

## СКРИНИНГ ОБРАЗЦОВ АНДИЙСКИХ КУЛЬТУРНЫХ ВИДОВ КАРТОФЕЛЯ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ЦИСТООБРАЗУЮЩИМ НЕМАТОДАМ

Оськина Н.А.<sup>1</sup>, Хютти А.В.<sup>2</sup>, Гавриленко Т.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр «Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР), г. Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (ВИЗР), г. Санкт-Петербург, Россия

**Ключевые слова:** картофель, цистообразующие картофельные нематоды, ДНК-маркеры

**Введение.** Цистообразующие картофельные нематоды наносят большой ущерб картофелеводству, при этом в почве цисты способны сохранять жизнеспособность более 20 лет [Evans et al 1977]. Известны три вида цистообразующих картофельных нематод: *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens (золотистая картофельная нематода, ЗКН), *Globodera pallida* (Stone) Behrens (бледная картофельная нематода, БКН), *Globodera ellingtonae* Handoo, Carta, Skantar, & Chitwood. Первые два вида встречаются в Европе, Азии, Африке, Северной и Южной Америке. Вид *G. ellingtonae* обнаружен в Северной и Южной Америке. В Российской Федерации на сегодняшний день обнаружен только один вид цистообразующих нематод – *G. rostochiensis* и один патотип этого вида – Ro1, являющийся объектом внутреннего карантина. Однако в сопредельных с РФ странах встречаются и другие патотипы ЗКН, а также выявлены очаги БКН. Так, по данным ЕРРО (European and Mediterranean Plant Protection Organization) патотип Ro5 ЗКН выявлен на территории Польши [Przetakiewicz, 2019], а очаги БКН встречаются на территории Норвегии, Финляндии и Эстонии [ЕРРО Global Database - *Globodera pallida*...].

Источники устойчивости к разным видам и разным патотипам цистообразующих картофельных нематод были выявлены среди андийских культурных и диких видов картофеля. Идентифицированы гены/QTLs, контролирующие устойчивость к разным патотипам ЗКН и БКН, и разработаны ассоциированные с ними маркеры [Dalamu et al., 2012].

**Цель работы.** Провести молекулярный скрининг андийских культурных видов картофеля и отобрать образцы с маркерами генов/QTL, контролирующих устойчивость к объектам внешнего карантина – БКН (патотип Pa3) и ЗКН (патотип Ro5); в фитопатологическом анализе оценить диагностическую ценность этих маркеров, а также выделить новые источники нематодоустойчивости.

**Материалы и методы.** Материал исследования включал 50 образцов пяти андийских культурных видов картофеля, полученные из *in vitro* коллекции ВИР: 10 образцов *S. chaucha* Juz. et Buk., 10 – *S. phureja* Juz. et Buk., 10 – *S. goniocalyx* Juz. et Buk., 10 – *S. stenotomum* Juz. et Buk. и 10 образцов *S. andigenum* Juz. et Buk.

Выделение ДНК проводили модифицированным методом СТАВ-экстракции [Gavrilenko et al., 2013]. Молекулярный скрининг всей выборки из 50 образцов проводили с маркером Gpa2-2 гена *Gpa2*, контролирующего устойчивость к *G. pallida*, патотипу Pa 2/3. Выделившиеся в молекулярном скрининге образцы были изучены с дополнительными маркерами генов/QTL, вовлеченных в контроль устойчивости к БКН: *Grp1\_QTL*, *Gpa5\_QTL*, *GpaIV<sup>s</sup><sub>adg</sub>* (Табл. 1). Отметим, что согласно литературным данным, *Grp1\_QTL* контролирует устойчивость и к патотипу Pa2/Pa3 БКН, и к патотипу Ro5 ЗКН [Dalamu et al., 2012]. Условия ПЦР соответствовали разработчикам праймеров.

Таблица 1. Использованные в молекулярном скрининге маркеры, ассоциированные с генами/QTL устойчивости к *G. pallida* (Pa2/3) и к *G. rostochiensis* (Ro5)

Ген/QTL	Источник интрогрессии*	Вид, патотип	Маркер	Ссылка
<i>Gpa2</i>	<i>adg</i>	<i>G. pallida</i> , Pa2/3	Gpa2-1	Asano et al., 2012

			Gpa 2-2	Asano et al., 2012
			77R/HaeIII	Roupe van der Voort et al., 1999
<i>Grp1_QTL</i>	<i>vrn, opl, adg, tub</i>	<i>G. rostochiensis</i> , Ro5; <i>G. pallida</i> , Pa2/3	TG432/RsaI	Finkers-Tomczak et al., 2009
<i>Grp1_QTL</i>	<i>vrn, opl, adg, tub</i>	<i>G. rostochiensis</i> , Ro5; <i>G. pallida</i> , Pa2/3	GP21/DraI	Roupe van der Voort et al., 1998; Meksem et al., 1995
<i>Gpa5_QTL</i>	<i>vrn</i>	<i>G. pallida</i> , Pa2/3		
<i>GpaIV<sup>s</sup><sub>adg</sub></i>	<i>adg</i>	<i>G. pallida</i> , Pa2/3	C 237 I	Asano et al., 2021

\**adg* — *S. andigenum*, *vrn* — *S. vernei*, *opl* — *S. oplocense*, *tbr* — *S. tuberosum* (трехбуквенные сокращения даны в соответствии с Hawkes, 1990).

Фитопатологический анализ. В качестве инфекционного материала для инокуляции образцов картофеля использовали популяции БКН (патотип Pa3) и ЗКН (патотип Ro5), поддерживаемые в ВИЗР. Растения выращивали в изолированных помещениях в пластиковых горшках объемом 500 см<sup>3</sup> наполненных почвой. В каждый горшок вносили суспензию инокуляма БКН и ЗКН в концентрации 3500 яиц и личинок на 100 см<sup>3</sup> почвы. Образцы картофеля высаживали в трех независимых повторностях по 5 растений в каждой. Учет результатов заражения проводили через три месяца, период достаточный для развития цист БКН и ЗКН. Оценку результатов заражения проводили по числу образовавшихся цист на видимых участках корней на коме почвы: отсутствие цист – свидетельствует о высокой устойчивости (HR), при образовании пустых цист (1–5 штук) генотипы оценивают, как среднеустойчивые (MR); наличие цист (от 1 и более), заполненных яйцами и личинками, соответствует восприимчивости (S). Устойчивые и восприимчивые контроли были подобраны по литературным данным [Gavrilenko et. al., 2021].

**Результаты.** В молекулярном скрининге 50 образцов пяти культурных видов, были выявлены два образца *S. andigenum* с диагностическим фрагментом маркера Gpa2-2 гена *Gpa2*, контролирующего устойчивость к БКН (патотип Pa2/3). Выделившиеся образцы протестировали с дополнительными маркерами генов/OTLs, а также включили их в фитопатологический анализ. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты молекулярного скрининга и фитопатологической оценки на устойчивость к ЗКН и БКН образцов *S. andigenum*, отобранных в молекулярном скрининге

№ образца в <i>in vitro</i> коллекции	Gpa 2-2	Gpa2-1	77R/HaeIII	TG432/RsaI	GP21/DraI	C 237 I	Устойчивость к БКН, Pa3	Устойчивость к ЗКН, Ro5
p7-135	+	+	+	0	0	0	S	HR
p7-141	+	+	+	0	0	0	S	HR

У обоих образцов *S. andigenum* с диагностическими фрагментами всех трех маркеров гена *Gpa2* (Gpa2-2, Gpa2-1 и 77R/HaeIII) не выявлены маркеры гена *GpaIV<sup>s</sup><sub>adg</sub>*, а также маркеры *Grp1\_QTL* и *Gpa5\_QTL*. В то же время, в фитопатологическом анализе было установлено, что два образца *S. andigenum*, отобранные в молекулярном скрининге, были восприимчивыми к патотипу Pa3 *G. pallida* и устойчивыми к патотипу Ro5 *G. rostochiensis* (Табл. 2). Полученные результаты указывают на необходимость расширения выборки тестируемых образцов и привлечения дополнительных ДНК-маркеров для отбора генотипов с эффективными комбинациями функциональных аллелей генов, вовлеченных в полигенный контроль признака(-ов) устойчивости к этим объектам внешнего карантина.

**Выводы.** В результате молекулярного скрининга 50 образцов пяти культурных видов картофеля с маркерами генов/OTLs устойчивости к двум объектам внешнего карантина выявлены 2 образца *S. andigenum* с маркерами гена *Gpa2*, контролирующего устойчивость к патотипу Pa 2/3 бледной картофельной нематоды и не обнаружено образцов с маркерами *Grp1\_QTL*, определяющего устойчивость к патотипу Ro5 золотистой картофельной нематоды. В ограниченной выборке образцов *S. andigenum* отмечена низкая диагностическая ценность использованных в молекулярном скрининге маркеров. По результатам фитопатологического анализа выявлены два образца, устойчивые к ЗКН, патотипу Ro5, перспективные для дальнейшей превентивной селекции на устойчивость к этому объекту внешнего карантина.

### Список литературы

1. Asano, K. DNA marker-assisted evaluation of potato genotypes for potential resistance to potato cyst nematode pathotypes not yet invading into Japan / K. Asano, A. Kobayashi, S. Tsuda, M. Nishinaka, S. Tamiya // *Breeding Science*. – 2012. – Vol. 62, N 2. – P. 142-150.
2. Asano, K. Improvement of diagnostic markers for resistance to *Globodera pallida* and application for selection of resistant germplasm in potato breeding / K. Asano, E. Shimosaka, Y. Yamashita et al. // *Breed. Sci.* – 2021. – № 71. – P. 354–364.
3. Dalamu, V.B. Potato cyst nematode (PCN) resistance: Genes, genotypes and markers –An update / V.B. Dalamu, R. Umamaheshwari, R. Sharma et al. // *SABRAO J. Breed. Genet.* – 2012. – № 44. – P. 202–228.
4. EPPO Global Database - *Globodera pallida* [электронный ресурс]: база данных. – <https://gd.eppo.int/taxon/HETDPA>
5. Evans, K. A Review of the Distribution and Biology of the Potato Cyst-Nematodes *Globodera rostochiensis* and *G.pallida*. / K. Evans, A.R. Stone// *Pans* – 1977. – №23- P. 178–189.
6. Finkers-Tomczak, A. A high-resolution map of the *Grp1* locus on chromosome V of potato harbouring broad-spectrum resistance to the cyst nematode species *Globodera pallida* and *Globodera rostochiensis* / A. Finkers-Tomczak, S. Danan, T. van Dijk et al. // *Theor. Appl. Genet.* – 2009. – № 119. – P. 165–173.
7. Gavrilenko, T. Genetic diversity and origin of cultivated potatoes based on plastid microsatellite polymorphism / T. Gavrilenko, O. Antonova, A. Shuvalova et al.// *Genet. Resour. Crop Evol.* – 2013. – Vol. 60, N 7. – P. 1997-2015.
8. Hawkes, J.G. The potato: evolution, biodiversity and genetic resources / J.G. Hawkes. – Washington, D.C. : Smithsonian Institution Press, 1990. – 259 p.
9. Meksem, K. A high-resolution map of the vicinity of the R1 locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers / K. Meksem, D. Leister, J. Peleman et al. // *Mol. Gen. Genet.* – 1995. – № 249. – P. 74–81.
10. Przetakiewicz, A. Distribution of PCN pathotypes in Poland / A. Przetakiewicz // *Plant Breed. Seed Sci.* – 2019. – № 79. –P. 3–8.
11. Rouppe van der Voort, J. A QTL for broad-spectrum resistance to cyst nematode species (*Globodera* spp.) maps to a resistance gene cluster in potato / J. Rouppe van der Voort, W. Lindeman, R. Folkertsma et al. // *Theor. Appl. Genet.* – 1998. – № 96. – P. 654–661.
12. Rouppe van der Voort, J. Tight Physical Linkage of the Nematode Resistance Gene *Gpa2* and the Virus Resistance Gene *Rx* on a Single Segment Introgressed from the Wild Species *Solanum tuberosum* subsp. *Andigena* CPC 1673 into Cultivated Potato / J. Rouppe van der Voort, K. Kanyuka, E. van der Vossen, et al. // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 1999. – № 12. – P. 197–206.
13. Gavrilenko, T.A. Phenotypic and DNA Marker-Assisted Characterization of Russian Potato Cultivars for Resistance to Potato Cyst Nematodes / T.A. Gavrilenko, A.V. Khiutti, N.S. Klimenko et al. // *Agronomy*. – 2021. – № 11. – 2400.