

**Министерство сельского хозяйства Российской Федерации  
Российская академия сельскохозяйственных наук  
Всероссийский научно-исследовательский институт селекции  
и семеноводства овощных культур**

# **Современные тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур**

## **Традиции и перспективы**



**I Международная научно-практическая конференция  
(4-6 августа 2008 года)**

**ТОМ 2**



**Москва  
2008**

**Министерство сельского хозяйства Российской Федерации**

**Российская академия сельскохозяйственных наук**

**Всероссийский научно-исследовательский институт селекции  
и семеноводства овощных культур**

**Современные тенденции в селекции  
и семеноводстве овощных культур**

**Традиции и перспективы**

**I Международная научно-практическая конференция  
(4-6 августа 2008 года)**

**МАТЕРИАЛЫ ДОКЛАДОВ, СООБЩЕНИЙ  
ТОМ 2**

**Под редакцией академика РАСХН, доктора с.-х. наук  
В.Ф. Пивоварова**



Москва  
2008

**СОЗДАНИЕ ЭКСПРЕССИРУЕМЫХ МАРКЕРОВ  
УСТОЙЧИВОСТИ КАРТОФЕЛЯ  
*SOLANUM TUBEROSUM* L. К ВИРУСАМ  
КАРТОФЕЛЯ X– (ХВК) И L– (ВСЛК)**

**Власова А.Б.<sup>1</sup>, Харитончик С.А.<sup>2</sup>, Палилова А.Н.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Республика Беларусь, Минск, тел. +375 172 841474, e-mail: nastasia\_vlasova@nm.ru*

<sup>2</sup> *Институт Молекулярной биологии, Орхуз, Дания*

<sup>3</sup> *Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Республика Беларусь, Минск*

**Резюме**

Изучен полиморфизм между родственными клонами *Solanum tuberosum*, различающимися по устойчивости к X– и L– вирусам картофеля, на уровне кДНК. Обнаруженные полиморфные фрагменты секвенированы. Предполагается участие данных участков экспрессированного генома в защитных реакциях растения–хозяина на вирусную инфекцию.

**Введение.** Несмотря на огромное внимание ученых к проблеме устойчивости растений к патогенам, вирусы повсеместно продолжают наносить серьезный урон урожаю ценной сельскохозяйственной культуры – картофелю. Наиболее распространенным вирусом картофеля является ХВК, а наиболее вредоносным – ВСЛК (вирус скручивания листьев картофеля, ЛВК). Одним из направлений борьбы с вирусными инфекциями растений, наряду с созданием трансгенных устойчивых к вирусам генотипов, остается направленная селекция устойчивых форм с привлечением источников генов устойчивости. Для успешного выявления ценных, несущих гены устойчивости к патогенам форм, необходимо проведение массового сканирования генома вида растения на эти хозяйственно-ценные гены и их маркирование. Ранее нами было проведено маркирование X– и L– вирусной устойчивости картофеля 4–х сортов белорусской селекции на уровне белков различных фракций [1]. Поиск и идентификация генов – участников реализации состояния устойчивости, как специфической, так и неспецифической – остается важной задачей успешной селекции картофеля на устойчивость к патогенам. Одним из современных на-

правлений в этой области является создание экспрессированных маркерных последовательностей (EST). EST-стратегия исключительно эффективна для обнаружения новых генов и идентификации их функций [2]. Сегодня базы данных «GeneBank» содержат множество EST для различных видов живых организмов, которые представляют собой большую ценность, как для обнаружения и идентификации генов и их функциональных продуктов, так и для многих других целей, включая сравнительную геномику. Также, с помощью обнаруженных EST существует возможность получить полноразмерную копию копии кДНК гена и использовать ее для регуляции биохимических путей устойчивости растения к патогену.

**Материалы и методы.** На модели изогенных клонов картофеля, созданной в лаборатории фитоиммунитета ИГиЦ НАН Б методом многоступенчатого отбора, отличающихся по устойчивости к двум вирусам картофеля X- и L-, нами был изучен полиморфизм клонов четырех типов устойчивости (X-L-; X+L-; X+L+; X-L+) на уровне кДНК. В настоящем исследовании использовали клоны с генотипами сортов белорусской селекции Лошицкий и Явар. Для этого из зеленых листьев растений картофеля выделяли тотальную РНК, проводили реакцию обратной транскрипции (RT) с праймером Oligo(dT)<sub>23</sub> (Promega, USA), и далее кДНК амплифицировали при помощи ПЦР с произвольным праймером OPV-08 (5'-GGACGGCGTT-3'). После электрофореза в 1% агарозном геле полиморфные фрагменты вырезали из геля и очищали с помощью набора GFX Gel Band Purification (GE Healthcare). Очищенные фрагменты встраивали в плазмиду pTZ18 или pBluescript и осуществляли секвенирование. Далее проводили сравнение (alignment) – поиск аналогий полученных последовательностей в базе данных BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**Результаты и обсуждение.** Ранее были проведены исследования на геномной ДНК данных клонов картофеля с произвольными праймерами OPV-08 и OPK-08. Был констатирован довольно высокий процент полиморфизма между исследуемыми клонами картофеля [2], и таким образом на основании ДНК-маркеров были дифференцированы 4 типа клонов картофеля, которые обладают различной устойчивостью к вирусам X- и L-. RT-ПЦР с произвольным праймером OPV-08 выявила, что устойчивый к двум вирусам клон сорта Лошицкий характеризовался присутствием 5-ти полиморфных фрагментов в областях: ~1400, 600, 470, 639 и 530 bp, которые отсутствовали у восприимчивых клонов. Интересным являлся тот факт, что фрагменты в областях ~1400, 639 и 530 bp присутствовали также и у устойчивого только к ХВК клона. Все секвенированные последовательности вывели высокий процент гомологии с некоторыми фрагментами кДНК различных клонов картофеля в GeneBank. Анализ данных сиквенса показал, что

фрагмент размером 530 bp является производным фрагмента 639 bp, т.к. содержит еще одну последовательность для праймера OPV-08. Три из 22 выявивших наиболее высокий процент гомологии с секвенированным фрагментом №1 EST приведены в таблице (данные сиквенса не приводятся). Наибольший интерес представляет фрагмент №1, так как он является самым большим (1389 bp) и выявил комплементарность в 19 случаях из 22 с cDNA *Solanum tuberosum*. Интересно, что данный фрагмент обнаружил высокий процент гомологии с EST, задействованными в ответных реакциях на грибной патоген *Phytophthora infestans*, а также на абиотический стресс (см. таблицу).

Тем не менее, ни одна из аннотированных последовательностей, с которыми была обнаружена гомология секвенированных нами фрагментов, на сегодняшний день не имеет описанных функций. Используемая нами уникальная модель изогенных клонов картофеля позволяет сделать интригующее предположение, что данные экспрессированные последовательности с большой долей вероятности могут быть вовлечены в защитные реакции картофеля в ответ на внедрение вирусных патогенов.

1. Данные поиска гомологии для фрагмента №1

Фрагмент	т.п.н.	Accession	Max Сходство, %	Источник/ функция (предполагаемая)
1	1389	CK264619.1	90	EST710697 potato abiotic stress cDNA library <i>Solanum tuberosum</i> cDNA clone POABT74 3' end, mRNA sequence
		CK264618.1	89	EST710696 potato abiotic stress cDNA library <i>Solanum tuberosum</i> cDNA clone POABT74 5' end, mRNA sequence
		BM403955.1	87	EST578282 <i>P. infestans</i> -challenged potato leaf, compatible reaction <i>Solanum tuberosum</i> cDNA clone PPCCR38 5' end, mRNA sequence

Полученные данные предполагается использовать для разработки специфических EST-праймеров, что поможет в дальнейшем идентифицировать участки экспрессированного генома, которые задействованы в реализации состояний устойчивости картофеля к вирусам ХВК и ВСЛК и их функциональных продуктов.

### Литература

1. Павлючук Н. В., Палилова А. Н., Власова А. Б., Шабан О. В., Радкович Е. В. Идентификация белков-маркеров резистентности к

X- и L-вирусам картофеля (*Solanum tuberosum* L.). // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук. № 4, 2007 С. 37-41.

2. Dong Q., Kroiss L., Oakley F.D., Wang B.B., Brendel V. Comparative EST analyses in plant systems // Methods Enzymol. -2005. –Vol. 395, -P. 400-418.

3. Палилова А.Н., Урбанович О.Ю., Долматович Т.В. и др. Дифференциация устойчивых и восприимчивых клонов картофеля к X- и L-вирусам методом полимеразной цепной реакции // Докл. НАН Беларуси. 2002в. Т. 46, № 1. С. 87–89.

**Development of expressed markers of potato  
(*Solanum tuberosum* L.) resistance to potato viruses X (PVX)  
and L (PLRV)**

**Vlasova N.B.<sup>1</sup>, Kharytonchyk S.A.<sup>2</sup>, Palilova A.N.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> – *Central Botanical Garden of NAS of Belarus, Minsk, Belarus,  
tel.: +375 172 841 474, e-mail: nastasia\_vlasova@nm.ru*

<sup>2</sup> – *Institute of Molecular Biology, University of Aarhus, Denmark*

<sup>3</sup> – *Institute of Genetics and Cytology of NAS of Belarus, Minsk, Belarus*

The polymorphism of related clones of *Solanum tuberosum* that differ in resistance to X- and L- potato viruses has been investigated at the cDNA level. The polymorphic fragments were sequenced. The role of these expressed regions of the genome in the plant host defense response to the viral infection is discussed.