

**Национальная академия наук Беларуси  
Центральный ботанический сад**

**Интродукция, сохранение и использование  
биологического разнообразия мировой флоры**

Материалы Международной конференции,  
посвященной 80-летию Центрального ботанического сада  
Национальной академии наук Беларуси  
(19–22 июня 2012 г., Минск, Беларусь)

**В двух частях  
Часть 2**

**Assessment, Conservation and Sustainable Use  
of Plant Biological Diversity**

Proceedings of the International Conference  
dedicated to 80th anniversary of the Central Botanical Garden  
of the National Academy of Sciences of Belarus  
(June 19–22, 2012, Minsk, Belarus)

**In two parts  
Part 2**

Минск  
2012

УДК 582:581.522.4(082)

ББК 28.5я43

И73

**Редакционная коллегия:**

*Д-р биол. наук В.В. Титок (ответственный редактор);  
д-р биол. наук, академик НАН Беларуси В.Н. Решетников;  
д-р биол. наук, ч.-кор. НАН Беларуси Ж.А. Рупасова;  
д-р биол. наук, чл.-кор. НАН Беларуси Е.А. Сидорович;  
канд. биол. наук Ю.Б. Аношенко; канд. биол. наук А.В. Башилов;  
канд. биол. наук А.А. Веевник; канд. биол. наук И.К. Володько;  
канд. биол. наук И.М. Гаранович; канд. биол. наук Л.В. Гончарова;  
канд. биол. наук А.А. Кузовкова; канд. биол. наук Л.В. Кухарева;  
канд. биол. наук Н.М. Лунина; канд. биол. наук Е.В. Спиридович;  
канд. биол. наук В.И. Торчик; канд. биол. наук О.В. Чижик;  
канд. биол. наук А.Г. Шутова; канд. биол. наук А.П. Яковлев.*

Иллюстрации предоставлены авторами публикаций

И 73 **Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры;** Материалы Международной конференции, посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. (19–22 июня 2012, Минск, Беларусь). В 2 ч. Ч. 2 / Нац. акад. Наук Беларуси, Централ. ботан. сад; редкол.: В.В. Титок /и др./, Минск, 2012. – 492 с.

В сборнике представлены материалы Международной конференции «Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры», посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси.

В 1-й части публикуются тезисы докладов секций «Теоретические основы и практические результаты интродукции растений» и «Современные направления ландшафтного дизайна и зеленого строительства»

Во 2-й части представлены тезисы докладов секций «Экологическая физиология и биохимия интродуцированных растений», «Генетические и молекулярно-биологические аспекты изучения и использования биоразнообразия растений» и «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира».

**УДК 582:581.522.4(082)**

**ББК 28.5я43**

## Формирование национальной признаковой коллекции дикорастущих видов картофеля, депонируемых *in vitro*

Яковлева Г.А., Маханько О.В., Дубинич В.Л., Семанюк Т.В., Улитина Н.С., Родькина И.А., Наумович Н.И., Дробот Н.И.

НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству, г. Минск, Беларусь,  
e-mail: y\_galina@tut.by

**Резюме.** В составе коллекции дикорастущих видов картофеля лаборатории биотехнологии РУП «НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству» в культуре *in vitro* поддерживается более 400 представителей 46 видов. На основе результатов работы по выделению генетических источников ценных для селекции данной культуры признаков (устойчивость к фитофторозу, черной ножке, парше обыкновенной, к вирусам Y, L и картофельной нематоде, высокое содержание крахмала) формируется национальная признаковая *in vitro* коллекция дикорастущих видов картофеля.

**Summary.** Over 400 samples of 46 potato species are preserved currently in the *in vitro* wild potato collection of the Laboratory of Biotechnology (RUE “Research and Practical center of NAS of Belarus for Potato, Fruit and Vegetable Growing”). Potato germplasm has been evaluated for some agronomically important traits, such as high starch content, resistance to late blight, PVY, PLRV, golden potato cyst nematode, bacterial blackleg, common scab. As a result, valuable material for breeding has been selected. Data characterizing germplasm samples have been organized and summarized to develop National character *in vitro* wild potato collection.

**Введение.** У картофеля имеется более 230 видов дикорастущих сородичей, произрастающих в странах Южной, Центральной и Северной Америки [1]. Для него характерно явление внутривидового полиморфизма генотипов [2], и при выращивании из ботанических семян, как правило, происходит расщепление образца картофеля по интересующему признаку. Среди многообразия образцов дикорастущих видов картофеля можно найти генотипы, обладающие практически любым интересующим селекционера признаком: устойчивость к болезням и вредителям картофеля, оптимальные биохимические показатели клубней (содержание крахмала, белка и др.). Однако информация об устойчивости образца вида далеко не всегда совпадает с наблюдаемой в Беларуси и зависит от вредоносности и распространенности патогена или вредителя на территории республики.

В лаборатории биотехнологии РУП «НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству» в культуре *in vitro* поддерживается коллекция дикорастущих видов картофеля, которая включает представителей 46 видов и содержит более 400 различных генотипов. Количество видов, образцов и линий коллекции *in vitro* постоянно изменяется в связи с поступлением новых образцов из различных генобанков и браковкой неустойчивых к болезням линий, в некоторых случаях образцов и крайне редко – вида. Образец – образец вида, полученный из генобанка. В основном образцы дикорастущих видов поступают как ботанические семена и лишь в единичных случаях как растения *in vitro* и клубни. Линия – растение, полученное из одного ботанического семени и его вегетативное потомство. Отобранные линии и образцы вида включаются в состав национальной признаковой коллекции *in vitro*, представляющей интерес для селекции. Депонирование *in vitro* обеспечивает сохранность ценного генотипа не клубненосного и клубненосного дикорастущих видов картофеля независимо от способности последнего завязывать клубни в условиях Беларуси.

Цель работы: формирование национальной признаковой коллекции дикорастущих видов картофеля в культуре *in vitro*.

**Методики.** Методы оценки образцов коллекции на устойчивость к фитофторозу, черной ножке, парше обыкновенной, вирусам картофеля Y и L представлены в работе [3]. Образцы с потенциальной устойчивостью к золотистой картофельной нематоде выявляли методом ПЦР

со SCAR-маркерами Gро 1–4 [4] и TG689 [5] на наличие нуклеотидных последовательностей, связываемых с резистентностью к *Globodera rostochiensis*. Анализы на содержание сухого вещества в клубнях дикорастущих видов картофеля выполнены с использованием термостатно-весового метода [6] в лаборатории биохимии.

**Результаты и обсуждение.** Фитофтороз, вызываемый *Phytophthora infestans*, является одним из заболеваний картофеля, наносящим значительный вред картофелеводству. Эпифитотии фитофтороза с потерями урожая 50% и выше наблюдают в Беларуси через 2–3 года [7]. Начиная с 2000 г. эпифитотия фитофтороза (развитие фитофтороза >50 %) отмечена в 2000, 2001, 2006, 2009 и 2011 годах. Из 238 линий образцов коллекции *in vitro*, оцененных в тесте с кассетами, позволяющем моделировать целое растение, устойчивость к фитофторозу ботвы на уровне 7–9 баллов проявили 71, являющихся представителями 16 видов. Генотипы, обладающие устойчивостью к фитофторозу одновременно ботвы и клубней, выявлены в наших экспериментах у представителей южноамериканских видов *S. oplocense*, *S. vernei* и североамериканских *S. bulbocastanum*, *S. jamesii*, *S. pinnatisectum* из Мексики.

Особый интерес представляет вид *S. bulbocastanum* с расонеспецифической устойчивостью к фитофторозу. Линии и образцы вида *S. bulbocastanum* коллекции *in vitro* различаются по устойчивости к фитофторозу и присутствию в их геноме гена *RB* (*RGA2*, *Rpi-blb1*) – одного из 3-х генов (*Rpi-blb1*, *Rpi-blb2* и *Rpi-blb3*) устойчивости к патогену (табл.).

Образец S.b. вида *S. bulbocastanum* содержит ген устойчивости к фитофторозу *RB* и является донором устойчивости к фитофторозу ботвы и клубней в соматической гибридизации картофеля. Соматические гибриды SB между тетраплоидным селекционным образцом 78563-76 и S.b., созданные в лаб. биотехнологии, содержат ген *RB*, сохраняют устойчивость к фитофторозу при выращивании без защиты фунгицидами в эпифитотийные по развитию болезни годы и передают признак устойчивости половым поколениям [8].

Черная ножка встречается в Беларуси повсеместно и поражает стебли и клубни картофеля [7]. Линии и образцы с устойчивостью к черной ножке стеблей при искусственном заражении букетов тепличных и полевых растений бактериями *Pectobacterium caratovorum* pv. *atroseptica* и *Pect. caratovorum* pv. *caratovora* обнаружены у представителей 20 видов коллекции *in vitro* из подсекций не клубненосов *Estolonifera* Hawkes и клубненосов *Potatoe* G. Don. Устойчивость к черной ножке стеблей и клубней выявлена у представителей южноамериканских видов *S. abacayense*, *S. berthaultii*, *S. oplocense* и мексиканского вида *S. jamesii*.

Парша обыкновенная приобрела особую актуальность в последнее десятилетие, когда ее проявление на клубнях ежегодно носит характер эпифитотии независимо от сорта и условий выращивания картофеля [7]. По результатам исследований на инфекционном фоне *in vitro*, созданном внесением в зону формирования микроклубня смеси 8 видов *Streptomyces*: *S. scabies*, *S. griseus*, *S. globisporus*, *S. violaceus*, *S. candidus*, *S. chromofuscus*, *S. violaceoruber*, *S. melanosporifaciens*, вызывающим паршу обыкновенную на территории Беларуси, 18 образцов 12 южноамериканских диких видов (*Solanum*: *acaule*, *berthaultii*, *chacoense*, *circaeifolium*, *gib-*

Таблица. Характеристика различных линий и образцов вида *S. bulbocastanum* коллекции *in vitro* по наличию гена устойчивости к фитофторозу *RB*, определенного с помощью специфичного SCAR-маркера *RGA2* (*RB*<sub>638'</sub>), и устойчивости к болезни

Линии и образцы <i>S. bulbocastanum</i> с положительным ответом SCAR-маркера <i>RB</i> <sub>638'</sub> ген <i>RB</i> присутствует в геноме			Линии и образцы <i>S. bulbocastanum</i> с отрицательным ответом SCAR-маркера <i>RB</i> <sub>638'</sub> ген <i>RB</i> отсутствует в геноме		
Шифр	Источник поступления, номер по каталогу	Устойчивость к фитофторозу ботвы (балл)* Sx ± x	Шифр	Источник поступления, номер по каталогу	Устойчивость к фитофторозу ботвы (балл)* Sx ± x
Sb	Украина, отсутствует	9,0 ± 0	blb1	ВИР, К 23173	9,0 ± 0
Л45-6	ВИР, К 15150	9,0 ± 0	blb3	ВИР, К 23174	9,0 ± 0
Л45-9		8,0 ± 0	blb5	ВИР, 23166	9,0 ± 0
Л45-11		7,5 ± 0,5	blb6	ВИР, К23181	4,0 ± 0,4
blb2	ВИР, К 23173	9,0 ± 0	blb7		3,3 ± 0,3
			blb8		3,3 ± 0,3

Примечание: \* – устойчивость к фитофторозу ботвы при искусственном заражении растений в тесте «с кассетами» по наименьшему значению балла устойчивости при наличии результатов нескольких лет экспериментов.

*berulosum, hondelmanni, microdontum, phureja, simplicifolium, spagazzinii, stenotomum, vernei*) и 22 образца 10 североамериканских диких видов (*Solanum: bulbocastanum, cardiophyllum, demissum, fendleri, jamesii, pinnatisectum, polyadenium, polytrichon, stoloniferum, verrucosum*), имели устойчивость к парше обыкновенной на уровне 7,0 балла и выше [9]. Дифференциация образцов по уровню устойчивости к парше обыкновенной отмечена для видов *S. circaeifolium* от 5,3 до 8,4 балла и *S. pinnatisectum* от 6,0 до 8,1 балла.

Образцы коллекции *in vitro* с устойчивостью к вирусам картофеля Y, L выделяли по результатам тестов с прививкой черенков анализируемых генотипов на растения-инфекторы соответствующих вирусов с последующим определением накопления вируса в прижившемся привое (через 30–35 суток) методом ИФА. Прививка является одним из наиболее жестких методов инфицирования, который обеспечивает проникновение практически любого вируса картофеля в прижившийся на растении-инфекторе привой тестируемого образца и позволяет определить тип устойчивости к вирусу. Линии и образцы с высокой устойчивостью к вирусу L выделены среди представителей 7 южноамериканских видов, образующих клубни (*Solanum: berthaultii, boegeri, oplocense, raphanifolium, simplicifolium, spagazzinii, vernei*) и для 4 не клубненосных (*Solanum: chaporense, etuberosum, fernandezianum, palustre*). Среди дикорастущих видов картофеля из Северной Америки высокая устойчивость к вирусу скручивания листьев картофеля (ВСЛК, L) обнаружена у образцов 4 видов коллекции *in vitro* (*Solanum: cardiophyllum, jamesii, michoacanum, pinnatisectum*). Проявление внутривидового полиморфизма наблюдали для видов *S. raphanifolium* и *S. vernei* от восприимчивости к ВСЛК (гp: E31-24; vrn: Д54, Л75-19, Л75-35) до высокой устойчивости (гp: E31-19, E31-25, E31-39, E31-21; vrn: Л76-2, Л76-16). Высокая устойчивость к YBK предположительно по типу иммунитет или сверхчувствительность выявлена среди образцов коллекции дикорастущих видов, депонируемых *in vitro*, для 4 южноамериканских видов (*Solanum: boegeri, etuberosum, palustre, vernei*) и 3 североамериканских (*Solanum: bulbocastanum, jamesii, pinnatisectum*).

Создание сортов с высоким содержанием крахмала является одним из приоритетов селекции картофеля в Беларуси. Источники повышенной крахмалистости по содержанию сухого вещества (от 31,6% для образца K2-7 *S. boliviense* до 56,2% – для образца Л76-14 *S. vernei*) в мелких клубнях дикорастущих видов картофеля, завязавшихся на растениях из культуры *in vitro*, высаженных в условия защищенного грунта, выделены для 7 южноамериканских видов (*Solanum: boegeri, boliviense, oplocense, raphanifolium, simplicifolium, spagazzinii, vernei*) и 3 североамериканских (*Solanum: jamesii, michoacanum, pinnatisectum*). Как и в случае с признаками устойчивости к болезням, наблюдали внутривидовой полиморфизм видов по содержанию сухого вещества в клубнях. Например, пределы вариации признака для 6 проанализированных представителей вида *S. vernei* были от 23,2% для линии Л75-21 до 56,2% – для линии Л76-14.

Начаты исследования по выделению в коллекции образцов с потенциальной устойчивостью к золотистой картофельной нематодой *Globodera rostochiensis* по молекулярному маркированию с ДНК-маркерами TG689 и Gro1-4 на наличие в их геноме, соответственно, генов H1 и Gro1-4. Маркеры TG689 и Gro1-4 были отобраны как перспективные по результатам исследований, выполненных на сортах с установленной фенотипической устойчивостью к картофельной нематодой (неопубликованные данные).

С помощью маркера Gro1-4 проанализированы представители диких видов, известных как источники нематодоустойчивости: *S. boliviense* (9 линий образца K1 и 13 линий образца K2), *S. berthaultii* (3 линии образца Л50), *S. vernei* (9 линий образцов Л75, Л76 и Д54), *S. spagazzinii* (3 линии образца Л78) и одна линия межвидового гибрида *S. etuberosum* x *S. brevidens*. Маркер обнаружен у 10 из 38 проанализированных линий: K2-2, K2-3, K2-4, K2-5, K2-6, K2-8 (*S. boliviense*), Л50-7 (*S. berthaultii*), Л76-16 (*S. vernei*) и Л78-70, Л78-40 (*S. spagazzinii*) (рис.).

Маркер TG689 к гену H1 не выявлен ни у одной из семи взятых на анализ линий видов *S. boliviense*, *S. berthaultii*, *S. spagazzinii*.

Золотистая картофельная нематода *Globodera rostochiensis* является карантинным объектом в Республике Беларусь [7]. Накопление этого вредителя в почве приводит к ежегодным потерям 10–80% урожая в зависимости от степени зараженности. Устойчивость современных сортов картофеля к вредителю *Globodera rostochiensis* связывают, главным образом, с наличием в их геноме гена H1, ведущим свое происхождение от *S. tuberosum* ssp. *andigena* [5]. Источником гена Gro1-4 принято считать дикий вид *S. spagazzinii*, который менее распространен в родословных сортах картофеля. У белорусских сортов Gro1-4 представлен мало. Таким образом, выделенные среди диких видов источники этого гена представляют значительную селекционную ценность.

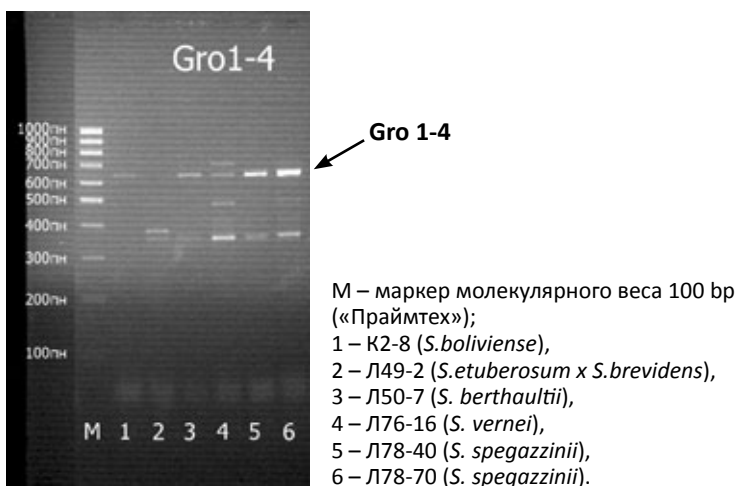


Рисунок. Идентификация гена Gro 1-4 у диких видов картофеля с использованием SCAR-маркера Gro 1-4 (602 п.н.).

**Заключение.** В лаборатории биотехнологии РУП «НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству» проводится работа по выделению генетических источников ценных для селекции культуры признаков: устойчивость к фитофторозу, черной ножке, парше обыкновенной, к вирусам Y, L и золотистой картофельной нематоды среди образцов коллекции дикорастущих видов картофеля, поддерживаемых *in vitro*. Внутривидовой полиморфизм отмечен в проявлении как признака устойчивости к болезням (фитофторозу, парше обыкновенной, вирусам, золотистой картофельной нематодой), так и качества клубня (содержание сухого вещества). Линии и образцы дикорастущих видов, отобранные по перечисленным признакам, включаются в состав национальной признаковой коллекции дикорастущих видов картофеля, депонируемых *in vitro*.

Особый интерес представляют образцы и линии, являющиеся источником нескольких желаемых для селекции картофеля признаков. Линия Л60-6 *S. jamesii* обладает устойчивостью к фитофторозу (ботва, клубни), черной ножке (стебли, клубни), парше обыкновенной, вирусам (L, Y) и отличается высоким уровнем содержания в клубнях сухого вещества (31,4%) и сырого протеина (5,1). Образец S.b. вида *S. bulbocastanum* устойчив к фитофторозу ботвы и клубней, и обладает иммунитетом к Y-вирусу картофеля. Линия 76-2 *S. vernei* отличается устойчивостью к вирусам (L, Y) и высоким содержанием сухого вещества в клубнях (35,4%), линия 76-16 (*S. vernei*) – высокой устойчивостью к вирусу L и наличием маркера *Gro1-4*. Линии Л33-2 *S. michoacanum* и Л61-5 *S. pinnatisectum* проявляют высокую устойчивость к ВСЛК и содержат высокий уровень сухого вещества, соответственно, 39,1–41,3% и 34,7–38,3%.

#### Список литературы:

1. Hawkes, J.G. The potato. Evolution, biodiversity and genetic resources. Smithsonian Institution Press. USA, 1990, p. 259.
2. Будин К.З. Генетические основы создания доноров картофеля. Санкт-Петербург: ВИР, 1997, с. 38.
3. Яковлева Г.А. и др. Признаковая коллекция видов и межвидовых гибридов *Solanum* в культуре *in vitro*. Картофельводство : сб. науч. тр. / РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству», Минск, 2008, Т. 14, с. 232–243.
4. Ермишин А.П. и др. Оценка исходного материала картофеля для селекции на устойчивость к болезням и вредителям с помощью специфических ПЦР-маркеров: методические рекомендации. Минск : ИООО «Право и экономика», 2010, с. 60.
5. Бирюкова В.А. и др. Использование ДНК-маркера гена *H1* устойчивости к золотистой картофельной нематоды (*Globodera rostochiensis* Woll) для селекции картофеля. Картофельводство : сб. науч. тр. РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству», Минск, 2008, Т. 14, с. 28–38.
6. Б.А. Ягодин и др. Практикум по агрохимии. Под ред. Б.А. Ягодина. – М.: Агропромиздат, 1987, с. 512.
7. Иванюк В.Г. и др. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. – Мн.: Белпринт, 2005, с. 696.
8. Яковлева Г.А. и др. Интрогрессия признаков устойчивости к фитофторозу и вирусу Y в культурный картофель от мексиканского вида *Solanum bulbocastanum* посредством соматической гибридизации. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Агрономія і біологія», 2010, випуск 10(20), с. 90–99.
9. Яковлева Г.А. и др. Выделение устойчивых к парше обыкновенной генотипов в коллекции видов и гибридов *Solanum* в культуре *in vitro*. Земляробства и ахова раслин, 2010, № 6 (73), с. 50–52.