et al.* Application of marker assisted selection for Potato virus Y resistance in the University of Wisconsin Potato Breeding Program // *Am. J. Potato Res.* 2015. V. 92. P. 444–450.
<https://doi.org/10.1007/s12230-015-9431-2>
 9. *Nie X., Lalany F., Dickison V. et al.* Detection of molecular markers linked to Ry genes in potato germplasm for marker-assisted selection for extreme resistance to PVY in AAFC's potato breeding program // *Can. J. Plant Sci.* 2016. V. 96. P. 737–742.
<https://doi.org/10.1139/cjps-2015-0335>
 10. *Бирюкова В.А., Шмыглы И.В., Абросимова С.Б. и др.* Поиск источников генов устойчивости к патогенам среди образцов селекционно-генетических коллекций ВНИИКХ с использованием молекулярных маркеров // *Защита картофеля.* 2015. № 1. С. 3–7.
 11. *Гавриленко Т.А., Клименко Н.С., Антонова О.Ю. и др.* Молекулярный скрининг сортов и гибридов картофеля северо-западной зоны Российской Федерации // *Вавиловский журн. генетики и селекции.* 2018. Т. 22. № 1. С. 35–45.
<https://doi.org/10.18699/VJ18.329>
 12. *Розозина Е.В., Терентьева Е.В., Потокина Е.К. и др.* Идентификация родительских форм для селекции картофеля, устойчивого к болезням и вредителям, методом мультиплексного ПЦР-анализа // *С.-х. биология.* 2019. Т. 54. № 1. С. 19–30.
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.1.19rus>
 13. *Clark M., Adams A.* Characteristics of the microplate methods of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses // *J. Gen. Virol.* 1977. V. 34. P. 475–483.
 14. *Doyle J.J., Doyle J.L.* Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus.* 1990. V. 12. № 13. P. 39–40.
 15. *Mori K., Sakamoto Yu., Mukojima N. et al.* Development of a multiplex PCR method for simultaneous detection of diagnostic DNA markers of five disease and pest resistance genes in potato // *Euphytica.* 2011. V. 180. № 3. P. 347–355.
<https://doi.org/10.1007/s10681-011-0381-6>
 16. *Sato M., Nishikawa K., Komura K., Hosaka K.* Potato virus Y resistance gene, *Ry chc*, mapped to the distal end of potato chromosome 9 // *Euphytica.* 2006. V. 149. № 3. P. 367–372.
<https://doi.org/10.1007/s10681-006-9090-y>
 17. *Tomczynska I., Jupe F., Hein I. et al.* Hypersensitive response to Potato virus Y in potato cultivar Sarpo Mira is conferred by the *Ny-Smira* gene located on the long arm of chromosome IX // *Mol. Breeding.* 2014. V. 34. № 2. P. 471–480.
<https://doi.org/10.1007/s11032-014-0050-2>
 18. *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 // *Mol. Breeding.* 2014. V. 34. № 1. P. 267–271.
<https://doi.org/10.1007/s11032-014-0024-4>
 19. *Tommiska T., Hämäläinen J., Watanabe K., Valkonen J.* Mapping of the gene *Nxphu* that controls hypersensitive resistance to potato virus X in *Solanum phureja* IvP35 // *Theor. and Applied Genet.* 1998. V. 96. № 6–7. P. 840–843
 20. *Brommonschenkel S.H., Tanksley S.D.* Map-based cloning of the tomato genomic region that spans the Sw-5 tospovirus resistance gene in tomato // *Mol. Gen. Genet.* 1997. V. 256. P. 121–126.
 21. *van der Voort J.R., van der Vossen E., Bakker E. et al.* Two additive QTLs conferring broad-spectrum resistance in potato to *Globodera pallida* are localized on resistance gene clusters // *Theor. and Applied Genet.* 2000. V. 101. № 7. P. 1122–1130.
<https://doi.org/10.1007/s001220051588>
 22. <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=B37419>
 23. http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_081527.pdf
 24. *de Oliveira A.S., Boiteux L.S., Kormelink R., Resende R.O.* The Sw-5 gene cluster: tomato breeding and research toward orthospovirus disease control // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 1055.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01055>
 25. *Слугина М.А., Кочиева Е.З.* Использование генов углеводного обмена для улучшения качества клубней картофеля (*Solanum tuberosum* L.) обзор // *С.-х. биология.* 2018. Т. 53. № 3. С. 450–463.
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.3.450rus>

Genetic Diversity of *Solanum pinnatisectum* Dun. and *Solanum chacoense* Bitt. by Resistance to Potato Virus Y and Results of DNA Analysis

E. V. Rogozina^{a,*}, P. S. Ulianich^a, V. A. Volkov^a, N. A. Chalaya^a, and E. K. Potokina^{a,b}

^aFederal Research Center Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, Saint-Petersburg, 190121 Russia

^bSt. Petersburg State University, Saint-Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: erogozina@vir.nw.ru

The potato has the greatest diversity of cultivated and wild relatives, whose genetic nature has not been studied enough. The goal of our work was to study *S. chacoense* and *S. pinnatisectum* Dun. as sources of resistance to PVY and search for DNA markers linked to resistance genes. For the first time, representative populations of two diploid tuber-bearing *Solanum* species were evaluated by resistance to PVY and the presence of DNA markers linked to the *Ry*, *Ny* genes localized in the segment of the long arm of chromosome 9. Nine accessions of *S. chacoense* and six accessions of *S. pinnatisectum* presented by 168 and 170 genotypes respectively from the VIR collection were assessed for resistance to artificial infection with PVY. The separation of two wild potato species into phenotypic classes in response to PVY infection have been established. The diversity of visible reactions of *S. chacoense* plants when infected with PVY differs from the uniform type of symptoms observed among *S. pinnatisectum* genotypes. DNA analysis was performed for 170 *S. chacoense* genotypes and 44 *S. pinnatisectum* genotypes using the Ry186, S1d11 and CT220 markers linked to genes determining virus resistance in potato varieties, breeding clones or species of the genus *Solanum* L. Most genotypes of *S. chacoense* and *S. pinnatisectum* have amplified marker CT220, linked at the IvP35 line of the species *S. phureja* Juz. et Buk. with the *Nxphu* gene and the *Sw-5* gene in tomato. The STS marker Ry186, linked to the *Ryhc* gene in Japanese varieties created on the basis of *S. chacoense*, was found in a small number of *S. chacoense* genotypes but no association of the DNA marker with the resistance phenotype was detected. A CAPS marker S1d11/*AcsI* was developed that distinguishes between PVY resistant and susceptible genotypes of both wild potato species. Plants of two wild-growing tuber-bearing species of *Solanum* L. were first examined for the presence of the GBSS gene-specific PCR-marker (the gene of granules-related starch synthase). A significant part of the genotypes (15% in *S. pinnatisectum* and 25% in *S. chacoense*) did not reveal the marker of the gene that controls the biosynthesis of amylose in the forming starch granules. There are no significant differences in the ability to form tubers between genotypes that possess and do not possess a GBSS marker, indicating the possible presence of alternative allelic variant of the *GBSSI* gene in *S. chacoense* and *S. pinnatisectum* species.

Keywords: tuber-bearing wild species *Solanum*, potato viruses, *R*-gene, polymerase chain reaction, polymorphism of DNA markers.