

УДК 635.21:632.4:575.1:581.1

МЕЖВИДОВЫЕ ГИБРИДЫ КАРТОФЕЛЯ КАК ИСТОЧНИК ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОФТОРОЗУ*

Е.В.Рогозина¹, В.А.Колобаев², Э.Е.Хавкин³, доктора биологических наук,
М.А.Кузнецова⁴, М.П.Бекетова^{3,5}, Е.А.Соколова³, кандидаты биологических наук

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

²Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 196608, Санкт-Петербург-Пушкин

³Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 127550, Москва

⁴Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, 143059, Московская область

⁵Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства

им. А.Г.Лорха, 140051, Московская область

E-mail: rogozinaelena@gmail.com

Клоны гибридов картофеля, для создания которых использованы до 7 дикорастущих видов *Solanum*, исследовали с помощью фитопатологических методов и ДНК-маркеров генов устойчивости к фитофторозу: R1, R3a и RB. Установлена тесная связь между числом идентифицированных ДНК-маркеров и устойчивостью гибридных клонов картофеля к фитофторозу.

Ключевые слова: *Phytophthora infestans*, *Solanum*, гены устойчивости к фитофторозу, ДНК-маркеры, межвидовые гибриды картофеля

Key words: *Phytophthora infestans*, *Solanum*, genes for late blight resistance, DNA-markers, interspecies potato hybrids

Важнейший исходный материал при создании устойчивых к фитофторозу сортов картофеля – межвидовые гибриды, наследующие от диких видов *Solanum* устойчивость к оомицету *Phytophthora infestans* Mont. de Vary в сочетании с другими хозяйственно-полезными признаками. Учитывая способность патогена преодолевать защитный эффект расоспецифичных R-генов, отечественные селекционеры при создании фитофтороустойчивых сортов картофеля ориентируются прежде всего на достижение неспецифической полевой (горизонтальной) устойчивости к этой болезни [1, 2]. Еще более категоричны селекционеры в Международном центре исследования картофеля в Перу (CIP – Centre International Potato), полагающие, что только на основе исходного материала, “свободного” от R-генов, возможно создание картофеля с долговременной устойчивостью к фитофторозу [3].

Современные молекулярно-генетические представления о взаимодействии патогенов с растениями-хозяевами отражают сложность генетической системы, обеспечивающей защитную реакцию растения [4]. В связи с этим значительный интерес представляет изучение генетической природы устойчивости к фитофторозу у исходного материала, используемого при создании отечественных сортов картофеля.

Цель настоящей работы – оценить клоны межвидовых гибридов картофеля различного происхождения по устойчивости к фитофторозу и соотнести их устойчивость с присутствием ДНК-маркеров R-генов устойчивости.

Методика. *Растительный материал.* Межвидовые гибриды картофеля (35 клонов) были созданы во ВНИИ защиты растений (ВИЗР) и ВНИИ растениеводства (ВИР) путем скрещивания и/или самоопыления перспективных форм с последующим отбором на устойчивость к фитофторозу и другие агрономи-

чески важные признаки. В гибридизацию вовлекали образцы диких мексиканских видов: *Solanum stoloniferum* Schlecht. (к-2490-5, к-2908), *Solanum polytrichon* Rydb. (к-5345), *Solanum pinnatisectum* Dun. (к-17464), *Solanum vallis-mexici* Juz. (к-8473) и южноамериканских видов: *Solanum berthaultii* Hawkes (к-8510), *Solanum simplicifolium* Bitt. (к-5400), *Solanum vernei* Bitt. et Wittm. ex Engl.; культурный вид *Solanum phureja* Juz. et Buk., диплоидный гибрид культурных видов *Solanum andigenum* Juz. et Buk. и *Solanum rybinii* Juz. et Buk., сорта, несущие генетический материал *Solanum demissum* Lindl. – Atzimba, Fausta, Гатчинский, Licaria, Mariella, Omega, Sunia, Tunika, Тайга, сорта сложного многовидового происхождения – Bobr, Наюда, Загадка Питера, Свитанок Киевский, а также интродуцированные селекционные клоны I-1039, MPI 50-140/5 [5, 6]. Полученные гибриды насчитывают в родословных от 3 до 7 дикорастущих видов *Solanum* по классификации Букасова.

Фитопатологические методы. Устойчивость надземной части растений к фитофторозу оценивали на естественном инфекционном фоне в двух регионах России: Северо-Западном (ВИР, г. Пушкин, Санкт-Петербург) и Центральном (ВНИИ картофельного хозяйства и ВНИИ фитопатологии, Московская область). В лаборатории отделенные листья заражали двумя выделенными в Московской и Ленинградской областях изолятами *P. infestans*, у каждого из которых идентифицировано по 11 генов вирулентности.

На листьях 8 гибридных клонов, сочетающих в родословной генетический материал 5 и более видов *Solanum*, оценена спорулирующая способность патогена *P. infestans*. Для этого отделенные листья растений заражали инокулюмом высокой концентрации (40-60 конидий в поле зрения микроскопа при увеличении ×120) и из образовавшихся инфекционных

* Работа выполнена при финансовой поддержке проекта МНТЦ 3714р и Госконтракта Минобрнауки РФ № 16.M04.12.0007.

пятен в области, прилегающей к неповрежденной ткани, вырезали по 3 диска диаметром 1 см. Диски встряхивали в пробирке с 3 мл воды, в полученных смывах подсчитывали число конидий в 7 полях зрения микроскопа при увеличении $\times 120$ [2].

Маркерный анализ. Выделение тотальной ДНК из листьев картофеля и ПЦР-анализ SCAR маркеров R1-1205 гена *R1*, R3-1380 гена *R3a* и RB-629 гена *RB* проводили ранее описанными методами [7, 8].

Статистическая обработка. Анализ экспериментальных данных выполнен с помощью пакета Statistica 6.0 (Stat Soft, Russia).

Результаты и обсуждение. Клоны межвидовых гибридов картофеля характеризуются высокой, средней или слабой устойчивостью к фитофторозу на естественном инфекционном фоне – соответственно ≥ 7 , 5-7 и 3-5 баллов по 9-балльной шкале (табл. 1). Ответная реакция клонов межвидовых гибридов картофеля на искусственное заражение *P. infestans* также варьировала от умеренной устойчивости (6-7,5 баллов) до восприимчивости (2,5 балла), табл. 2. Растения сортов Latona и Bintje (восприимчивый контроль) в полевом и лабораторном опытах поражились фитофторозом в сильной степени (1-2 балла устойчивости).

Для 8 клонов гибридов, при создании которых использовали образцы, относящиеся к 4 или более дикорастущим видам *Solanum*, установлена слабая спорулирующая способность *P. infestans* (табл. 2). В смывах с листьев обнаружено небольшое число конидий возбудителя фитофтороза: от 1 до 7 шт., тогда как в контроле (сорт Наяда) отмечено в 10 раз больше конидий [6].

Маркеры R1-1205, R3-1380 и RB-629 найдены соответственно у 14, 13 и 12 межвидовых гибридов. Таким образом, каждый из исследованных генов устойчивости *R1*, *R3a* и *RB* обнаружен в гибридных генотипах примерно с одинаковой частотой (0,34-0,40). Найдены генотипы, несущие по 2 маркера: R1-1205 и RB-629 или R3-1380 и RB-629, сочетание всех 3 маркеров обнаружено только у 2 гибридных клонов (табл. 1).

Число обнаруженных маркеров *R*-генов тесно связано с устойчивостью гибридов картофеля к фито-

Табл. 1. Маркеры *R*-генов у гибридов с разной устойчивостью к фитофторозу (естественный фон, среднее по Ленинградской и Московской областям)

| Результаты ДНК-анализа | Устойчивость к фитофторозу, балл | | |
|---|----------------------------------|-----|-----|
| | ≥ 7 | 5-7 | 3-5 |
| Число изученных гибридных генотипов | 17 | 10 | 8 |
| Из них маркеры <i>R</i> -генов найдены у следующего числа растений: | | | |
| R1 | 4 | 4 | 2 |
| R3a | 4 | 1 | 1 |
| RB | 1 | 1 | 1 |
| R1, RB | 2 | 0 | 0 |
| R3a, RB | 4 | 1 | 0 |
| R1, R3a | 0 | 0 | 0 |
| R1, R3a, RB | 2 | 0 | 0 |
| Всего | 17 | 7 | 4 |

фторозу на естественном инфекционном фоне (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,95$, $p < 0,05$). Средняя оценка устойчивости к фитофторозу среди генотипов, лишенных этих маркеров, была самой низкой и значимо увеличивалась у генотипов, несущих по одному из 3 маркеров *R*-генов; эта устойчивость была значительно выше у генотипов, несущих по 2 или 3 маркера *R*-генов (рис.).

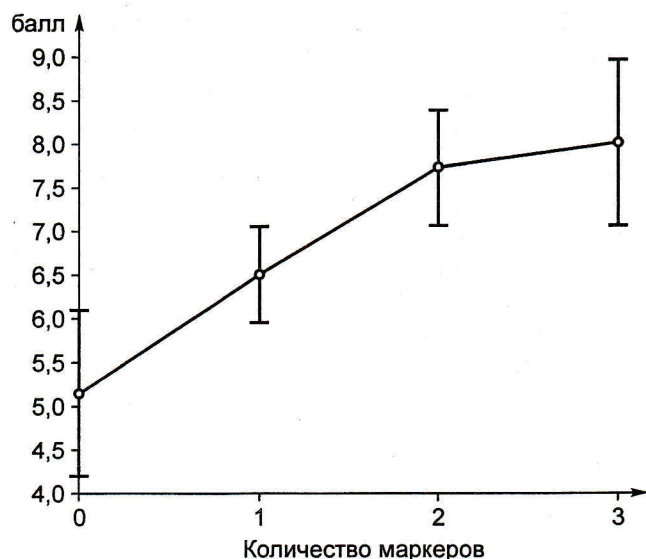
Гены расспецифической устойчивости *R1* и *R3a*, первоначально описанные у гибридного потомства североамериканского дикого вида *S. demissum*, включены во многие сорта картофеля. В селекции на устойчивость к фитофторозу сорта-демиссонды обязательно привлекают в качестве одного из компонентов скрещивания. Ген *RB*, эффективный против широкого круга рас *P. infestans*, найден у *S. bulbocastanum* и *S. stoloniferum* [4]. Мы впервые показали высокую частоту встречаемости маркера этого гена у селекци-

Табл. 2. Фенотипы устойчивости и молекулярно-генетическая характеристика клонов сложных межвидовых гибридов картофеля

| Гибридный клон | Виды <i>Solanum</i> в родословной* | Устойчивость к фитофторозу, балл** | | | Маркеры генов устойчивости | | | Число конидий в смывах, шт. |
|----------------|---|------------------------------------|-----|-----|----------------------------|---------|----------|-----------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | RB-629 | R1-1205 | R3a-1380 | |
| ИЗР 18 | <i>adg, dms, sto, plt, smp</i> | 8 | 8 | 4 | 1 | 1 | 1 | 5 |
| ИЗР 14 | <i>adg, dms, vlm, sto, plt, pnt, ber, smp</i> | 8 | 8 | 5 | 1 | 0 | 1 | 3 |
| ИЗР 13 | <i>adg, dms, vlm, sto, plt, pnt, smp</i> | 8,5 | 9 | 6 | 1 | 0 | 1 | 7 |
| ИЗР 11 | <i>phu, dms, vlm, sto, plt, smp, vrn</i> | 8,5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| ИЗР 17 | <i>adg, phu, dms, sto, plt, ber, smp, vrn</i> | 8 | 8 | 7,5 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| ИЗР 12 | <i>adg, phu, dms, sto, plt, vlm, smp, vrn</i> | 8 | 7,5 | 2,5 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| ИЗР 15 | <i>adg, dms, vlm, sto, plt, pnt, ber, smp</i> | 8 | 7 | 4 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| ИЗР 16 | <i>adg, dms, vlm, sto, plt, smp</i> | 8,5 | 8,5 | 6,5 | 1 | 0 | 1 | 3 |

* *adg* – *S. andigenum*, *ber* – *S. berthaultii*, *dms* – *S. demissum*, *phu* – *S. phureja*, *plt* – *S. polytrichon*, *pnt* – *S. pinnatisectum*, *smp* – *S. simplicifolium*, *sto* – *S. stoloniferum*, *vrn* – *S. vernei*, *vlm* – *S. vallis-mexici*.

** шкала 1-9, где 9 – отсутствие поражения; 1, 2 – полевая оценка соответственно в Северо-Западном и Центральном регионах; 3 – лабораторный тест.



Связь устойчивости (балл) к фитофторозу гибридов картофеля ($n = 35$ генотипов) на естественном инфекционном фоне с числом маркеров R -генов; указан доверительный интервал средних значений устойчивости.

онного материала, близкого по хозяйственно ценным качествам к культурному картофелю [8].

В нашем исследовании ДНК-маркеры отдельных R -генов обнаружены у гибридов с разной устойчивостью к фитофторозу и также у восприимчивых генотипов. Фенотипические различия по отношению к фитофторозу гибридных клонов, у которых идентифицировано по одному из генов $R1$, $R3a$ и RB , очевидно, детерминированы действием других генов, либо их отсутствием. Отсутствие защитного эффекта отдельных R -генов согласуется с общеизвестным явлением преодоления расоспецифической устойчивости. В то же время все изученные нами генотипы, у которых присутствуют маркеры генов разной специфичности ($R1 + RB$ или $R3a + RB$), устойчивы к заболеванию.

В настоящее время пирамидирование генов, различающихся по специфичности к расам *P. infestans*, – один из основных путей создания долговременной устойчивости к болезням [9], включая фитофтороз картофеля [10–12]. Наше исследование показывает, что пирамидирование генов устойчивости происходит также в процессе конвергентной селекции и отбора гибридов картофеля на неспецифическую устойчивость к фитофторозу. Наглядным примером таких форм оказались клоны, в родословной которых присутствует генетический материал филогенетически отдаленных родичей – диких видов картофеля из разных центров происхождения. Устойчивость клонов сложных многовидовых гибридов картофеля к фито-

фторозу подтверждена результатами их испытаний в разных регионах России [13–15].

Таким образом, сложные многовидовые гибридные генотипы, содержащие маркеры нескольких R -генов устойчивости к *P. infestans*, обнаруживают высокую устойчивость к фитофторозу, которая возрастает при сочетании (пирамидировании) в одном гибриде нескольких генов устойчивости разной специфичности из различных видов *Solanum*.

Литература. 1. Яшина И.М., Коновалова Л.Н., Деревязгина М.К. Генетическая природа горизонтальной устойчивости картофеля к фитофторе и методы создания устойчивых сортов. Методические рекомендации. – М.: ВНИИКСХ, 2004. 2. Колобаев В.А. Многовидовые гибриды картофеля, подавляющие размножение фитофторы / Использование мировых генетических ресурсов ВИР в создании сортов картофеля нового поколения (ред. Н.И.Дзюбенко). – СПб.: ВИР, 2009. – С. 50–59. 3. Wulff E.G., Pérez W., Nelson R.J., Bonierbale M., J. A. Landeo, Forbes G.A. Identification of stable resistance to *Phytophthora infestans* in potato genotypes evaluated in field experiments in Peru // Experimental Agriculture. – 2007. – V. 43. – P. 353–363. 4. Vleeshouwers V.G., Raffaele S., Vossen J. et al. Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors // Ann. Rev. Phytopathol. – 2011. – V. 49. – P. 507–531. 5. Будин К.З., Rogozina E.B. Доноры и источники устойчивости к патогенам картофеля. Каталог мировой коллекции ВИР. – СПб., 1998. – Вып. 691. – С. 24. 6. Колобаев В.А., Rogozina E.B. Использование генофонда клубненоносных видов рода *Solanum* для защиты картофеля от фитофтороза // Вестник защиты растений. – СПб.: ВИЗР, 2013. – Вып. 1. 7. 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 Genetic Resources: Characterization and Utilization. – 2011. – V. 9. – P. 309–312. 8. Rogozina E.B., Beketova M.P., Khavkin Э.Е. Генетически различные устойчивые к фитофторозу гибриды картофеля – ценный исходный материал для селекции. К 80-летию мировой коллекции картофеля ВИР // Тр. по прикл. бот., ген. и сел. – СПб.: ВИР, 2007. – 163. – С. 99–109. 9. Афанасенко О.С. Проблемы рационального использования генетических ресурсов устойчивости растений к болезням / Технология создания и использования сортов и гибридов с групповой и комплексной устойчивостью к вредным организмам в защите растений (ред. В.А.Павлюшин и др.). – СПб.: ВИЗР, 2010. – С. 3–10. 10. Tan M., Hutten R., Visser R. et al. The effect of pyramiding *Phytophthora infestans* resistance genes *Rpi-mcd1* and *Rpi-ber* in potato // Theor. Appl. Genet. – 2010. – V. 121. – P. 117–125. 11. Verzaux E. Resistance and susceptibility to late blight in *Solanum*: gene mapping, cloning and stacking. Thesis, Wageningen University, Wageningen. The Netherlands, 2010. 12. Zhu S., Li Y., Vossen J. et al. Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato // Transgenic Res. – 2012. – V. 21. – P. 89–99. 13. Аношкина Л.С. Изучение и использование генофонда в создании сортов картофеля в Кузбассе / Использование мировых генетических ресурсов ВИР в создании сортов картофеля нового поколения (ред. Н.И.Дзюбенко). – СПб.: ВИР, 2009. – С. 125–130. 14. Симаков Е.А., Яшина И.М., Склярва Н.П. и др. Создание нового исходного материала для наиболее важных направлений селекции картофеля / Использование мировых генетических ресурсов ВИР в создании сортов картофеля нового поколения (ред. Н.И.Дзюбенко). – СПб.: ВИР, 2009. – С. 15–22. 15. Евдокимова З.З. Перспективы создания сортов картофеля нового поколения с широким адаптационным потенциалом / Использование мировых генетических ресурсов ВИР в создании сортов картофеля нового поколения (ред. Н.И.Дзюбенко). – СПб.: ВИР, 2009. – С. 186–193.

Поступила в редакцию 30.01.13

Rogozina E.V., Kolobaev V.A., Khavkin E.E., Kuznetsova M.A., Beketova M.P., Sokolova E.A.
Interspecies potato hybrids as a source of late blight resistance genes

Clones of potato hybrids bred from up to Seven wild *Solanum* species were studied with phytopathological methods and DNA-markers of late blight resistance genes $R1$, $R3a$, and RB . Late blight resistance of these clones was significantly related to the numbers of DNA-markers comprised by particular hybrids.