

УДК 635.21:632.631

## ДОНОРЫ УСТОЙЧИВОСТИ К ПАТОТИПУ Ro1 – ЗОЛОТИСТОЙ КАРТОФЕЛЬНОЙ НЕМАТОДЫ, ПРОИЗВОДНЫЕ ОТ *Solanum alandiae* CARD.

Е.В.Рогозина<sup>1</sup>, кандидат сельскохозяйственных наук,  
Л.А.Лиманцева<sup>2</sup>, В.А.Бирюкова<sup>3</sup>, кандидаты биологических наук  
(Представлено членом-корреспондентом Россельхозакадемии О.С.Афанасенко)

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И.Вавилова, 190000, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт растений, 196608, Санкт-Петербург

<sup>3</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства им. А.Г.Лорха, 140051, Московская область

E-mail: rogozinaelena@gmail.com

**Клоны межвидовых гибридов картофеля, устойчивые к золотистой нематоде, созданы на основе ранее неиспользованного в селекции дикорастущего вида *S. alandiae*. Генетическая природа устойчивости исследована с помощью гибридологического анализа и метода ПЦР-маркеров.**

Ключевые слова: картофель, межвидовые гибриды, нематода, гены устойчивости, ПЦР-маркеры

Key words: potato, interspecific hybrids, nematode, resistance genes, PCR-markers

Золотистая картофельная нематода – карантинный объект, в качестве основного средства борьбы с ним применяют возделывание устойчивых сортов. В Государственном реестре сортов картофеля, рекомендованных для выращивания на территории Российской Федерации в 2010 г., менее половины (133 из 283) обладает признаком устойчивости к *Globodera rostochiensis* Woll., патотипа Ro1, причем большинство (69 %) – зарубежной селекции. Одна из причин малого числа нематодоустойчивых сортов картофеля в России – более позднее начало работ в этом направлении, чем в странах Западной Европы. Селекция на этот признак затруднена из-за узкого круга генетических источников устойчивости к возбудителю нематоды, отсутствия у них комплексной устойчивости к грибным, бактериальным и вирусным болезням, а также низких вкусовых качеств и содержания крахмала в клубнях [1].

Устойчивость зарубежных сортов картофеля к патотипу Ro1 унаследована от видов *Solanum andigenum* (источник гена *H1*), *S. vernei* (ген *GroV1*) и *S. spregazzinii* (ген *GroI-4*). Гены *H1* и *GroV1* локализованы на длинном плече хромосомы V [2-4]. Есть сведения о дигенном контроле устойчивости к нематоде вида *S. vernei* [5]. Ген *GroI-4* локализован на коротком плече хромосомы VII и относится к большому семейству генов *GroI* [6]. Сорта, созданные на основе *S. andigenum* и диких видов картофеля, могут иметь и комплекс “малых генов”, которые контролируют степень полевой устойчивости к нематоде (ослабление пораженности и уменьшение числа образующихся цист) и влияют на эффект действия главных генов [7]. При создании российских сортов картофеля в качестве источника устойчивости к нематоде использован вид *S. chacoense* [8].

Для расширения генетической базы селекции мы провели скрининг генофонда картофеля из коллек-

ции ВИР по устойчивости к *G. rostochiensis*, патотипа Ro1. Среди гибридных клонов от различных комбинаций скрещивания, в том числе с участием новых, ранее неиспользованных дикорастущих видов картофеля, выявлены обладающие комплексом положительных признаков. Ценный исходный материал – клоны, отобранные в поколении F<sub>1</sub> (*Atzimba* × *S. alandiae* 21240), у которых устойчивость к нематоде сочетается с относительной устойчивостью к фитофторозу и хорошими агрономическими качествами. Современные методы ДНК-анализа эффективны в исследовании генотипического разнообразия растительного генофонда и ускорения селекционного процесса. Показана пригодность использования маркеров генов *H1* и *GroI* (соответственно TG 689 и *GroI-4*) для отбора сортов и гибридных форм картофеля, устойчивых к золотистой нематоде патотипа Ro1 [9, 10]. Гибридологический анализ и метод ПЦР-маркеров мы использовали для изучения генетической природы созданных в ВИР межвидовых гибридов – доноров устойчивости картофеля к золотистой нематоде.

**Методика.** Объект исследования: родительские формы – сорт *Hertha*, дигаплоид сорта *Atzimba*, клон 90-6-2 гибрида на основе видов *S. andigenum*, *S. stoloniferum*, *S. tuberosum*, образец к-21240 дикорастущего эндемичного вида картофеля Боливии *S. alandiae* Card. и их потомство – клоны межвидовых гибридов картофеля; сеянцы от самоопыления и скрещивания клонов межвидовых гибридов картофеля с районированными неустойчивыми к нематоде сортами Загадка Питера, Петербургский.

Лабораторное испытание на устойчивость к *Globodera rostochiensis*, патотипа Ro1 проведено во ВНИИ защиты растений в соответствии с общепринятой методикой [11]. Клубни (для оценки клонов) или сеянцы высаживали по одному в полиэтиленовые сосуды

объемом 500 см<sup>3</sup>. Инвазионная нагрузка почвы составляла около 3,5 тыс. лич./100 см<sup>3</sup>. Клубневой материал испытывали в 3-кратной повторности; в качестве поражаемого контроля использовали восприимчивый сорт Невский, устойчивого контроля – сорт Латона. Растения вегетировали в течение 2 мес, что достаточно для развития нематод до цист и образования “кома” почвы, на котором учитывали цисты новой генерации. К устойчивой группе относили растения, на корнях которых цисты отсутствовали или было не более 5 пустых (без яиц и личинок).

ПЦР-анализ проводили во ВНИИ картофельного хозяйства на препаратах ДНК из молодых листьев растений. Использовали пары праймеров TG 689 и Gro1; длина ампликонов составляла соответственно 141 и 602 п.н. Протокол выделения, амплификации ДНК и праймеры апробированы на сортах картофеля отечественной и зарубежной селекции [10].

**Результаты и обсуждение.** Сложные межвидовые гибриды картофеля получены путем скрещивания ранее созданного в ВИР клона 90-6-2 межвидового гибрида и голландского сорта Hertha. Материнский компонент скрещивания был источником гена *HI* [12]. Родословная отцовской формы – сорта Hertha (Potato pedigree database, www.plantbreeding.wur.nl/potatopedigree/) включает 8 поколений предковых форм, но источник признака устойчивости к нематоде не указан. Скрещивание двух устойчивых к паразиту родителей обеспечило хорошую наследуемость признака в потомстве (табл. 1). Специфический продукт амплификации размером 141 п.н. получен при ПЦР-анализе материн-

ской формы – источника гена *HI* и четырех из пяти генотипов поколения F<sub>1</sub> (90-6-2 × Hertha) сложных межвидовых гибридов (рис. 1).

Новое поколение межвидовых гибридов создано на основе дигаплоида сорта Atzimba и впервые использованного в селекции дикорастущего эндемичного вида картофеля Боливии *Solanum alandiae*. Материнская форма – дигаплоид Atzimba – восприимчив к золотистой нематоде патотипа Ro1. В качестве отцовского компонента скрещивания использовали смесь пыльцы растений образца к-21240 *S. alandiae*, гетерозиготного по устойчивости к золотистой нематоде патотипа Ro1 (Н.А. Чалая, устное сообщение). В первом гибридном поколении обнаружено расщепление по устойчивости к паразиту (табл. 1). Специфический продукт амплификации размером 141 п.н. наблюдали при ПЦР-анализе четырех из шести устойчивых к нематоде генотипов поколения F<sub>1</sub> (рис. 1).

У всех исследованных генотипов отсутствует специфический фрагмент размером 602 п.н. – маркер гена *Gro1*, и выявлен ряд неспецифических фрагментов (рис. 2). Источник гена *Gro1* – дикорастущий эндемичный вид картофеля Аргентины *S. spegazzinii*, генетического материала которого не было в исследованных гибридах, что и объясняет отсутствие продукта амплификации размером 602 п.н.

В потомстве от самоопыления или скрещивания клонов межвидовых гибридов с восприимчивыми сортами определены различия по наследованию признака устойчивости к золотистой нематоде патотипа Ro1. Расщепление в F<sub>2</sub> указывает на наличие доминантно-

Табл. 1. Результаты фитопатологического и маркерного анализа родительских форм и их потомства – клонов межвидовых гибридов картофеля

Номер образца, название сорта*	Происхождение	Реакция на заражение Ro1	Результаты ПЦР-анализа	
			маркер TG 689 (ген <i>HI</i> )	маркер Gro1-4 (ген <i>Gro1</i> )
90-6-2	<i>S. andigenum</i> , <i>S. stoloniferum</i> , <i>S. tuberosum</i>	Устойчив	+	–
Hertha	<i>S. andigenum</i> , <i>S. demissum</i> , <i>S. tuberosum</i>	»	Нет данных	Нет данных
99-6-1	F <sub>1</sub> (90-6-2 × Hertha)	»	+	–
99-6-2	То же	»	+	–
99-6-5	»	»	+	–
99-6-6	»	»	–	–
99-6-10	»	»	+	–
Atzimba (2n = 24)	<i>S. andigenum</i> , <i>S. tuberosum</i>	Восприимчив	–	–
21240	<i>S. alandiae</i>	Устойчив	Нет данных	Нет данных
24-1	F <sub>1</sub> (Atzimba × <i>S. alandiae</i> 21240)	»	+	–
24-2	То же	»	–	–
117-1	»	Восприимчив	–	–
117-2	»	Устойчив	+	–
117-3	»	Восприимчив	–	–
117-5	»	Устойчив	–	–
39-1-2005	»	»	+	–
39-3-2005	»	»	+	–

\* Полу жирным шрифтом выделены клоны, потомство которых оценено по признаку устойчивости к нематоде (см. табл. 2).



Рис. 1. ПЦР-тест на присутствие гена *H1*;

1 – дигаллоид 13-1 (положительный контроль, несущий ген *H1*), 2 – 99-6-6, 3 – 99-6-5, 4 – 99-6-10, 5 – 90-6-2, 6 – 99-6-1, 7 – 99-6-2, 8 – дигаллоид Atzimba, 9 – 24-1, 10 – 24-2, 11 – 117-2, 12 – 117-3, 13 – отрицательный контроль (без ДНК), 14 – дигаллоид 13-1, 15 – 117-5, 16 – 39-1-2005, 17 – 39-3-2005, 18 – 117-1, M – маркер 1Kb DNA Ladder; фрагмент длиной 141 п.н. – маркер гена *H1*, фрагмент длиной 290 п.н., присутствующий во всех генотипах, – внутренний контроль на качество матрицы ДНК.

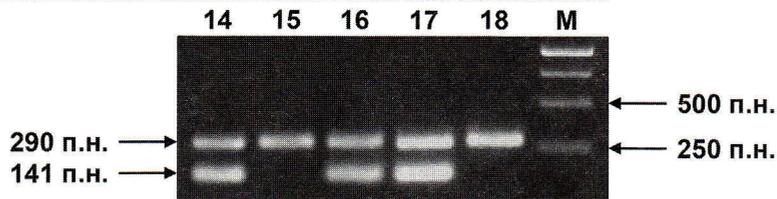
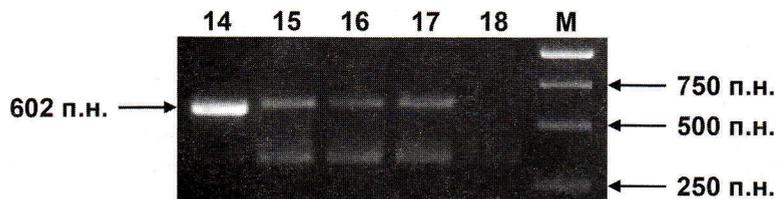
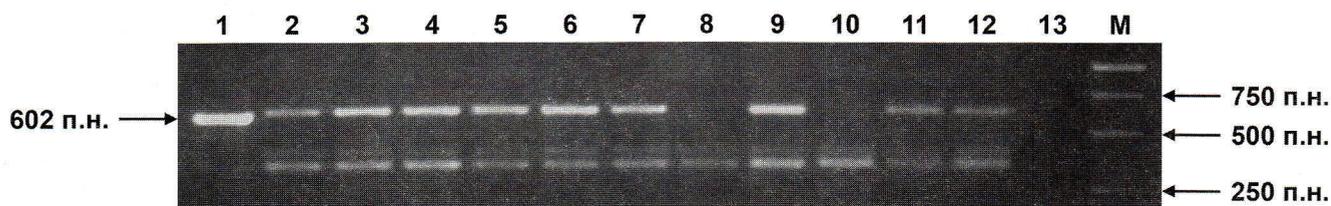


Рис. 2. ПЦР-тест на присутствие гена *Gro1*;

1 – сорт Alwaga (положительный контроль, несущий ген *Gro1*), 2-13 – см. рис. 1, 14 – сорт Alwaga, 15-18, M – см. рис. 1; фрагмент длиной 602 п.н. – маркер гена *Gro1*.



го гена устойчивости к нематоду у клонов 99-6-10, 117-5 и 24-2. При скрещивании клона 24-2 с сортом Петербургский также наблюдается моногенно-доминантное наследование признака. Расщепление в  $F_2$  клона 24-1 свидетельствует о наличии двух комплементарных генов устойчивости (табл. 2). Олигогенный контроль устойчивости к нематоду у клонов 99-6-10, 117-5, 24-2, 24-1 подтверждается распределением их генеративного потомства в каждом изученном поколении на две контрастные группы: сеянцы устойчивые, не имеющие цист на корнях, и сеянцы восприимчивые, имеющие 6 и более (до 30) цист.

В потомстве от самоопыления клона 99-6-6 отмечено расщепление на устойчивые и неустойчивые фенотипы в соотношении 25:38. При скрещивании клона 99-6-6 с восприимчивыми сортами Загадка Питера и Петербургский в потомстве наблюдается расщепление соответственно 22:33 и 25:61. Числовые соотношения в потомстве клона 99-6-6 отличаются от моно или дигибридного расщепления. Характер фенотипического расщепления и появление в потомстве от 33 до 47 % слабоустойчивых (1-5 цист) сеянцев указывают на полигенную природу устойчивости клона 99-6-6 к золотистой нематоду.

Табл. 2. Анализ расщепления по устойчивости к золотистой картофельной нематоду поколений  $F_2$ ,  $F_1$  межвидовых гибридов картофеля

Клон	Поколение	Число растений	Отношение устойчивых к неустойчивым		$\chi^2$	Гены	
			фактическое	теоретическое		число	характер
99-6-10	$F_2$	48	35:13	3:1	0,11	1	Доминантный
24-1	$F_2$	60	36:24	9:7	0,34	2	Комплементарное взаимодействие
24-2	$F_2$	59	36:23	9:7	0,54	2	То же
	$F_1^*$	39	15:24	1:1	2,08	1	Доминантный
	$F_1^*$	72	39:33	1:1	0,50	1	То же
	$F_2$	18	15:3	3:1	0,66	1	»
117-1	$F_2$	90	28:62	1:3	1,79	1	Рецессивный
117-5	$F_2$	58	47:11	3:1	1,12	1	Доминантный

\* ♂ – сорт Петербургский.

В потомстве от самоопыления восприимчивого к нематоду клона 117-1 обнаружены устойчивые к паразиту сеянцы, доля которых в поколении F<sub>2</sub> соответствует доле рецессивных гомозигот (табл. 2). Следовательно, этот клон – гетерозигота с рецессивным геном устойчивости к нематоду.

Результаты ПЦР-теста и гибридологического анализа клонов 99-6-6 и 99-6-10 сходны – соответственно отсутствие и наличие маркера гена *H1*. Анализ ДНК подтверждает, что ген *H1* обеспечивает защитную реакцию клона 99-6-6 к золотистой картофельной нематоду. Устойчивость к паразиту клона 24-1 детерминируют два гена, один из которых может соответствовать гену *H1*. Другие гены, отличные от *H1*, контролируют устойчивость к нематоду у генотипов 24-2, 117-5. Эти клоны, отобранные у гибридов F<sub>1</sub> (Atzimba × *S. alandiae* 21240), унаследовали защитную реакцию дикорастущего вида картофеля, проявление которой, как показывают гибридологический и маркерный анализы, зависит от действия нескольких генов. Стратегия создания нематодоустойчивых сортов основана на комбинировании разных компонентов устойчивости. Оба родителя должны обладать определенным уровнем устойчивости и происходить от разных источников [7]. Созданные в ВИР межвидовые гибриды картофеля F<sub>1</sub> (Atzimba × *S. alandiae* к-21240) полностью соответствуют этим требованиям. Интрогрессия новых доминантных генов, отличных от известных и уже использованных в селекции, позволит расширить генетическое разнообразие устойчивых к нематоду сортов картофеля.

Поступила в редакцию 28.02.11

**Rogozina E.V., Limantseva L.A., Biryukova V.A. Donors of resistance to pathotype Ro1 of golden nematode in potato that are derived from *Solanum alandiae* Card.**

*Clones of interspecific potato hybrids, resistant to golden nematode have been produced on the basis of wild species *S. alandiae*, previously unused in breeding. Genetic nature of resistance has been studied by the use of hybrid logical analysis and method of PCR-markers.*

**Литература.** 1. Симаков Е.А., Склярова Н.П., Яшина И.М. Методические указания по технологии селекционного процесса картофеля. – М., 2006. 2. Pineda O., Bonierbale M.W., Plaisted R.L. Identification of RFLP markers linked to the *H1* gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* // Genome. – 1993. – V. 36. – P. 152-156. 3. Gebhardt C., Mugniery D., Ritter E., Salamini F., Bonnel E. Identification of RFLP markers closely linked to the *H1* gene conferring resistance to *Globodera rostochiensis* in potato // Theoretical and Applied Genetics. – 1993. – V. 85. – P. 541-544. 4. Jacobs J.M.E., Van Eck H.J., Horsman K., Arens P.F.P., Verkerk-Bakker B., Jacobsen E., Pereira A., Stiekema W.J. Mapping of resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* from the wild potato species *Solanum vernei* // Molecular Breeding. – 1996. – V. 2. – P. 51-60. 5. Plaisted R.L., Harrison M.B., Peterson L.C. A genetic model to describe the inheritance of resistance to the golden nematode *Heterodera rostochiensis* Woll. found in *Solanum vernei* // Am. Pot. J. – 1962. – V. 39. – P. 418-435. 6. Paal J., Henselewski H., Muth J., Meksem K., Menendez C.M., Salamini F., Ballvora A., Gebhardt C. Molecular cloning of the potato Gro1-4 gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach // Plant J. – 2004. – V. 38. – P. 285-297. 7. Пощ X. Селекция картофеля. Проблемы и перспективы. – М.: Агропромиздат, 1989. 8. Яшина И.М. Создание и генетическая оценка нового исходного материала картофеля и эффективные пути его использования в селекции / Автореф. докт. дисс. – М., 2000. 9. Gebhardt C., Bellin D., Henselewski H., Lehmann W., Schwarzfischer J., Valkonen J.P.T. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato // Theoretical and Applied Genetics. – 2006. – V. 112. – P. 1458-1464. 10. Biryukova V.A., Zhuravlev A.A., Abrosimova S.B., Kostina L.I., Khromova L.M., Shmyglya I.V., Morozova N.N., Kirsanova S.N. Use of Molecular Markers of Potato Golden Nematode Resistance Genes *H1* and *GRO1* // Russian Agricultural Sciences. – 2008. – V. 34. – № 6. – P. 365-368. 11. Положение о порядке испытания сортов и гибридов картофеля на устойчивость к золотистой картофельной цистообразующей нематоду. – М., 1993. 12. Будин К.З. Генетические основы создания доноров картофеля. – СПб.: ВИР, 1997.