



Научная статья/Research Article

УДК 631.52:633.491

DOI: 10.36718/1819-4036-2024-10-3-9

Ирина Олеговна Газданова^{1✉}, Фатима Тамерлановна Гериева²^{1,2}ФНЦ Владикавказский научный центр РАН, Владикавказ, Республика Северная Осетия – Алания, Россия¹gazdanovaira2020@gmail.com²fatima.gerieva.62@mail.ru

УСТОЙЧИВОСТЬ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ К ВИРУСАМ X, Y С ПРИМЕНЕНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

Цель исследования – выявление и изучение сортов картофеля, обладающих устойчивостью к основным вирусам картофеля (PVY; PVX), для дальнейшего использования сортов в программе селекции и семеноводства картофеля. В ходе молекулярного скрининга селекционных генотипов картофеля применяли ДНК-маркеры: для идентификации гена *Ryadg* использовали SCAR маркер RYSC3. Присутствие гена *Rysto* определяли с помощью маркера STS YES3-3. Детекцию гена *Ryhc* проводили с применением STS-маркера RY186 устойчивости к вирусу PVX – STS-маркер PVX гена *Rx1*. Праймеры для ПЦР и условия реакции были выбраны из литературных источников. Для проведения ПЦР-анализа использовалась приборно-аппаратная линия. ПЦР-амплификации проводили в общем объеме 25 мкл, содержащем 10X буфер для Taq ДНК-полимеразы (Синтол), 2,5 мМ смесь dNTP (Хеликон), 2,5 мМ водный раствор хлорида магния (Fermentas), 5–10 пкмоль каждого праймера (Синтол), 0,2 е.а. Taq ДНК-полимеразы (Синтол), 20 нг пробы ДНК и 13–15 мкл автоклавированной бидистиллированной воды. Все продукты ПЦР разделяли электрофорезом на 1,5 % агарозном геле в 1 × TAE-буфере и визуализировали с помощью ультрафиолетового излучения (УФ). В качестве маркеров молекулярного веса используется DNA GeneRuler, Thermo FS. Предварительно селекционный материал был оценен в лабораторно-полевых условиях в соответствии с рекомендациями по селекционному процессу для картофеля. Тотальную ДНК выделяли из листьев полевых растений картофеля, собранных в период вегетации, с использованием СТАВ-метода. Для анализа использовали ДНК, выделенные из листьев полевых растений картофеля, с использованием протокола, основанного на методе СТАВ. В результате проведенных анализов на ген-устойчивость картофеля выделены сорта с R-генами вирусостойчивости картофеля: с геном *Rysto* сцепленного с маркером YES3-3A с ожидаемым размером фрагмента 341 п.н. (отмечено у 4 образцов картофеля Даренка, Фарн, Рокко). Ген *Rx1*, контролирующей устойчивость к вирусу (PVX), выявлен у 2 образцов картофеля.

Ключевые слова: картофель, ДНК, РНК, вирус, устойчивость, ген, сорт, селекция

Для цитирования: Газданова И.О., Гериева Ф.Т. Устойчивость сортов картофеля к вирусам X, Y с применением молекулярных маркеров // Вестник КрасГАУ. 2024. № 10. С. 3–9. DOI: 10.36718/1819-4036-2024-10-3-9.

Irina Olegovna Gazdanova^{1□}, Fatima Tamerlanovna Gerieva²^{1,2}Federal Scientific Center Vladikavkaz Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia-Alania, Russia¹gazdanovaira2020@gmail.com²fatima.gerieva.62@mail.ru**RESISTANCE OF POTATO VARIETIES TO X, Y VIRUSES USING MOLECULAR MARKERS**

The aim of research is to identify and study potato varieties with resistance to the main potato viruses (PVY; PVX) for further use of the varieties in the potato breeding and seed production program. During the molecular screening of potato breeding genotypes, DNA markers were used: the SCAR marker RYSC3 was used to identify the Ryadg gene. The presence of the Rysto gene was determined using the STS marker YES3-3. The Rychc gene was detected using the STS marker RY186 of resistance to the PVX virus – the STS marker PVX of the Rx1 gene. PCR primers and reaction conditions were selected from literature sources. An instrumental line was used to perform PCR analysis. PCR amplifications were performed in a total volume of 25 µl containing 10X Taq DNA polymerase buffer (Synthol), 2.5 mM dNTP mix (Helikon), 2.5 mM aqueous magnesium chloride solution (Fermentas), 5–10 pmol of each primer (Synthol), 0.2 U Taq DNA polymerase (Synthol), 20 ng DNA sample and 13–15 µl autoclaved bidistilled water. All PCR products were separated by electrophoresis on 1.5 % agarose gel in 1× TAE buffer and visualized with ultraviolet (UV). DNA GeneRuler, Thermo FS was used as molecular weight markers. The breeding material was preliminarily assessed in laboratory and field conditions in accordance with the recommendations for the breeding process for potatoes. Total DNA was isolated from the leaves of field potato plants collected during the growing season using the CTAB method. DNA isolated from the leaves of field potato plants was used for analysis using a protocol based on the CTAB method. As a result of the analysis of the potato resistance gene, varieties with R-genes of potato virus resistance were isolated: with the Rysto gene linked to the YES3-3A marker with an expected fragment size of 341 bp (noted in 4 potato samples Darenka, Farn, Rocco). The Rx1 gene, which controls resistance to the virus (PVX), was detected in 2 potato samples.

Keywords: potato, DNA, RNA, virus, resistance, gene, variety, breeding**For citation:** Gazdanova I.O., Gerieva F.T. Resistance of potato varieties to X, Y viruses using molecular markers // Bulliten KrasSAU. 2024;(10): 3–9 (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2024-10-3-9.

Введение. Картофель (*Solanum tuberosum*) является одной из наиболее важных сельскохозяйственных культур в мире, ежегодно производящей свыше 350 миллионов тонн. Его успех объясняется прежде всего его способностью адаптироваться к различным климатическим условиям, обеспечивающей высокий уровень урожайности и питательную ценность [1, 2]. Однако из-за широкого распространения выращивания картофеля риск заболевания растений является значительным и имеет серьезные последствия.

Многие вредители и патогены наносят большой экономический ущерб при выращивании картофеля. Согласно исследованиям, потенциальные потери от насекомых-вредителей, патогенов и вирусов составляют 44,9 %. Считается, что вирусы поражают урожай картофеля больше, чем любые другие патогены во всем мире. Су-

ществуют приблизительно 30 различных видов вирусов, которые могут поражать культурные растения. Значительные потери производства картофеля во всем мире вызывают вирус Y картофеля (PVY; род *Potyvirus*), вирус скручивания листьев картофеля (PLRV; род *Polerovirus*) и вирус картофеля X (PVX; род *Potexvirus*) [3–5].

Имеющиеся данные свидетельствуют, что вирус PVY может вызвать потери урожая картофеля в размере от 10 до 80 %, в зависимости от штамма вируса и наличия сопутствующих инфекций с другими вирусами. Сертификация семян позволяет сократить уровень инфекции в полевых условиях и обнаружить вирусы, поражающие картофель. Однако, несмотря на все усилия, PVY все чаще встречается на полях, и несколько его штаммов уже были выявлены. Особое значение имеет тот штамм PVY, кото-

рый представляет симптомы, такие как некроз листьев и стеблей и опадение листьев [4].

Вирус X (PVX) картофеля вызывает легкую мозаичную болезнь картофеля и других растений, преимущественно пасленовых. PVX – один из наиболее широко распространенных вирусов. PVX обычно передается через пыльцу или клубни, легко передается механическим путем в результате деятельности человека или от растения к растению при контакте между здоровой и зараженной листвой или корнями. Известно, что (PVX) вызывает тяжелое заболевание, когда он возникает при смешанных инфекциях с другими вирусами, особенно с потивирусами, такими как картофельный вирус Y (PVY) и картофельный вирус S (PVS) [5, 6].

С учетом требований промышленности к скорости, надежности и экономичности анализа традиционные методы не всегда эффективны. В связи с этим появилась потребность в использовании альтернативных методов диагностики. Один из таких методов – анализ ПЦР, который широко используется в различных областях, включая выявление патогенов растений. ПЦР – анализ на ген-устойчивость к фитопатогенам, является более чувствительным, чем традиционные методы. Тесты на обнаружение, основанные на ПЦР, обладают достаточно высокой скоростью и позволяют получить результаты за несколько часов [7].

Применение метода MOC (Marker Assisted Selection) с использованием ДНК-маркеров позволяет облегчить селекцию сельскохозяйственных растений с комплексной устойчивостью к болезням и вредителям. Этот метод широко используется для ускорения отбора устойчивых сортов с хорошими агрономическими характеристиками. В картофеле было выявлено наличие генетического комплекта, определяющего разные формы устойчивости к Y-вирусу. Присутствие RY-генов обеспечивает устойчивость картофеля, что говорит о том, что вирус не способен размножаться в растении, независимо от его вида. Эти идентифицированные гены, связанные с устойчивостью картофеля к вирусам, могут быть использованы в селекции для создания сортов картофеля, устойчивых к вирусу или комплексу вирусов. Тем не менее ученые должны приложить дополнительные усилия ли-

бо для применения генов устойчивости, либо для открытия новых генов устойчивости у картофеля [8, 9]. Поэтому создание устойчивых к вирусам сортов картофеля с применением ДНК-маркеров становится все более актуальной задачей [10, 11].

Цель исследования – выявление и изучение сортов картофеля, обладающих устойчивостью к основным вирусам картофеля (PVY; PVX), для дальнейшего использования сортов в программе селекции и семеноводства картофеля.

Задача: использование специальных ДНК-маркеров для определения генов, ответственных за устойчивость к вирусам PVY, PVX, в сортах картофеля. Это позволит провести молекулярное скринирование данных сортов с целью дальнейшего использования в маркер-опосредованной селекции.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили сорта картофеля из коллекционного питомника, выделившиеся по фенотипической оценке. Для анализа использовали ДНК, выделенные из листьев полевых растений картофеля, с использованием протокола, основанного на методе СТАВ. В ходе молекулярного скрининга селекционных генотипов картофеля применяли ДНК-маркеры: для идентификации гена *Ryadg* использовали SCAR маркер RYSC3. Присутствие гена *Rysto* определяли с помощью маркера STS YES3-3. Детекцию гена *Rychc* проводили с применением STS-маркера RY186 устойчивости к вирусу PVX – STS-маркер PVX гена *Rx1*. Праймеры для ПЦР и условия реакции были выбраны из литературных источников и представлены в таблице 1 [12–14].

ПЦР-амплификации проводили в общем объеме 25 мкл, содержащем 10X буфер для Taq ДНК-полимеразы (Синтол), 2,5 мМ смесь dNTP (Хеликон), 2,5 мМ водный раствор хлорида магния (Fermentas), 5–10 пкмоль каждого праймера (Синтол), 0,2 е.а. Taq ДНК-полимеразы (Синтол), 20 нг пробы ДНК и 13–15 мкл автоклавирующей бидистиллированной воды.

Все продукты ПЦР разделяли электрофорезом на 1,5 % агарозном геле в 1 × TAE-буфере и визуализировали с помощью ультрафиолетового излучения (УФ). В качестве маркеров молекулярного веса используется DNA GeneRuler, Thermo FS.

Таблица 1

ДНК-маркеры, используемые для оценки генотипов картофеля

Ген	Маркер	Размер фрагмента, п.н.	Нуклеотидные последовательности праймеров (5' → 3')	Температура отжига праймеров, °С	Литературный источник
ДНК-маркеры устойчивости к вирусу Y					
<i>Ry_{adg}</i>	RYSC3	321	F: ATACACTCATCTAAATTTGATGG R: AGGATATACGGCATCATTTTTCCGA	60	[12]
<i>Ry_{chc}</i>	Ry186	587	F – TGGTAGGGATATTTTCCTTAGA R – GCAAATCCTAGGTTATCAACTCA	55	[14]
<i>Ry_{sto}</i>	YES3-3A	341	F – TAACTCAAGCGGAATAACCC R – AATTCACCTGTTTACATGCTTCTTGTG	55	[13]
ДНК-маркер устойчивости к вирусу X					
<i>Rx1</i>	PVX	1230	F: ATCTTGTTTTGAATACATGG R: CACAATATTGGAAGGATTCA	58	[14]

Результаты и их обсуждение. Неотъемлемой необходимостью при выведении новых сортов является комплексная устойчивость к PVY-вирусу [15]. В данном исследовании рассмотрены три широко используемых маркера устойчивости: к вирусу (PVY) – YES3-3A / ген *Rysto*, RYSC / ген *Ryadg*, Ry186 / ген *Rychc*. Из 30 анализируемых образцов картофеля было обнаружено наличие гена *Rysto*, который связан с мар-

кером YES3-3A. Ожидаемый размер фрагмента составляет 341 нуклеотид. Интересно отметить, что этот ген был обнаружен в 4 образцах картофеля – Даренка, Метеор, Фарн, Рокко. SCAR маркер RYSC3 гена *Ryadg* обнаружен у сортов Даренка и Садон. Ген устойчивости *Rychc* к Y-вирусу картофеля, сцепленный с маркером Ry186, не был обнаружен в изучаемой выборке (табл. 2).

Таблица 2

Результаты исследования образцов выделившихся сортов картофеля с помощью ДНК-маркеров

№ п/п	Сорт	Наличие ДНК-маркеров/ген				№ п/п	Сорт	Наличие ДНК-маркеров/ген			
		YES3-3A/ген <i>Rysto</i>	RYSC3/ ген <i>Ryadg</i>	Ry186/ <i>Rychc</i>	PVX/ ген <i>Rx1</i>			YES3-3A/ген <i>Rysto</i>	RYSC3/ ген <i>Ryadg</i>	Ry186/ <i>Rychc</i>	PVX/ ген <i>Rx1</i>
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Сорокинский	-	-	-	-	16	Innovator	-	-	-	-
2	Фламинго	-	-	-	-	17	Владикавказский	-	-	-	-
3	Даренка	+	+	-	-	18	Синеглазка	-	-	-	-
4	Невский	-	-	-	-	19	Жуковский ранний	-	-	-	-
5	Самба	-	-	-	+	20	Краса	-	-	-	-
6	Ривьера	-	-	-	-	21	Фарн	+	-	-	-
7	Бизон	-	-	-	-	22	Гулливёр	-	-	-	-
8	Взрывной	-	-	-	-	23	Конкурент	-	-	-	-
9	Изюминка	-	-	-	-	24	Ред Леди	-	-	-	-
10	Триумф	-	-	-	-	25	Кармен	-	-	-	-

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
11	Садон	–	+	–	–	26	Рябинушка	–	–	–	–
12	Метеор	+	–	–	+	27	Рокко	+	–	–	–
13	Краса Мещеры	–	–	–	–	28	Алена	–	–	–	–
14	Удача	–	–	–	–	29	Romano	–	–	–	–
15	Вымпел	–	–	–	+	30	Крепыш	–	–	–	–

Примечание: «+» – маркер присутствует, «–» – маркер не выявлен.

Одной из значимых проблем в сельском хозяйстве является наличие вируса картофеля X (PVX), обуславливающего возникновение слабой мозаики. Устойчивость к данному вирусу обладает доминантным геном *Rx1*, который нашел свое происхождение в редкой сортности, известной как *Solanum Andigenum Juz. Et Buk.*, официальное название – *CPC 1673-20*. Место нахождения гена *Rx1* было определено на 12-й хромосоме. Базируясь на данных о последовательности нуклеотидов гена *Rx*, был разработан STS-маркер PVX (1230 п.н.), который находится в сцеплении с геном *Rx1*. Ген *Rx1* идентифицирован после амплификации у сортов картофеля Самба и Вымпел.

Заключение. Картофель занимает третье место в мировом продовольственном производстве, что подчеркивает его важность для обеспечения пищевой безопасности и поддержания экономического благополучия. Этот корнеплод имеет высокие пищевые свойства и является неотъемлемой частью рациона здорового питания. С помощью ПЦР-анализа на ген-устойчивость селекционер может сократить срок выведения новых сортов картофеля с комплексом ценных генов. Из коллекционного питомника были отобраны особые генотипы картофеля, обладающие уникальным комплексом генов устойчивости к патогенам для дальнейшей селекции выведения новых вирусостойчивых сортов картофеля.

Список источников

1. Актуальные направления развития селекции и семеноводства картофеля в России / Е.А. Симаков [и др.] // Картофель и овощи. 2020. № 12. С. 22–26.
2. Устойчивость картофеля к карантинным болезням / А.В. Хютти [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21(1). С. 51–61. DOI: 10.18699/VJ17.223.
3. Устойчивость картофеля к вирусам: современное состояние и перспективы / С.С. Макарова [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21(1). С. 62–73. DOI: 10.18699/VJ17.224.
4. Ермишин А.П. Особенности использования ДНК-маркеров в селекции картофеля // Картофелеводство: сб. науч. тр. 2013. Т. 21. С. 169–183.
5. Молекулярный скрининг сортов и гибридов картофеля северо-западной зоны Российской Федерации / Т.А. Гавриленко [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. Т. 22 (1). С. 35–45. DOI: 10.18699/VJ18.329.
6. Rogozina E. Идентификация родительских форм для селекции картофеля, устойчивого к болезням и вредителям методом мультиплексного ПЦР-анализа // Сельскохозяйственная биология. 2019. Т. 54 (1). С. 19–30.
7. Межвидовые гибриды картофеля, устойчивые к возбудителям болезней / Е. Rogozina [и др.] // Каталог мировой коллекции ВИР. СПб., 2018. Вып. 866. С. 26–31.
8. Хлесткина Е.К., Шумный В.К., Колчанов Н.А. Маркер ориентированная селекция и примеры ее использования в мировом картофелеводстве // Достижения науки и техники АПК. 2016. Т. 30 (10). С. 5–8.
9. Álvarez D., Gutiérrez P., Marín M. Secuenciación del genoma del Potato yellow vein virus (PVYV) y desarrollo de una prueba molecular para su detección // Bioagro. 2017. Vol. 29 (1). P. 3–14.
10. Исследование коллекционных образцов картофеля на наличие генетических маркеров устойчивости к фитопатогенам / А.Б. Сайнакова [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. Т. 22 (1). С. 18–24. DOI: 10.18699/VJ18.326.
11. Молекулярный скрининг сортов картофеля Фаленской селекционной станции на устойчивость к фитопатогенам / А.В. Бакулина [и др.] // Аграрная наука Евро-Северо-

- Востока. 2021. Т. 22 (3). С. 340–350. DOI: 10.30766/2072-9081.2021.22.3.340-350.
12. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene Ryadg based on a common feature of plant disease resistance genes / *K. Kasai [et al.] // Genome. 2000;43:1–8.*
 13. Mapping of extreme resistance to PVY (Rysto) on chromosome XII using anther-culture-derived primary dihaploid potato lines / *Y.S. Song [et al.] // Theor. Appl. Genet. 2005;111:879-887.*
 14. Development of a multiplex PCR method for simultaneous detection of diagnostic DNA markers of five disease and pest resistance genes in potato/ *K. Mori [et al.] // Euphytica. 2011;180:347-355.*
 15. Characterization of resistance to *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1 in cultivated and wild potato species accessions from the Vavilov Institute of Plant Industry / *L. Limantseva [et al.] // Plant Breeding. 2014;133(5):660–665. DOI: 10.1111/pbr.12195.*
 7. *vreditelyam metodom mul'tipleksnogo PCR-analiza // Sel'skohozyajstvennaya biologiya. 2019. Т. 54 (1). S. 19–30.*
 8. *Mezhvidovye gibridy kartofelya, ustojchivye k vozбудitel'nyh boleznem / E. Rogozina [i dr.] // Katalog mirovoj kollekcii VIR. SPb., 2018. Vyp. 866. С. 26–31.*
 9. *Hlestkina E.K., Shumnyj V.K., Kolchanov N.A. Marker orientirovannaya selekciya i primery ee ispol'zovaniya v mirovom kartofelevodstve // Dostizheniya nauki i tehniki APK. 2016. Т. 30 (10). S. 5–8.*
 10. *Álvarez D., Gutiérrez P., Marín M. Secuenciación del genoma del Potato yellow vein virus (PVV) y desarrollo de una prueba molecular para su detección // Bioagro. 2017. Vol. 29 (1). P. 3–14.*
 11. *Issledovanie kollekcionnyh obrazcov kartofelya na nalichie geneticheskikh markerov ustojchivosti k fitopatogenam / A.B. Sajnakova [i dr.] // Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii. 2018. Т. 22 (1). S. 18–24. DOI: 10.18699/VJ18.326.*
 12. *Molekulyarnyj skringing sortov kartofelya Falenskoj selekcionnoj stancii na ustojchivost' k fitopatogenam / A.V. Bakulina [i dr.] // Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka. 2021. Т. 22 (3). S. 340–350. DOI: 10.30766/2072-9081.2021.22.3.340-350.*
 13. *Development of SCAR markers to the PVY resistance gene Ryadg based on a common feature of plant disease resistance genes / K. Kasai [et al.] // Genome. 2000;43:1-8.*
 14. *Mapping of extreme resistance to PVY (Rysto) on chromosome XII using anther-culture-derived primary dihaploid potato lines / Y.S. Song [et al.] // Theor. Appl. Genet. 2005;111:879-887.*
 15. *Development of a multiplex PCR method for simultaneous detection of diagnostic DNA markers of five disease and pest resistance genes in potato/ K. Mori [et al.] // Euphytica. 2011;180:347-355.*
 15. *Characterization of resistance to Globodera rostochiensis pathotype Ro1 in cultivated and wild potato species accessions from the Vavilov Institute of Plant Industry / L. Limantseva [et al.] // Plant Breeding. 2014;133(5):660-665. DOI: 10.1111/pbr.12195.*

References

1. Aktual'nye napravleniya razvitiya selekcii i semenovodstva kartofelya v Rossii / *E.A. Simakov [i dr.] // Kartofel' i ovoschi. 2020. № 12. S. 22–26.*
2. Ustojchivost' kartofelya k karantinnyh boleznem / *A.V. Hyutti [i dr.] // Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii. 2017. Т. 21(1). S. 51–61. DOI: 10.18699/VJ17.223.*
3. Ustojchivost' kartofelya k virusam: sovremennoe sostoyanie i perspektivy / *S.S. Makarova [i dr.] // Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii. 2017. Т. 21(1). S. 62–73. DOI: 10.18699/VJ17.224.*
4. *Ermishin A.P. Osobennosti ispol'zovaniya DNK-markerov v selekcii kartofelya // Kartofelevodstvo: sb. nauch. tr. 2013. Т. 21. S. 169–183.*
5. *Molekulyarnyj skringing sortov i gibridov kartofelya severo-zapadnoj zony Rossijskoj Federacii / T.A. Gavrilenko [i dr.] // Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii. 2018. Т. 22 (1). S. 35-45. DOI: 10.18699/ VJ18.329.*
6. *Rogozina E. Identifikaciya roditel'skih form dlya selekcii kartofelya, ustojchivogo k boleznem i*

Статья принята к публикации 04.03.2024 / The article accepted for publication 04.03.2024.

Информация об авторах:

Ирина Олеговна Газданова¹, старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований сельскохозяйственных растений, кандидат сельскохозяйственных наук

Фатима Тамерлановна Гериева², ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований сельскохозяйственных растений, кандидат сельскохозяйственных наук

Irina Olegovna Gazdanova¹, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Genetic Research of Agricultural Plants, Candidate of Agricultural Sciences

Fatima Tamerlanovna Gerieva², Leading Researcher, Laboratory of Molecular Genetic Research of Agricultural Plants, Candidate of Agricultural Sciences

