НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07 – КМР. 1764 “С” 2020.11.12. 08 ПЗ

КИРИЧЕНКА СВЯТОСЛАВА ОЛЕКСІЙОВИЧА

2021 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСТИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет (ННІ) захисту рослин, біотехнології та екології

УДК 601.4:577.21:635.21

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету (Директор ННІ)

_____
(назва факультету (ННІ))

_____ _____
(підпис) (ПІБ)

"___" _____ 20__ р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри

_____
(назва кафедри)

_____ _____
(підпис) (ПІБ)

"___" _____ 20__ р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «ВИЯВЛЕННЯ ГЕНІВ СТІЙКОСТІ У СОРТІВ КАРТОПЛІ ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ»

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»
Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»
Орієнтація освітньої програми: освітньо-професійна

Гарант освітньої програми

_____ _____ _____
(науковий ступінь та вчене звання) (підпис) (ПІБ)

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

_____ _____ _____
(науковий ступінь та вчене звання) (підпис) (ПІБ)

Виконав _____ _____
(підпис) (ПІБ студента)

Київ – 2021

НУБіП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСТИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет (ННІ) _____

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри_____
_____
_____
(науковий ступінь, вчене звання) (підпис) (ПІБ)
“____” _____20____року

З А В Д А Н Н Я

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

_____
(прізвище, ім’я, по батькові)
Спеціальність _____
(код і назва)
Освітня програма _____
(назва)
Орієнтація ~~освітньої програми~~ _____
освітньо-професійна або освітньо-наукова)
Тема магістерської кваліфікаційної роботи _____
_____
_____
затверджена наказом ректора НУБіП України від “____” _____20___р. №_____
Термін подання завершеної роботи на кафедру _____
(рік, місяць, число)
Вихідні дані ~~до магістерської кваліфікаційної~~ роботи _____
_____
_____
_____
_____
Перелік питань, що підлягають дослідженню:
1. _____
2. _____
3. _____
Перелік графічного матеріалу (за потреби) _____
_____

Дата видачі завдання “_____” _____20___ р.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи _____ _____
(підпис) (прізвище та ініціали)
Завдання прийняв до виконання _____ _____
(підпис) (прізвище та ініціали студента)

Реферат

Тема моєї магістерської роботи – «Виявлення генів стійкості у сортів картоплі за допомогою молекулярних маркерів».

Робота містить 73 сторінки, 3 розділи: 1 розділ містить 15 підрозділів, 2 розділ містить 11 підрозділів, 3 розділ містить 4 підрозділи. Робота також має висновок, список літератури на 60 пунктів. Робота вміщує у собі також 36 ілюстрацій, 14 таблиць.

Основними завданнями даної наукової роботи можна визначити такі:

1. Скринінг частот зустрічання гена стійкості H1 до золотистої нематоди за маркером TG-689;
2. Ідентифікація генів стійкості *Rychc* та *Ryadg* за маркерами Ryo-186 та Rych-3 відповідно, до Потівірусу картоплі Y (PVY)
3. Вілбір таких сортозразків з метою рекомендації їх до селективного добору, для створення ліній стійких сортів.

Об'єктом досліджень є гени стійкості картоплі (*Solanum tuberosum*) до карантинних патогенів та шкідників, зокрема потівірусу картоплі Y та золотистої нематоди *Globodera rostochiensis*

Предметом досліджень є ідентифікація алелів генів стійкості у сортозразках картоплі, та порівняння частоти зустрічання алелів за маркерними локусами у інших дослідженнях.

Головними методами дослідження є використання молекулярних маркерів, що вказуватимуть на наявність генів стійкості у геномі того чи іншого сортозразка. Визначатися вони будуть за допомогою молекулярного методу ПЛР аналізу та фізико-хімічного методу електрофорезу.

В ході роботи були визначено відсотки стійкості у 70 сортозразків картоплі Поліського дослідного відділення ІК НААН врожаю 2020р, по маркерам TG-689 – 95,7%, Ryo-186 – 74,2%, Rych-3 – 10%.

ЗМІСТ

ВСТУП 7

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 9

1.1 Картопля – ботанічна та біологічна характеристика 9

1.1.1 Ботанічна характеристика 10

1.1.2 Біологічні особливості бульб картоплі як насіннєвого матеріалу 12

1.2 Шкодочинність карантинних організмів та хвороб на картоплі 13

1.2.1 Картопляна міль (*Phthorimaea operculella*) 14

1.2.2 Золотиста картопляна нематода (*Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens) 16

1.2.3 Рак картоплі (*Synchytrium endobioticum* Pers.) 18

1.2.4 Потівірус картоплі Y (PVY) 20

1.2.5 Методи захисту картоплі від шкідників і хвороб 22

1.3 Загальні поняття про ДНК-маркери 27

1.3.1 Селекція, її роль у захисті рослин 27

1.3.2 Поняття про ДНК-маркери та їх застосування в селекції 30

1.3.3 Стійкість до вірусу Y картоплі 33

1.3.4 Стійкість до золотистої нематоди 35

1.4 Сорти картоплі української селекції стійкі до карантинних організмів та захворювань 37

1.4.1 Сорти картоплі стійкі проти карантинних організмів та інших захворювань 37

1.4.2 Сорти картоплі, стійкі до карантинних організмів та захворювань виведених Інститутом картоплярства НААН України 39

НУБіП України

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ 43

2.1 Рослинний матеріал 43

2.2 Виділення ДНК картоплі із сортозразків 45

2.2.1 Протокол виділення ДНК (листя) 46

2.2.2 Протокол ПЛР-реакції, що використовувався у дослідженні: 48

2.3 Електрофорез – принцип дії та основні види. 50

2.3.1 Компоненти електрофорезу в агарозному гелі 52

2.3.2 Буфер для електрофорезу 52

2.4 Характеристика молекулярних маркерів, що були використані в роботі 56

2.4.1 Сайти з відомою послідовністю (STS) 56

2.4.2 SCAR маркери 56

2.4.3 Коротка характеристика особливостей Ry генів картоплі 57

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ 60

3.1 Коротка характеристика вихідних умов досліду 60

3.2 Візуалізація ПЛР сортозразків картоплі з маркером TG-689 60

3.3 Візуалізація ПЛР сортозразків картоплі з маркером Ry_o-186 67

3.4 Візуалізація ПЛР сортозразків картоплі з маркером Rych-3 73

3.5 Обговорення результатів роботи та порівняння результатів з іншими дослідами 77

ВИСНОВКИ 81

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ 83

НУБіП України

ВСТУП

Агропромисловий сектор у XXI столітті має багату історію включення у себе високих технологій. Та все ж, він має одну проблему, яку, наразі, не розв'язано – забруднення полів і навколишнього середовища пестицидами. Пестициди не мають достатньої селективності, діючи на всі живі організми як отрута уповільненої дії з кумулятивним ефектом. Тому, головною задачею в цій сфері є нівеляція шкодочинного впливу хімічних засобів захисту, шляхом їх виключення з систем захисту полів. Одним з дієвих способів захистити врожай є імунологічний метод, що базується на доборі стійких сортів, до тих, чи інших збудників хвороб.

В даній науковій роботі було досліджено 70 сортозразків картоплі створених на основі українських ліній. Картопля як дослідна культура була обрана через її велику роль в продовольчій безпеці країни.

Актуальність теми: імунологічний захист, і селекційний добір стійких сортів буде набувати все більшої популярності через все більшу забрудненість навколишнього середовища пестицидами і залишками їх розпаду. І для запобігання забруднення довколишнього середовища засобами хімізації будуть розроблятися альтернативні методи захисту агрономічно важливих культур. Тож підбір рослин які зможуть забезпечити адекватну і актуальну стійкість проти конкретного штаму збудника будуть вестися завжди, через те що збудник з часом також набуває нових пристосувань.

Метою роботи є скринінг частот носіїв алелів гена стійкості H1 картоплі які відповідають за стійкість до карантинного виду нематод *Globodera rostochiensis*, а також ідентифікація алельного стану двох генів (Ry_{chc} Ry_{adg}) стійкості до карантинної вірусної хвороби PVY (*Potivirus Y*).

Основним завданнями можна визначити такі:

1. Скринінг частот зустрічання гена стійкості H1 до золотистої нематоди за маркером TG-689;

2. Ідентифікація генів стійкості Rychc та Ryadg за маркерами Ryo-186 та Rych-3 відповідно, до Потівірусу картоплі Y (PVY)

3. Відбір таких сортозразків з метою рекомендації їх до селективного добору, для створення ліній стійких сортів.

Об'єктом досліджень є гени стійкості картоплі *Solanum tuberosum* до карантинних патогенів та шкідників, зокрема потівірусу картоплі Y та золотистої нематоди *Globodera rostochiensis*

Предметом досліджень є ідентифікація алелів стійкості у сортозразках картоплі, та порівняння частоти зустрічання алелів за маркерними локусами у інших дослідженнях

Головними методами дослідження є використання молекулярних маркерів, що вказуватимуть на наявність генів стійкості у геномі того чи іншого сортозразка. Визначатися вони будуть за допомогою молекулярного методу ПЛР аналізу та фізико-хімічного методу електрофорезу.

НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України

РОЗДІЛ І ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Картопля – ботанічна та біологічна характеристика

Рослина походить з Південної Америки, там і зараз вона росте у дикому стані. За оцінками, вік старших відомих слідів дикої картоплі – 13000 років. Картопля вперше була одомашнена в регіоні сучасного південного Перу і крайнього північно-західного регіону Болівії. У справді великих обсягах картоплю почали вирощувати в Андах [1].

Картопля - одна з найважливіших сільськогосподарських культур у світі, що займає площу близько 18 – 29 мільйонів гектар. Вирощують його у 130 країнах світу. Найбільші посівні площі у країнах – до 13 мільйонів гектар [3].

У багатьох країнах, що розвиваються, і особливо в міських районах, глобалізація, поява точок швидкого харчування та супермаркетів і зростання рівня доходу управління «переходом харчування», зумовленим великими зрушеннями в доступності, доступності та прийнятності різних видів їжі, особливо до більш енергоємних продуктів. також перехід готових харчових продуктів. Це перетворюється на великі та швидкі зміни дієтичних схем. Як приклад цього процесу переходу на харчування попит на картоплю досить швидко збільшується в багатьох країнах, що розвиваються в Африці та Азії [4].

У 2019 році загальносвітовий урожай картоплі склав 371 мільйонів тонн, що на 2,1% більше за аналогічний показник минулого сезону.

У вартісному вираженні світовий ринок картоплі за 2019 рік зріс на 6%, досягнувши 140,5 мільярдів доларів. Про це повідомляє agronews.ua.

До країн з найбільшим обсягом виробництва картоплі у 2019 році увійшли: Китай (93 млн. тонн), Індія (51 мільйонів тонн) та Україна (23 млн. тонн), на які припало 45% загальносвітової частки виробництва картоплі [4].

Близько чверті світового обсягу врожаю картоплі припало на Росію, США, Бангладеш, Німеччину, Францію, Польщу, Нідерланди, Канаду та Білорусь.

Зазначається також, що у 2019 році обсяг відвантаження картоплі за кордон зріс на 4,9%, досягнувши показника 15/млн. тонн [5].

За результатами 2017 року найбільшими виробниками картоплі в Україні стали: Агрохолдинг «Мрія», «Агро ЛВ Лімітед», АТК та «Імпак» дещо менший у ФГ «Аделаїда», ТОВ «Агрофірма Брусилов» та інших.

Чималі площі картоплі засаджують в Україні селяни. У домогосподарствах 74% усіх площ під овочами посідає картопля [6].

Наразі Україна входить до топ-6 країн світу з експорту картоплі.

1.1.1 Ботанічна характеристика

Картопля (*Solanum tuberosum* L) – багаторічна трав'яниста рослина із сімейства пасльонових (*Solanaceа L.*), що об'єднує до 150 диких та культурних бульбоплідних видів. У культурі її вирощують як однорічну рослину – щороку висаджують бульби, з яких протягом одного вегетаційного періоду одержують урожай нових стиглих бульб [7]. Можна вирощувати картоплю також із насіння, що застосовується переважно у селекційній практиці. Види, що належать до роду *Solatium tuberosum L.*, утворюють поліплоїдний ряд з основною кількістю хромосом - 2n-12, 2n-24, 3n-36, 4n-48, 5n-60, 6n-72 [7].

Рис.1.1 Різноманіття бульб картоплі [8]

Всі сорти картоплі тетраплоїдні (4n-48). Коренева система у картоплі, що вирощується з насіння, має спочатку стрижневу будову - у вигляді зародкового стрижневого кореня з бічними корінцями [9]. Потім в основі стебла, в його вузлах, які знаходяться в ґрунті, формується вторинна коренева система, яка разом із зародковою утворює мочкувате коріння. При вирощуванні картоплі з бульб утворюється лише вторинна мочкувата коренева система.

Близько 70% коренів картоплі розміщується на глибині до 30 см, а окреме коріння досягає глибини 1,5 м. Стебла трав'янисті, висотою 30-150 см, у поперечному розрізі ребристі, 3-4-гранні, рідше округлі, опушені [9]. У деяких сортів уздовж стеблових ребер є прямі або хвилясті, вузькі або широкі крила. У пізньостиглих сортів стебла розгалужуються в основному в нижній частині, скоростиглих - в середній. За забарвленням вони можуть бути зеленими, червоно-фіолетовими або червоно-коричневими. Причому антоціанова пігментація в залежності від сорту може виявлятися тільки в основі стебла, вздовж більшої його частини або на всій довжині. Іноді спостерігається досить інтенсивна пігментація, за якої стебла стають майже чорними [9].

З однієї бульби росте в середньому 4-8 стебел, з яких утворюється кущ. За виглядом і будовою кущі бувають прямостоячі, розлогі мало- і багатостебельні, з рівними або ярусними стеблами.

У пазухах підземної частини стебел утворюються бічні пагони – столони завдовжки 5-20 см, іноді до 35-40 см [9]. Зростають вони у ґрунті горизонтально, утворюють у вузлах коріння і здатні самостійно укорінюватися. На кінцях столонів із невеликих спочатку потовщень розвиваються бульби. Листя складне - переривчасто-непарноперисторозсічене. Складаються з центрального черешка (стрижня), кількох пар листя або частинок, верхівкової непарної частинки, між якими розташовані невеликі за розміром частинки і маленькі часточки. Частинки бувають сидячими чи розміщеними на коротких черешках. За формою вони округлі, овальні, подовжені, яйцеподібні, ромбічні, гострі або овально-гострі,

опушені. Частинки частинки та часточки можуть бути симетричними (рівновеликими) та несиметричними.

Листя розміщене на стеблах спірально. У своїй основі мають дві серпоподібні або листоподібні прилистки. Квітки п'ятичленові: чашечка складається з п'яти гостро-зубчастих, зрощених в основі чашолистків, віночок - з п'яти пелюсток, що зрослися [1]. У квітці розміщуються п'ять тичинок, пилки яких на коротких ніжках щільно складені в циліндричну або конусоподібну колонку, і маточка з верхньою зав'яззю зі стовпчиком з рильцем, який пронизує центральну внутрішню частину колонки і видається над пилками або іноді з рівним. нижче за них. Віночок білий, синій, синьо-фіолетовий, рожевий, червоно-фіолетовий. Пиляки помаранчеві, жовті, жовто-зелені.

Квітки на рослинах зібрані в суцвіття яких на одному квітконосі буває від 2 до 4. Плід – багатонасіннєва двогніздна ягода. Вона округла або округло-овальна, жовто-зелена. Насіння дрібне, яйцевидно-плюснуте, блідо-жовте або кремове [10].

1.1.2 Біологічні особливості бульб картоплі як насіннєвого матеріалу

Бульба є основним типом розмноження картоплі, що походить від тетраплоїдного підвиду *Solanum ssp*. Картопля може формувати бульби за короткі (12-13 годин) та довгі (15-18 годин) дні. Як адаптивна відповідь на розмноження в екстремальних умовах, здатність формувати бульби була створена під час еволюції [11]. Після ембріональної та ювенільної стадії онтогенезу вузлики виникають через вікові зміни в організмі. Основними факторами, що визначають зовнішнє середовище для переходу бульб, є тривалість та температура доби.

Ріст картоплі проходить у дві фази: 1) виникнення та зростання столонів; 2) зростання бульб. Рецепторним органом фотоперіодичного впливу зовнішніх умов є лист. У листі виникає стимул гормональної природи, який пересувається вниз стеблом, до нижніх стеблових бруньок, здатних до бульбоутворення відзначає Чайлахян М. Х [11].

Після збору врожаю та періоду спокою бульби проростають переважно з апексів верхівкових клітин. У багатьох випадках, особливо при посадці непророщених, неушкоджених, здорових бульб, у формуванні куща беруть участь лише бруньки верхніх бруньок, тоді як інші не використовуються [12]. Картоплю як насіннєвий матеріал можна використовувати для посіву тільки тоді, коли вони досягнуть зрілості і припинять відповідні біохімічні процеси, що призводять до проростання бруньок. Молоді бульби зазвичай не проростають [12].

Зростання та розвиток рослин після сходів залежить від температури, вологості, світла та поживних речовин. Висока температура (+20-25°С) прискорює зростання, якщо води достатньо! температура нижче +12° С затримує процес зростання, коли температура опускається до 5 – 6°С, картопля повністю припиняє зростання та розвитку картоплі [11]. Дуже високі температури (вище +30°С) пригнічують рослини та затримують їх схожість та зростання. Рослини картоплі, що розвиваються в умовах довгого дня, починають швидше цвісти і швидше завершують свій розвиток як насіннєві організми. Усього за день його зростання і розвиток затримались, а цвітіння почалося набагато пізніше [13].

1.2 Шкодочинність карантинних організмів та хвороб на картоплі

Бульбам загрожує понад 60 шкідників, а також близько 80 хвороб. Пошкоджуються як надземні так і підземні частини рослин. Багато шкідників може знищити весь врожай [14]. Для отримання стійких високопродуктивних та якісних бульб господарству слід вжити низку заходів щодо запобігання та боротьби з хворобами і шкідниками картоплі.

Сьогодні існує високий ризик проникнення карантинних організмів через насіння та посадковий матеріал та його поширення що може завдати серйозної шкоди. Оскільки вони з'являються на нових територіях без природних ворогів, такі види можуть наносити набагато більше шкоди культурним насадженням.

Слід звернути увагу на посадковий матеріал картоплі, який може бути носієм таких карантинних організмів як картопляна міль, золотиста нематода, рак картоплі. [14].

Паразитичні нематоди повсюдно завдають великої шкоди виробництву картоплі, щорічні глобальні втрати від них становлять 10–15% і оцінюються в 78 млрд доларів [15]. Картоплю вражає 34 види паразитичних нематод, 6 з яких принаймні можуть спричинити значні втрати врожаю. Серед них поширені у всіх зонах обробки картоплі та найбільш шкідливі цистоутворюючі картопляні нематоди (ЦКН) – золотиста картопляна нематода (ЗКН) *Globodera rostochiensis* (Woll.) та бліда картопляна нематода (БКН) *Globodera pallida* (Stone). Ці види вважаються об'єктами зовнішнього та внутрішнього карантину та широко поширені на всіх континентах: у Європі, Північній та Південній Америці, Азії, Африці, Океанії. ОКН поширені також і в Австралії [16]. Не дивлячись на це ЗКН зустрічаються вже в Україні майже повсюдно, де вирощують картоплю.

Крім ЦКН, суттєві втрати врожаю картоплі можуть спричинити карантинні, широко спеціалізовані види нематод, які нині відсутні на території України. Згідно з єдиним переліком карантинних об'єктів Євразійського економічного союзу (ЄАЕС) від 30 листопада 2016 р. № 158 зі змінами та доповненнями від 8 серпня 2019 р. до переліку карантинних шкідливих організмів, відсутніх на території ЄАЕС, входять: галова нематода *Meloidogyne chitwoodi* Golden et al., коренева галова нематода *M. enterolobii* Golden et al. та хибна колумбійська головна нематода *M. fallax* Karssen. Стеблова нематода картоплі *Ditylenchus destructor* (Thorne) відноситься до карантинних видів у Європейському союзі (список А2)[17].

1.2.1 Картопляна міль (*Phthorimaea operculella*)

Картопляна моль може завдати значної шкоди виробникам картоплі, особливо при зберіганні (рис. 1.2). Прихований спосіб життя шкідника, мала кількість у першій половині вегетації пасльонових культур, подібність ознак

ураження з іншими видами молі значно ускладнюють виявлення картопляної молі [14]

Картопляна міль – це карантинний шкідник, поширений переважно на півдні України. Спричиняє втрати врожаю картоплі, тютюну, баклажанів, помідорів, дурману.

Рис. 1.2 Картопляна міль [14]

Картопляна міль розмножується на полях та складах. Типовою зовнішньою ознакою ураження гусениць бульб картоплі є скупчення калу на поверхні. Гусениці розвиваються серед бульб і проникають у тому канали, подібні губкам [14]. В одній картоплині може розвинутися понад 10 гусениць. Бульби, які були серйозно пошкоджені картопляним опіком, стають непридатними для посадки та переробки (рис. 1.3).

Старі гусениці та лялечки у коконах зимують у природних умовах. У приміщеннях для зберігання картоплі з температурою 15 С та вище можуть виникнути бульби картоплі та шкідники озимих рослин [14].

Виліт метелика на півдні України проходить у травні. Метелики літають вночі, від заходу сонця до сходу сонця, через 1-2 години після сходу сонця. Через один день після парування самки відкладають яйця і кладуть їх на дно листя,

стебла, ґрунт, оголені бульби картоплі, одну або кілька груп [14]. За 2-16 днів самка може відкласти до 300 яєць.

Рис. 1.3 Пошкоджені бульби картоплі гусеницями картопляної молі [14]

Залежно від температурних умів, гусениці відновлюються з яєць протягом 3 - 15 днів, гризуть під епідермісом листя, паростки або молоді бульби, харчуються там, утворюючи звивисті канали, повні екскрементів. У середньому після 11–14 днів годування гусениці залишають хід і будують гнізда між мертвим листям, щілинами ґрунту, рослинними рештками, бульбами на зберігання та іншими укриттями, де вони гніздяться [14]. Через 7-12 днів метелик вилітає з кокону, відкладає яйця і починає розвиток нового покоління.

На півдні України картопляна міль природно розвивається протягом п'яти поколінь, накладаючись одна на одну, тому дорослі особини спостерігаються майже безперервно з травня по листопад, найбільша кількість – з вересня по жовтень.

1.2.2 Золотиста картопляна нематода (*Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens)

Золотиста картопляна цистоутворююча нематода (лат. *Globodera rostochiensis* (Wollenweber)— вузькоспеціалізований вид, який паразитує на корінні картоплі та томатів, також вражає інші рослини з сімейства пасльонові

(рис. 1.4) [14]. Золотиста картопляна нематода є карантинним видом, що належить до списку А-2 (обмежено поширені на території України) Пошкоджує вона перш за все картоплю, не тільки завдаючи значної шкоди врожаю (30 - 80%), але й погіршуючи смакові властивості бульб, знижуючи вміст сухої речовини, крохмалю, білка та вітаміну С. Особливо шкодять цистоутворюючі нематоди на присадибних ділянках, де картоплю вирощують як монокультуру [18].

Розвиток картопляних нематод відбувається у коренях рослини – господаря. Хворі рослини утворюють слабкі стебла, що передчасно жовтіють. Бульби утворюються рідко, вони дрібні, а іноді й зовсім відсутні. Картопляні нематоди завдають особливо серйозної шкоди домашнім садам та полям, де скорочені спеціалізовані сівозміни, де картоплю висаджують кожного року або повертають на початкове місце на другий – третій рік [19]. Втрата врожаю може становити 30-80%.

Рис. 1.4 Ураження золотистою картопляною нематодою Globodera rostochiensis [14]

Найчастіше золотисті картопляні нематоди зустрічаються в більшості районів та присадибних ділянок, а саме у Вінницькій, Волинській, Житомирській, Закарпатській, Івано-Франківській, Київській, Львівській, Одеській, Рівненській, Сумській, Тернопільській, Хмельницькій, Черкаській [14].

Основними джерелами передачі картопляних нематод є забруднений грунт, посадковий матеріал, сільськогосподарськ інструменти, транспортні засоби з частинками грунту та людське взуття. Можуть переноситися цисти з контейнерами, вітром, дощем та машинами для тварин.

1.2.3 Рак картоплі (*Synchytrium endobioticum* Pers.)

Найбільш типові ознаки цього захворювання – зростання на бульбах, столонах, кореневих шийках, а рідше на стеблах, листі та квітках (рис. 1.5). Корінь ніколи не постраждає. Росте під землею – білий, на наземній частині рослини – зелений [14]. Наприкінці вегетаційного періоду паріст темніє та загниває. На заражених бульбах, якщо врожай вирощують на зараженій території, може зберігатися під час зберігання рак.

Рис. 1.5 Прояв раку картоплі[14]

Після періоду спокою кісти утворюють первинні зооспори, які є джерелом інфекції. Цисти можуть залишатися у грунті 30 років [14]. Оптимальна температура розвитку грибів – 16,6-17,7 °С, а найвища – 21,1 °С. Цей патоген відноситься до тих, хто любить вологу.

Фізіологічний імунітет картоплі до раку пов'язаний із некротичними змінами клітин рослини-господаря. Стійкість різних видів захворювання також залежить від швидкості утворення некротичних клітин навколо паразита в місці його інвазії. У нечутливих сортів ця некротична зміна відбувається у перші 3-5 днів після вторгнення паразита, що призводить до його загибелі [14].

Останнім часом багато дослідників помітили існування кількох рас *S. endobioticum*, та його агресивність різна. У горах України було виявлено три нові агресивні раси, які навіть вплинули на породу Мир, яка є стабільною у Німеччині.

Міжвидова гібридизація має велике значення у розвитку протиракових сортів картоплі. І тому підходять такі види: *Solanum acaule, S. simplefolium, S. microdontum, S. vemeis sp. balsii, S. pinnatisectum, S. tuberosum f. pichuna* та ін. Існує велика кількість вихідних матеріалів для вибору при розведенні протиракових захворювань серед сортів: Агра, Зікінген, Камараз, Крохмалиста, Лрієкульська рання, Пепс, Катюша, Немишаєвська, Фрам та Спиртовик, що забезпечують близько 88% протиракової сходи [14].

Основними джерелами зараження картоплі на рак є уражені бульби і забруднений грунт. Збудники поширюються переважно через бульби, коріння та цибулини, які ростуть на ураженій діляниці. До овочів можуть прилипати грудки зі сплячими спорами. Також можлива передача збудників через гній, оскільки суперечки можуть пережити травну систему тварини.

Рак картоплі дуже шкідлива хвороба. Дефіцит урожаю, спричинений хворобами, може досягати 40-60% і більше. Уражені бульби швидко та повністю загнивають. Ця хвороба особливо серйозна у домашніх садах, де безперервна посадка картоплі сприяє нагромадженню патогенних мікроорганізмів [14].

Такі сорти як Віхол, Красива, Ізора, Пролісок, Українська Рожева та інші мають підвищену стійкість до раку.

1.2.4 Потівірус картоплі Y (PVY)

PVY належить до роду Potyvirus, найбільшого роду вірусів рослин і, можливо, найбільш руйнівної в посівах картоплі. Рід налічує понад 200 видів, що завдають значних втрат на сільськогосподарській арені. PVY заражає багато економічно важливих видів рослин. До них відносяться картопля (*Solanum tuberosum*), тютюн (*Nicotiana tabacum*), помідор (*Solanum lycopersicum*) та перець (*Capsicum spp.*) [20]. Єдине захворювання зі списку що не є карантинним на території України.

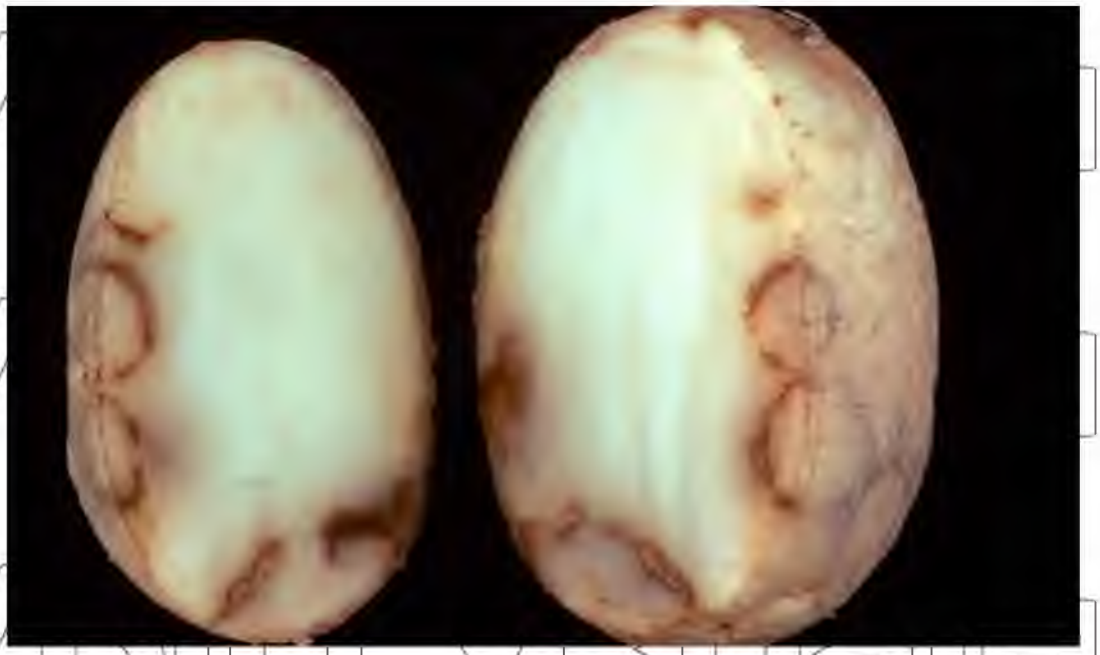


Рис. 1.6 Прояв віруса Y картоплі, ураження бульб картоплі рекомбінованою формою віруса [21]

Рівень пошкодження врожаю визначається штамом PVY, що інфікує рослини, вірусним навантаженням, часом, коли відбувається зараження, а також толерантністю, яку господар має до вірусу. Стійкість до PVY-інфекції з боку господарів у багатьох випадках низька. Інфікування картопляного поля PVY може зрештою призвести до втрати врожаю на 10-100% [22]. Більше 40 видів попелиць можуть бути переносниками цієї групи вірусів. Було показано, що PVY має різні ізоляти відповідно до симптомів, які вони викликають у різних видів

рослин картоплі. Велика біологічна, серологічна та молекулярна мінливість ізолятів PVY ускладнює класифікацію ізолятів як окремих штамів. Поява різних симптомів та некротичного PVY^{NTN} призвели до пошуку більш надійних засобів класифікації, ніж проста серологічна ідентифікація [22]. Традиційно визнаються три основні штами PVY: PVY^{C}, PVY^{N} та PVY^{O}, PVY^{C}, спочатку відомий як Potato Virus C, був уперше впізнаний і ідентифікований у 1930-х роках. PVYC викликає гіперчутливі реакції у багатьох сортів картоплі [23]. Ці реакції включають утворення м'яких мозаїчних візерунків чи штрихових смуг. На відміну від інших PVY штамів, деякі PVY^{C} штами передаються не попелицями. Попередні дослідження не визначили жодного з місцевих ізолятів як PVY^{C}, але повідомлялося, що це відбувалося у Південній Африці. Другий штам PVY – PVY^{N}. Цей штам був описаний у тютюнових рослин, які ростуть близько до рослин картоплі. PVY^{N} призводить до некрозу листя і легкого пошкодження бульб або навіть їх відсутності [23, 24]. Звичайний штам PVY позначається як PVY^{O} [23]. Інфікування рослини картопл штамом PVY^{O} призводить до легкого пошкодження бульб і не викликає некрозу листя. І PVY^{N}, і PVY^{O} передаються попелицею та зустрічаються у Південній Африці. У Європі було показано, що ці два штами рекомбінували з утворенням PVY^{NTN}. PVY^{NTN} акредитований за здатністю викликати некротичну хворобу кільцевих бульб картоплі (PTNRD). Картоплі, пошкоджені PTNRD, стають неторговими, тому зараження PVY^{NTN} призводить до більшого економічного впливу, ніж зараження іншими штамами [20].

Загальні стратегії контролю для зменшення поширення PVY і, отже, наступні втрати врожаю залежать від використання здорового, сертифікованого насіннєвого матеріалу, а також стійкий до вирощування сорту. Два типи генів стійкості до PVY були виявлені у картоплі та її диких родичів. Ry гени надають безсимптомну екстремальну резистентність (ER), тоді як гени Ny викликають гіперчутливу реакцію (HR) видимий як місцевий некроз, який також може

запобігти поширенню вірусу в певних умовах довкілля (Cockerham 1970; Valkonen et al. 1996).[58]

1.2.5 Методи захисту картоплі від шкідників і хвороб

Основою для планування та проведення захисних заходів, визначення потреби у хімічних та біологічних засобах, а також матеріальних та трудових витрат прогноз [25]. Але традиційні методи та способи прогнозування фітосанітарного стану агроценозів ще недосконалі.

Середня врожайність картоплі близько 100 ц/га. Картопля має значну кількість небезпечних паразитів та хвороб, які суттєво знижують урожайність. Основний фактор, що знижує рентабельність вирощування картоплі – хвороби, основним способом контролю яких продовжують залишатися хімічні засоби захисту. Вирощування сортів картоплі з тривалою стійкістю до хвороб – екологічно найбільш безпечний та економічно вигідний спосіб запобігання епіфітотіям [26].

Є ряд хвороб грибної та бактеріальної природи, які також істотно впливають на врожай. Наприклад, фітофтороз картоплі (рис. 1.6). Збудником хвороби є нижчий гриб *Phytophthora infestans*. Втрати врожаю на окремих ділянках можуть становити до 70%, також можуть погіршитися смакові якості бульб. Альтернаріоз – тягне у себе втрати врожаю 10-30% а роки епіфітотії до 60% [18, 26]

НУБіП України

Рис 1.6 Ураження рослин картоплі вірусом Y [18]

Щоб захистити картоплю від хвороб, потрібно використати повний комплекс агротехнічних заходів, імунології та хімічних методів. Восени необхідна глибока оранка для того, щоб сприяти швидкому розкладанню рослинних залишків та запобігти накопиченню хвороботворних мікроорганізмів. Не слід розміщувати рослини поруч із помідорами, що уражуються тими ж хворобами, що й картопля [18]. Найкращі попередники: зернові, багаторічні трави, один шар сівозміни. Зазначимо, що селекція стійких до хвороб сортів є дуже важливою мірою запобігання спалахам хвороб.

Підготовка насіннєвого матеріалу повинна включати кілька методів: тримання бульб при температурі 15-18 °С протягом 10-15 днів для фітопатологічного аналізу та видалення хворих бульб [18, 26]. Також потрібно врахувати найкращий час для посадки бульб.

Важливо зберегти просторову розділеність сортів із різними термінами дозрівання. Системи добрив слід формулювати на основі попередніх результатів аналізу грунту, оскільки збалансоване мінеральне харчування рослин може зменшити їхню сприйнятливість до хвороб.

Дезінфекцію насіннєвого матеріалу проводять одним із дозволених протруйників: Максим 025 FS, ТН, 0,75 л/т (суха гниль, ризоктоніоз, звичайна парша, фомоз); Ровраль Аквафло, КС, 0,38-0,4 л/т (ризоктоніоз, парша, суха та мокра гнилі); Селест Топ 312,5 FS, ТН, 0,5–0,7 л/т (дротяники, личинки травневих жуків, капустянка, несправжні дроти, попелиці, колорадський жук; різоктоніоз, альтернаріоз); Серкадіс, КС, 0,2-0,25 л/т (ризоктоніоз, парша звичайна, суха гниль, фомоз); Дитан М-45, ЗП, 2-2,5 кг/т (ризоктоніоз) та інші. Боронування для знищення грунтової кірки, контроль бур'янів, своєчасне високе підгортання рослин [26, 27].

Для зниження втрат врожаю картоплі застосовують хімічний метод, що має низку негативних ефектів, зокрема засоби хімізації, що забруднюють водойми, грунтові води, грунт, і є небезпечними для бджіл. Хімічний метод захисту рослин полягає у застосуванні препаратів хімічного синтезу (хімічних засобів захисту рослин), здатних спричинити загибель різних видів шкідливих (і не тільки) видів організмів або порушувати їх розвиток [28]

Найбільш фундаментальний спосіб захисту картоплі під час вегетації – використання фунгіцидів. Проводити перше обприскування до появи ознак захворювання, пізніше закриття верхньої частини рядка листям (профілактично). Подальше лікування та їх різноманітність залежать від тривалості та механізму застосування фунгіциду, стійкості до сорту та прогнозу захворювання. Слід зазначити, що використовувати фунгіциди при появі симптомів менш ефективно.

В даний час на ринку ЗЗР для боротьби з хворобами картоплі існує багато фунгіцидів: Акробат МЦ, в.г., 2 кг/га (фітофтороз, інші плямистості); Антракол 70 WG, ВГ, 1,5 кг/га (фітофтороз, альтернаріоз); Інфініто 61 SC, 687,5, КС, 1,2-

1,6 л/га (фітофтороз); Квадріс Топ 325 SC, КС, 0,75-1 л/га (фітофтороз, альтернаріоз); Косайд 2000, ВГ, 1,5–2,5 кг/га (альтернаріоз, фітофтороз); Ревус Топ 500 SC, КС, 0,6 л/га (фітофтороз, альтернаріоз); Швидкість 250 ЄС, КЕ, 0,5 л/га (фітофтороз, альтернаріоз); Танос 50, ВГ, 0,6 кг/га (фітофтороз, альтернаріоз) та ін [27].

Використання хімічних речовин має суворо відповідати їхнім правилам використання, що значно підвищить їх ефективність та запобігатиме утворенню стійких до ліків патогенів. Перед збиранням урожаю обробіть рослини дозволеними осушувачами. Ця техніка може запобігти зараженню бульб картоплі

Збір урожаю проводиться в суху погоду. Після збирання бульби слід захистити від різкого перепаду температури та утворення конденсату. Картопля, зібрана при температурах нижче 4°C і вище 25°C, більш схильна до травмування під час збирання, а згодом – більш сприйнятлива до патогенів. Після збирання врожаю важливо забезпечити хорошу вентиляцію при температурі 10-20 ° С протягом 10 днів (період обробки) для загоєння ран на бульбах. Перед розміщенням на зберігання відсортувати посіви та видалити хворі бульби [27].

Також використовують біологічний метод, який також має ряд мінусів, таких як складність у застосуванні, відкладена дія препарату або ентомофага, низька стійкість деяких біологічних агентів у природному середовищі, необхідність добового моніторингу та інші. Складові успішного захисту, що запобігає масовому поширенню паразитичних нематод, – це карантинні заходи та обробіток стійких сортів.

З існуючих біологічних способів захисту картоплі від паразитичних нематод можна відзначити використання рослин, що стимулюють вихід личинок з яєць, але не субстрат для їх розмноження. Таким видом-пасткою вважається, наприклад, *Solanum sisymbriifolium* (Lam.) [29]. У США (штат Айдахо) використання як пастки *S. sisymbriifolium* у трьох осередках *G. pallida* дозволило знизити життєздатність яєць на 95–100 % [19].

Сорти картоплі зі стійкістю до розширеного спектру патогенів більш конкурентоспроможні на ринку та забезпечують отримання екологічно чистої продукції та збереження навколишнього середовища. Останні два чинники мають як економічне, а й істотне соціальне значення [17].

Останнім часом набув поширення імунологічний метод. Єдиним мінусом його є розтягнутість у часі. Від початку процесу до впровадження у сівозміни господарства може пройти до десяти років. Але при цьому стійкість, наприклад, виведеного сорту може триматися близько 5-10 років. Імунологічний метод базується на виведенні стійких проти певних хвороб та шкідників, сортів, які демонструватимуть задовільні показники стійкості, коли ураження збудником цільової хвороби не спостерігатиметься зовсім або не перевищуватиме ЕПШ. Загалом, можна сказати, що моя робота збирається й уточнити методи, що починають процес створення стійкого сорту - відбір сортів із потрібними генами стійкості [17]. Складність відбору полягає лише в тому, що він де не за однією характеристикою, а одразу за декількома.

Клони, отримані з одиничних рослин, розмножуються вегетативно і оцінюються у відповідні агрономічні та якісні показники протягом сезонів відбору, що повторюються. Цей загальний підхід до селекції картоплі призвів до впровадження у масове виробництво багатьох елітних клонів, які стали дуже успішними сортами картоплі [30].

Адаптація та стійкість до захворювань – комплексні неморфологічні ознаки, їх важко виміряти. Їх можна досліджувати в експериментах, де рослини піддаються специфічним навколишнім впливам або інфікуються відповідними агентами. Однак такі експерименти трудомісткі та дорогі. Тому надзвичайний інтерес дослідників викликає ідентифікація генів, які контролюють складні ознаки. Для виявлення таких генів використовують різні підходи [31].

1.3 Загальні поняття про ДНК-маркери

1.3.1 Селекція, її роль у захисті рослин

Селекція рослин – теорія та практика створення нових та покращення існуючих сортів рослин, найбільш пристосованих для задоволення потреб людини. Систематизація результатів проведених гібридизацій та спроб їх пояснень розпочалася у другій половині XVIII століття. Були здійснені гібридизації різних видів рослин багатьма вченими. Теорія Дарвіна, яку він запропонував у 1759 році, показала значні можливості зміни типів рослин у потрібному напрямку методом безперервного відбору [32].

Теоретичною базою селекції генетика та еволюційне вчення. Академік В. І. Вавілов, даючи визначення селекції як науки, зазначав її комплексність і вказував, що для успішної роботи в галузі селекції рослин потрібно враховувати вихідне сортове та видове розмаїття їх генотипів, роль середовища для розвитку та виявлення спадкових ознак, закономірності спадкування під час гібридизації, вплив природного відбору та форми штучного відбору, спрямовані на виявлення та закріплення цінних ознак.

Сорти культурних рослин, створених людиною, є популяціями організмів [32]. Кожен сорт рослин та кожна порода свійських тварин характеризуються своїми спадковими особливостями, морфологічними та фізіологічними ознаками, певною продуктивністю та нормою реакції на зовнішнє середовище. Кожен сорт рослин і порода тварин найповніше виявляють свою продуктивність лише за певних умов, котрим вони виведені [33].

Порода та сорт, з одного боку, можуть включати тварин та рослини з нетотожними генотипами, що дає матеріал для селекції та покращення цінних для господарства ознак. З іншого боку, створюють лінійні групи, які отримують самозапилення однієї рослини або близьким спорідненим схрещуванням (інбридингом) перехреснозапильних рослин, а також тварин. Лінійні групи рослин та тварин характеризуються високою гомозиготністю [32, 33]. При

розведеині їх у потомстві немає розщеплення і господарські ознаки зберігаються в усіх представників цієї лініі, але подальший підбір чистих ліній неефективний.

Генетична база сортів картоплі вузька і може бути дуже сприйнятливою до нових штамів шкідників та хвороб, таких як фітофтороз картоплі, що призвів до Великого ірландського голоду [33]. Хоча існує багато диких родичів картоплі, завдяки різноманітності репродуктивних механізмів, це призводить до генетичної ізоляції від картоплі, що культивується.

Основна проблема селекції рослин на стійкість до хвороб – висока адаптивна мінливість патогенів, що призводить до обов'язкової втрати стійкості при тривалому вирощуванні сортів, захищених одними й тими самими генами, на великих площах. Щодо ЦКН, і, зокрема, ОКН, широке використання стійких сортів, захищених геном стійкості H1, ефективним проти поширеного патотипу Ro1, створює умови адаптивної еволюції паразита і небезпеки появи нових патотипів [33]. Не виключений і занесення інших патотипів ЦКН, а також виду *G. pallida* із насінневою картоплею із Західної Європи. В даний час в Україні та Росії вид *G. rostochiensis* представлений виключно одним патотипом, Ro1, а бліда нематода *G. pallida* досі не виявлена. Така ж ситуація існує в Австралії, де поширений лише один вид *G. rostochiensis* та патотип Ro1, а *G. pallida* не виявлено, що було доведено секвенуванням ITS ділянок рибосомних генів [34].

В даний час активно розвиваються молекулярно-генетичні методи видової діагностики паразитичних нематод, з'явилися нові дані щодо механізмів мінливості популяцій цистоутворюючих та галових нематод, що дозволяє визначити походження місцевих популяцій патогену та прогнозувати їх можливі адаптаційні зміни до оброблюваних сортів картоплі. Є успіхи у розробці молекулярних маркерів генів стійкості та створенні сортів картоплі, генетично захищених проти різних патотипів та видів цистоутворюючих картопляних нематод [32].

Методи селекції, у яких застосовуються ДНК-маркери, поділяються на дві основні групи: ОПМ та геномна селекція. Метод ОПМ передбачає використання ДНК-маркерів, тісно зчеплених з цільовим геном, замість або разом із фенотиповим аналізом. Маркери, тісно зчеплені з цільовим геном, є надійним інструментом передбачення фенотипу.

Традиційна схема селекції картоплі заснована на фенотиповій оцінці та відборі зразків, що відповідають моделі сорту. Тривалість селекції від гібридизації до передачі перспективних номерів на державне сортовипробування становить понад десять років. Використання у дослідженнях досягнень молекулярної генетики дозволяє сучасним вченим створювати нові технології селекції [35].

Багато селекційно цінних ознак картоплі, зокрема стійкість до вірусів X, Y, S, вірусу скручування листя картоплі (ВСЛК), цистоутворюючій нематодам, раку, мають моногенно-домінантну природу [35]. Застосування маркерів для ідентифікації цінних генотипів, зокрема форм із кількома стійкими генами, дозволяє значно підвищити ефективність відбору ранніх етапах селекції [36, 37]. Новим підходом у використанні ДНК-маркерів є розробка технології мультиплексної ПЛР для одночасного тестування сортів та селекційних ліній за кількома генами, що контролюють стійкість до вірусів та нематод [36, 38]. Це у багато разів підвищує ефективність маркер контрольованого відбору (marker-assisted selection – MAS) і підвищує надійність тестування, оскільки зазвичай до ампліфікуючих фрагментів входить контрольний ПЛР-продукт, присутній у всіх зразках, що мінімізує помилково негативні результати [35].

Найбільш відомі у цьому напрямі роботи японських учених. Це система для виявлення маркерів ряду R-генів, що визначають стійкість до основних патогенів картоплі: вірусів X (маркер PVX) та Y (маркер Ry186), *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens (маркер N146) та раси 1 *Phytophthora infestans* (Mo Bary (маркер R1) (Mori et al., 2011). Інша система (маркери N146, N195, Gpa2-2 та

Gro1-4-1 дозволяє одночасно проводити скринінг на присутність всіх основних генів стійкості до цистоутворювальних нематод [35, 38].

Для розвитку селекції картоплі велике значення має скринінг сортів та вихідних батьківських форм на наявність генів стійкості до хвороб та шкідників [39, 40]. Молекулярно-генетична характеристика гібридів картоплі, що використовуються селекціонерами як донори стійкості до найбільш шкідливих патогенів, робить більш обґрунтованим підбір батьківських пар для схрещування. Залучення до гібридизації генетично різноманітних джерел дозволяє поєднувати у гібридному потомстві високу та стабільну стійкість до основних фітопатогенів з комплексом господарсько цінних ознак.

Різноманітність видів картоплі обговорювалося у спеціальному випуску Machida-Hirano (2015) у зв'язку з географічним поширенням та видовим розмаїттям. Звичайні культурні сорти картоплі включають тетраплоїдні (2n = 4x = 48) з основним числом хромосом 12, у той час як є культурні види на диплоїдному (2n = 2x = 24) та пентаплоїдному (2n = 5x = 60) рівнях [35]. Культурні види триплоїдів та пентаплоїдів вирощуються тільки на високогірних плато та схилах Анд, але диплоїдні культурні види вирощуються ширше і також використовуються для розведення тетраплоїдних різновидів.

Енергетичні ресурси дикої та культурної картоплі мають різноманітні репродуктивні та генетичні характеристики, пов'язані з диференціацією видів та селекційними застосуваннями. Кількість видів варіюється залежно від таксономічної класифікації. Ідентифіковано близько 200 диких видів. Більшість з 200 диких видів диплоїдних, і багато з цих диплоїдних видів можуть бути схрещені з тетраплоїдом, використовуючи 2n гамети, які можна легко знайти в генетичних ресурсах картоплі як у культурних, так і диких видів [4].

1.3.2 Поняття про ДНК-маркери та їх застосування в селекції

Роль молекулярних маркерів у сучасній генетиці важко переоцінити. З їх допомогою складено докладні молекулярні карти геному людини і десятків видів

рослин і тварин, на які нанесені найважливіші гени, що визначають зростання та розвиток організмів, морфологічні ознаки, стійкість до захворювань та інші властивості. ДНК маркери корисні у фундаментальних (наприклад, у філогенетичному аналізі та у пошуку корисних генів) та прикладних дослідженнях (наприклад, у маркерній селекції, при встановленні батьківства та контролі руху харчових продуктів).

Стівен Тенкелі, з Корнельського університету, США, 1983 р. одним із перших запропонував використовувати ДНК-маркери в селекції, що є піонером у галузі позиційного клонування генів [41].

Класичний генетичний маркер відповідає гену, алелі якого мають чітко виражені відмінності лише на рівні фенотипу. Білковий маркер відповідає гену, алелі якого мають відмінності (різну молекулярну масу) лише на рівні білкового продукту.

Молекулярний маркер відповідає гену або некодуючим ділянкам геному, різні варіанти (алелі) якого відрізняються на рівні ДНК.

Відмінності на рівні ДНК (поліморфізм ДНК) можуть бути виявлені:

- за допомогою гібридизації з відомими нуклеотидними послідовностями;
- при секвенуванні нуклеотидної послідовності;
- при порівнянні довжини фрагментів, отриманих за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР);
- внаслідок обробки ДНК-ендонуклеазою рестрикції [41].

Найбільш широко використовувані молекулярно-генетичні маркери умовно можна поділити на такі типи.

• маркери ділянок структурних генів, що кодують амінокислотні послідовності білків (електрофоретичні варіанти білків),

• маркери некодуючих ділянок структурних генів та

• маркери різних послідовностей ДНК, відношення яких до структурних генів, як правило, невідоме - розподіл коротких повторів по геному (RAPD -

випадково ампліфікуюча поліморфна ДНК; ISSR - інвертовані повтори; AFLP - поліморфізм у сайтах рестрикції) та мікросателітні локуси (тандемні повтори) одиниці у 2-6 нуклеотидах) [41].

Існує цілий набір сучасних технологій виявлення поліморфізму на рівні ДНК, серед яких можна виділити:

• аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів ДНК (RFLP)

• аналіз поліморфізму за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та інші методи на основі ампліфікації ДНК між повторюваними послідовностями в геномній ДНК [42].

Основні класи молекулярних маркерів

- AFLP (amplified fragment length polymorphism) – поліморфні ампліфіковані фрагменти.
- CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) – розщеплені ампліфіковані поліморфні послідовності.
- DART (diversity array technology) – ДНК-чіп технологія для вивчення різноманітності.
- IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism) – поліморфізм ампліфікованої послідовності між ретротранспозонами.
- ISSR (inter simple sequence repeats) – міжмікросателітні послідовності.
- RAPD (random amplified polymorphic DNA) – випадково ампліфікувати поліморфну ДНК.
- RFLP (restriction fragment length polymorphism) – поліморфний рестрикційний фрагмент.
- SCAR (sequence characterized amplified region) – ампліфікована область нуклеотидної послідовності.
- SNP (single-nucleotide polymorphism) – однонуклеотидний поліморфізм.

- SSAP (sequence-specific amplification polymorphism) – поліморфізм сиквенс-специфічної ампліфікації.
- SSCP (single strand conformation polymorphisin) – поліморфізм конформації одноланцюгової ДНК.
- SSR (simple sequence repeats) – прості повторювані послідовності (мікросателіти).
- STS (sequence tagged site) – сайт/локус, маркований нуклеотидною послідовністю.

За допомогою молекулярних маркерів можна:

- прискорювати процес селекції;
- скорочувати площі, зайняті селекційним матеріалом;
- домагатися вищої точності відбору;
- домагатися економії трудових та матеріальних ресурсів.

Серед молекулярних маркерів розрізняють маркери з відомою локалізацією (у певній хромосомі або ділянці хромосоми або поблизу конкретного гена) та маркери, про локалізації яких нічого не відомо (зазвичай це мультилокусні маркери). Молекулярні маркери з невідомою локалізацією можна використовувати для маркування певного гена або хромосоми, також їх успішно застосовують у філогенетичних дослідженнях, для паспортизації сортів рослин та часу [41].

1.3.3 Стійкість до вірусу Y картоплі

SCAR Маркер RYSC3 використовували для визначення наявність гена Ryadg у популяції 71 генотипу зародкової плазми INIA, відповідні прабатьки найчастіше використовуються. У цій роботі показали результати біологічної фенотипічної оцінки шляхом інокуляції вірусу PVY порівняно з наявністю або відсутністю маркеру RYSC3 (генотипу). Результатами стали аналізи SCAR RYSC3, що показує, що 17 зразків (56%) гермоплазми, стійкі до PVY, були

носіями маркера RYSC3. Генотипи, що несуть маркер і сприйнятливі були знайдені [43]

У 2017 році в журналі «Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі» було опубліковано наукову роботу інституту генетики та цитології НАН Білорусії у місті Мінську, а саме О. В. Лівий, Є. В. Воронкова, Ю. В. Полохович, О. П. Ерміщин, який провів ідентифікацію генів стійкості до вірусу Y у мексиканському сорті картоплі *Solanum stoloniferum* Schltdl. Для дослідження було взято 26 зразків цього сорту, насіння яких було отримано з генетичного банку по картоплі NRSP-6, США [44]. З ними було проведено кількісний ПЛР-аналіз з використанням молекулярних маркерів, таких як SCARysto4100 (ген стійкості Ry_{sto}) та CAPS GP122/EcoRV718 (ген стійкості Ry_{tbr}). Дослідження показали, що молекулярний маркер SCARysto4100 26 зразків містив у собі ген стійкості до вірусу Y картоплі, а за маркером CAPS GP122/EcoRV718 всього 6 зразків [44].

Також у 2019 році було опубліковано загальну наукову статтю Федеральним дослідницьким центром «Всеросійський інститут генетичних ресурсів рослин ім. Н.І. Вавілова» та Санкт-Петербурзьким національним університетом (Є. В. Роговіна, П. С. Ульяніч, В. А. Волков, Н. А. Чала, Е. К. Потокіна), де були також розміщені результати їх досліджень з оцінки сортів картоплі вітчизняної селекції щодо виявлення у яких генів стійкості до вірусу Y[45]. Їх результат також був втішним, з 30 сортів картоплі майже всі мали гени стійкості до цього захворювання.

Ще одна наукова стаття, опублікована в 2021 році в журналі "Agronomy", повідомляє, що вчені з наукового агрономічного центру Австралії разом з дослідниками школи біології в Австралії (Brittney M. Caruana, Brendan C. Rodoni, Fiona Constable, Anthony T. Slater and Noel OI Cogan) вивчали дане захворювання на сортах картоплі та перевіряли новий молекулярний алельноспецифічний кодомінантний маркер SNP3279 для ідентифікації гена стійкості Ryadg [46]. Для

дослідження було взято вітчизняні та американські сорти картоплі, всього 11 сортів. З усіх досліджуваних сортів тільки один Emma не володів цим геном стійкості [46]. Решта мали цей ген.

У 2019 році вийшла стаття Рогозіної, яка мала на меті дослідження генотипу сортів картоплі та вдосконалення методів підбору селекційного матеріалу з метою підвищення стійкості до хвороб картоплі, зокрема до вірусів та нематод [47].

У цій роботі була показана молекулярно генетична характеристика міжвидових гібридів картоплі, що надаються селекціонерам як джерела та донори ознак стійкості до шкідливих організмів, дозволить здійснювати більш обґрунтований підбір батьківських пар для схрещування. У представленій роботі чилійські аборигенні сорти картоплі вперше охарактеризовані з використанням ДНК маркерів генів H1, Gro1-4, Gpa2, Ry_{sto}, Ry_{adg}, Ry_{chc} [47]. Вперше отримано результати одночасного тестування клонів міжвидових гібридів та сортів картоплі за кількома генами. В результаті було підібрано умови мультиплексної реакції, що дозволили перевіряти зразки шляхом ПЛР аналізу відразу по кількох генах.

У 2018 році публікується стаття Сайнакової та Романової, де досліджують 40 зразків картоплі. У вибірку увійшли 2 сорти, 3 популяції, отримані від самозапилення сорту Ідеал, та 35 індивідуально відібраних гібридів картоплі [35].

Ампліфікацію продуктів восьми реакцій: RYSC3, Ry186, YES3-3A (Song et al., 2005), TG 689, 57R, N195, Gro1-4-1, Gpa2-2 [35, 38] виконували в мультиплексі реакційної суміші ПЛР ТОВ «Сінтол»)

1.3.4 Стійкість до золотистої нематоди

У 2011 році в науковому журналі Apple Genetics була опублікована наукова стаття про використання молекулярних маркерів для виявлення гена стійкості H1 до золотистої нематоди. Опублікували/такі дослідники як Renata Galek & Michael Rurek & Walter S. De Jong & Grzegorz Pietkiewicz & Halina Augustyniak & Ewa

Sawicka-Sienkiewicz [48]. Для дослідження було взято 47 зразків картоплі із різними кодовими назвами ліній. Додатково у цих лініях проводилося дослідження на ємність каротину в них із використанням маркера ВСН. Було виявлено 39 сортів, які мали ген стійкості H1, 8, мали [48].

У 2013 році було опубліковано загальну статтю українських дослідників з Інституту захисту рослин НААН та Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України (Созінов, Козуб, Блюм, Пилипенка, Карелєв), в якій було викладено результати досліджень щодо виявлення гена стійкості H1 до золотистої нематоди. Для цього було взято 77 зразків картоплі української та іноземної селекції з колекції Устимівської дослідної станції інституту імені Юр'єва НААН України та Інституту картоплярства НААН України. З усіх представлених для аналізу сортів, 20 сортів вітчизняної селекції та 20 сортів іноземної селекції мали ген стійкості до цієї нематоди, решта не мали [49].

У 2018 році в журналі «Землеробство та рослинництво» була опублікована стаття Уральським федеральним аграрним науково-дослідним центром Уральської філії Російської академії наук в особі Шаніної, Клюкіної та Сергієвої, які проводили дослідження з сортами картоплі вітчизняної селекції на виявлення в них генів стійкості маркера TG 689 [50]. Результат також був позитивним, майже всі зразки мали ген стійкості до цієї нематоди. Відсоток виявлення сягав 92%. 4 зразки сортів картоплі не мали у собі цей ген стійкості.

ДНК-маркери мають великий потенціал для підвищення ефективності та точності традиційних програм селекції рослин на основі селекції за допомогою маркерів (MAS). У нашому дослідженні ми оцінили прогностичні можливості маркера SCAR RYSC3 та маркера CAPS GP122564 щодо генів стійкості до PVY Ryadg та Rysto відповідно і маркера TG689, пов'язаного з H1, що надає стійкості до *Globodera rostochiensis* та маркера HC до G. Оцінки були проведені в 28 сортах та в 219 генотипах нащадків, що походять з десяти різних схрещувань [43]

Спостерігали у всіх оцінених сортах очікувані шаблони маркерів відповідно до їх фенотипічної класифікації на стійкі та сприйнятливі генотипи. Однак частково було помічено значні розбіжності при аналізі нащадків контрольованих схрещувань із залученням цих джерел опору, особливо H1. На основі цих результатів обговорюються практичні аспекти ефективної реалізації маркерно-допоміжного відбору, що враховують генетичне походження матеріалу, аспекти витрат та методологію [43].

1.4 Сорти картоплі української селекції стійкі до карантинних організмів та захворювань

Виведено понад 4000 сортів картоплі, що розрізняють за призначенням, терміном дозрівання, врожайності, лежкості бульб, стійкості до захворювань та шкідників сільськогосподарських культур [51]. Існують також звані «місцеві сорти». Особливо плідною у селекції картоплі була праця дослідників за останні 15 років. Створено 10 сортів картоплі, з яких шість занесено до Реєстру сортів рослин України, дві перебувають у Державному сортовипробуванні.

1.4.1 Сорти картоплі стійкі проти карантинних організмів та інших захворювань

Седнівська рання – ранній столовий сорт. Потенційна врожайність при ранньому збиранні 240 ц/га, а кінці вегетації 500 ц/га. Квітки червоно-фіолетові. Картопля округла, біла, вічка поверхневі, м'якоть жовта, не темніє, розварюваність слабка. Смакові якості добрі. Зміст крохмалю 12,7-15,1% [52]. Стійкий проти раку картоплі, картопляної нематоди. Відносно стійкий проти ризоктоніозу, бактеріальних та вірусних хвороб. Сорт вигідно вирощувати на ділянках заражених картопляною нематодою, де дає високі врожаї ранньої картоплі, очищує ґрунт від цисту нематоди. Занесений до Реєстру сортів рослин України з 1994 року [52].

Чернігівська рання – ранній столовий сорт. Потенційна врожайність при ранньому збиранні 270 ц/га, а наприкінці вегетації 460 ц/га. Кущ низький

слабкооблистяний, квітки червоно-фіолетові. Картоплі дуже великі, округло-овальні, білі, поверхневі вічка [52]. М'якуш світло-жовтий, не темніє, розварюваність слабка. Смакові якості добрі. Зміст крохмалю 12,3-14,7%. Стійкий проти раку картоплі, картопляної нематоди, вірусних хвороб. Сорт ефективно очищає ґрунт від цист картопляної нематоди, має високу продуктивність, хороші товарні якості бульб [52]. Внесено до Реєстру сортів рослин України з 1999 року.

Нагорода – ранній столовий сорт. Потенційна врожайність 450 ц/га, середня маса товарного бульби 135-172 г. Квітки блідо-червоно-фіолетові. Картопля дуже велика, овальна; біла шкірка гладка; вічка середньопоглиблені, незабарвлені, м'якоть кремова [52]. Смакові якості добрі. Зміст крохмалю – 17,5%. Стійкий до раку картоплі, відносно стійкий до вірусних хвороб. Внесено до Реєстру сортів рослин України з 2005 року.

Сувенір чернігівський – середньоранній, столовий сорт (рис. 1.11). потенційна врожайність 430 ц/га. Квітки білі; бульби великі овальні, шкірка сітчаста, вічка неглибокі, забарвлені; м'якоть кремова [52]. Зміст крохмалю – 15%. Смак дуже хороший, не уражається паршою, посухостійкий. Стійкий проти раку картоплі та вірусних хвороб. Занесений до Реєстру сортів рослин України із 2009 року [52].

Пекурівська - середньостиглий столовий сорт. Потенційна врожайність 450 ц/га. Квітки білі. Картопля овальна, біла, вічка поверхневі, м'якоть біла, не темніє, розварюваність середня. Смакові якості добрі. Вміст крохмалю 14,4-17,8%. Стійкий проти раку картоплі, картопляної нематоди. Відносно стійкий проти фітофторозу та вірусних хвороб [52]. Сорт ефективно очищає ґрунт від цист картопляної нематоди, висока врожайність поєднується з хорошими смаковими якостями та придатністю до промислової переробки. Занесений до Реєстру сортів рослин України з 1995 року [52].

НУБіП України

Придеснянський – середньостиглий універсальний сорт. Потенційна врожайність 420 ц/га. Квітки червоно-фіолетові. Картопля округлоовальна, біла з сітчастою шкіркою, вічка поверхневі. М'якуш світло-жовтий, не темніє, розварюваність середня. Смакові якості чудові. Зміст крохмалю 197-218%. Стійкий проти раку картоплі, має польову стійкість проти фітофторозу, вірусних хвороб. Бульби зовсім не уражаються паршою звичайною [52]. Цінність сорту в тому, що продуктивність та стійкість проти хвороб поєднуються з високою крохмалистістю, відмінним смаком бульб, придатністю їх до промислової переробки. Занесений до Реєстру сортів рослин України з 1996 [52].

Чернігівська 98 – середньостиглий універсальний сорт. Потенційна врожайність 425 ц/га. Квітки білі. Картопля овальна, біла, вічка поверхневі. М'якуш білий, не темніє, розварюваність середня. Смакові якості чудові. Вміст крохмалю 17,5-19,9%. Стійкий проти раку картоплі, вірусних хвороб, фітофторозу (листя та бульби) та парші звичайної [52]. Вигідно його вирощувати тим, що стійкість проти хвороб, висока продуктивність поєднуються з відмінними товарними та смаковими якостями. Внесено до Реєстру сортів рослин України з 2002 року.

1.4.2 Сорти картоплі, стійкі до карантинних організмів та захворювань виведених Інститутом картоплярства НААН України

Слаута – надраннє, столове призначення (рис. 1.7). Урожайність: 25,0 т/га на 40-45-й день після сходу, 50,0 т/га, наприкінці вегетації, на поливі 70,0 т/га. Вміст крохмалю: 15,4%. Споживчі якості: 8,6 балів. Стійкість проти хвороб: стійкий до раку картоплі, золотистої цистоутворюючої картопляної нематоди, фітофторозу [53]. Морфологічні ознаки: бульби округло-овальні, рожеві, кремова м'якоть, квітки червоно-фіолетові**.** Рекомендовані зони вирощування: Полісся, Лісостеп, Степ.

Рис. 1.7 Сорт Слаута

Мирослава – середньоранніє, столове призначення (рис. 1.8). Врожайність: 50,0-60,0 т/га наприкінці вегетації. Вміст крохмалю: 17,2%. Споживчі якості: 8,2 бали. Стійкість проти хвороб: стійкий до звичайного патотипу раку та золотистої картопляної цистоутворюючої нематоди, стійкий до альтернаріозу, відносно стійкий до стеблової нематоди [53]. Морфологічні ознаки: бульби рожеві, овальної форми, м'якуш світло-жовтого кольору. Рекомендовані зони вирощування. Полісся, Лісостеп, Степ.

Рис. 1.8 Сорт Мирослава

Згода – середньоранніє, універсальне призначення (рис. 1.9). Врожайність: 45,4 т/га наприкінці вегетації. Вміст крохмалю: 17,2%. Споживчі якості: 8,5 бала [53]. Стійкість до хвороб: стійкий до звичайного патотипу раку та золотистої картопляної цистоутворюючої нематоди, стійкий до альтернаріозу, відносно

стійкий до стеблової нематоди. Сорт посухостійкий. Морфологічні ознаки: рожеві бульби, овальної форми, біла м'якоть, квітки червоно-фіолетов [53]. Рекомендовані зони вирощування: Полісся, Лісостеп, Степ.

Рис. 1.9 Сорт Злагода

Фотинія – середньостиглий, столове призначення (рис. 1.10). Врожайність: 50,0-70,0 т/га наприкінці вегетації. Вміст крохмалю: 16,0-17,0%. Споживчі якості: 8,5 балів. Стійкість проти хвороб: стійкий до раку картоплі, відносно стійкий до стеблової нематоди, мокрої бактеріальної гнилі та парші звичайної [53]. Морфологічні ознаки: бульби червоні, видовжено-овальної форми, м'якуш білого кольору. Рекомендовані зони вирощування: Полісся, Лісостеп, Степ.

Рис. 1.10 Сорт Фотинія

Солоха – середньостиглий, столове призначення (рис. 1.11). Врожайність: 38,0 т/га наприкінці вегетації. Вміст крохмалю: 19,2%. Споживчі якості: 8,4 бали.

Стійкість до хвороб: стійкий до картопляної нематоди, парші звичайної, стійкий до раку картоплі [53]. Морфологічні ознаки: бульби темно-фіолетові, округло-овальної форми, м'якуш темно-фіолетового кольору, квітки білі. Зони вирощування, що рекомендуються: Полісся, Лісостеп.

Рис. 1.11 Сорт Солоха

НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Рослинний матеріал

Зразки були зібрані в теплицях інституту (Рис 2.1.), рослинний матеріал було надано Поліським дослідним відділенням ІК НААН лабораторії нематодології для досліджень фенотипової стійкості до золотистої нематоди. В даній роботі я використовував листя картоплі *Solanum tuberosum*.

Листя відбиралося у невеликій кількості в довільних місцях куща. Вибірка зразків картоплі відбиралася випадково, однакові за походженням сортозразки відбирали у разі, якщо фенотип вихідного матеріалу мав відмінності. Нумерація, селекційні номери і походження сортозразків показано у Таблиці 2.1.

Таблиця 2.1.

Довільна вибірка сортозразків Поліського дослідного відділення ІК НААН врожаю 2020р, (1-й рік)

№	№ каталожний	Селекційний номер	Походження сортозразку	Забарвлення бульби
1	1	П.17.1-4	10.11-5/Аладін	Рожевий
2	3	П.19.5/18	Ф.09.209-3/10.9-3	Жовтий
3	4	П.17.8-2	14.36-10/14.4-3	Жовтий
4	8	П.17.8-45	14.36-10/14.4-3	Жовтий
5	11	П.17.9-5	14.13-1/12.21/2	Червоний
6	13	П.19.9/7	09.26/2/Альянс	Червоний
7	14	П.19.9/17	09.26/2/Альянс	Рожевий
8	15	П.17.12-3	13.18/1/Ф.11.12-8	Рожевий
9	16	П.17.13/12	13.18/1/Ф.11.12-8	Жовтий
10	17	П.17.14-4	12.13-14/Ф.11.12-8	Рожевий
11	18	П.17.14-10	12.13-14/Ф.11.12-8	Сл.Рожевий
12	20	П.19.15/19	Радомисль/Світлана	Жовтий
13	21	П.18.17/4	13.6-4/15.4/40	Жовтий
14	22	П.17.8-3	Ф.11.8-8/Бажанна	Сл.Рожевий
15	24	П.17.19-2	13.54-2/Взірець	Сл.Рожевий
16	25	П.17.19/5	13.54-2/Взірець	Червоний
17	29	П.17.19-26	13.54-2/Взірець	Жовтий
18	31	П.17.20-13	Палац/Взірець	Сл.Рожевий

19	32	П.17.20-30	Палац/Взірець	Жовтий
20	33	П.19.22/2	12.14-8/13.56-2	Жовтий
21	34	П.19.22/36	12.14-8/13.56-2	Червоний
22	39	П.17.27-3	13.17-1/Взірець	Жовтий
23	40	П.17.28-6	Лілея/Взірець	Жовтий
24	42	П.17.29-3	Вектар/Взірець	Сл.Рожевий
25	43	П.17.29-5	Вектар/Взірець	Жовтий
26	44	П.17.29-7	Вектар/Взірець	Рожевий
27	45	П.19.29/6	13.42/3/Сонцедар	Рожевий
28	49	П.17.33-3	Лель/Взірець	Жовтий
29	50	П.18.33/1	15.13-20/Адрета	Жовтий
30	51	П.18.33/7	15.13-20/Адрета	Рожевий
31	52	П.17.36-8	Ватя/Взірець	Жовтий
32	54	П.18.36/1	Маніфест/15.67-3	Жовтий
33	55	П.17.38-1	Вектар/Радомисль	Сл.Рожевий
34	59	П.17.38-11	Вектар/Радомисль	Червоний
35	63	П.17.38-33	Вектар/Радомисль	Жовтий
36	68	П.17.40-1	Янка/Вигода	Жовтий
37	71	П.18.45/7	12.35-1/10.10/35	Сл.Рожевий
38	72	П.17.51-2	00.31.26/Сантарка	Жовтий
39	73	П.18.51/3	Н.08.197/105/Ред Конік	С. Фіолет.
40	75	П.18.55/15	Радомисль/Белларoза	Сл.Рожевий
41	76	П.18.56/7	Поран/Радинка	Рожевий
42	78	П.18.61/7	Взірець/Талачинський	Жовтий
43	79	П.18.65/8	Н.09236.с/1/Маг	Рожевий
44	82	П.18.69/2	Н.08.173/9/Фальварк	Сл.Рожевий
45	84	П.18.74/1	15.23/1/Слаута	Жовтий
46	85	П.18.75/8	Чарунка/Альянс	Жовтий
47	87	П.18.75/23	Чарунка/Альянс	Рожевий
48	89	П.18.78/1	Лєтана/Фальварок	Жовтий
49	91	П.18.87/2	F1Б.9-10-11	Червоний
50	96	Г.08.194/33	89.715с88/Тирас	Рожевий
51	101	Г.08.197/48	91.285с5/Сантарка	Рожевий
52	103	Г.10.3/11	87.791с4/Тирас	Жовтий
53	104	Г.10.6/7	89.715с88/Тирас	Червоний
54	115	П.17.1/13	10.11-5/Аладін	Жовтий
55	117	П.16.2-9	10.42/7/Н.07.162-1	Червоний
56	119	П.17.2/3	13.45-3/Аладін	Червоний
57	120	П.17.3-1	Поран/Аладін	Червоний

58	122	П.17.4/22	13.41-6/Аладін	Червоний
59	123	П.17.5-1	13.51-13/14.36-13	Червоний
60	124	П.17.8/18	10.36-10/14.4-3	Жовтий
61	126	ВМ.12.9-8	Батя/Белларoза	С. Фіолет.
62	127	П.17.12/16	13.18/1/Ф.11.12-8	Рожевий
63	128	П.17.13/7	Ф.11.12-8/Бажана	Рожевий
64	129	П.16.16-9	12.2-3/12/19-15	Жовтий
65	132	П.17.18/9	Ф.11.8-8/Бажана	Рожевий
66	134	П.17.18/13	Ф.11.8-8/Бажана	Жовтий
67	135	П.17.19/1	13.54-2/Вірець	Жовтий
68	141	П.16.20-4	09.26/2/08.102/4	Червоний
69	142	П.16.21-8	09.26/2/09.62/1	Червоний
70	143	П.17.21/36	12.48-22/Сонцедар	С. Фіолет.

Рис. 2.1 Теплиці, де було взято вибірку зразків для дослідження

2.2 Виділення ДНК картоплі із сортозразків

Для виділення ДНК картоплі використовувалася методика фірми Neosorb, що мала назву виділення ДНК з використанням силікагелю. Також необхідно зазначити, що технологія була дещо покращена для зручності використання у нашій лабораторії.

Рис. 2.2 Початковий етап виділення ДНК

2.2.1 Протокол виділення ДНК (листя)

Для виділення ДНК картоплі використовувалася модернізована методика фірми Neosorb, (виділення ДНК з використанням силікагелю). Також необхідно зазначити, що технологія була дещо покращена для зручності використання у нашій лабораторії. Перед виділенням рослинної ДНК готуємо наступні розчини: відмиваючий та лізуючий, що будуть використовуватися в даній фазі роботи. Лізисний розчин слугує для розчинення клітинних оболонок і переходу ДНК в розчин, а відмиваючий розчин використовується для очищення вихідного продукту, ДНК, від домішок РНК і т.д.

Таблиця 2.2.

Відмиваючий розчин

Назва реактиву	Кількість, мл
Етанол 95%	39,5
Деіонізована вода	10,0
1М Трис-HCl pH 7,5 мл	0,53
Сумарний V розчину, мл	50

Таблиця 2.3.

Лізисний розчин

Компонент	О/В	50 мл	500 мл
ГХ	г	30.06	300.6
0.1М Трис pH-6.4	мл	19.3104	193.104
0.2М ЕДТА pH-8.0.	мл	1.7	17
Тритон х 100	г	0.5	5

Протокол виділення ДНК, що був використаний в даній роботі

1) Подрібнити 300 мг листя

2) Покласти подрібнене листя у ступку, додати 2000 мкл лізисного буферу та гомогенізувати

3) Відібрати певну кількість рідини у епіндорф, так, щоб кількість її у кожному була приблизно однакова. За необхідності додати лізисного буферу

4) Прогріти у термостаті 30 хвилин при температурі 60 С періодично злегка перемішуючи

5) Відцентрифугувати 8-10 хвилин на 13.3 тисячі оборотів

6) Відібрати самплером рідку фазу

7) Додати ложку силікагель

8) Залишити на 30-40 хвилин періодично струшуючи або.....

9) Центрифугуємо по 10тис обертів, 3 хвилини,

10) Рідку фазу (супернатант) виливаємо

11) Додаємо 800мкл лізисного буфера

12) Центрифугуємо по 10тис обертів, 3 хвилини

13) Додаємо 800-1000 мкл відмиваючого буферу

14) Центрифугуємо по 10тис обертів, 3 хвилини

15) Виливаємо рідину, доливаємо 2000мкл відмиваючого буферу

16) Центрифугуємо но 10тис обертів, 2 хвилини

17) Виливаємо рідину, доливаємо 2000мкл відмиваючого буферу

18) Центрифугуємо но 10тис обертів, 2 хвилини

19) Виливаємо рідину доливаємо, 1000мкл 70% спирту (також можна заміняти на таку саму кількість відмиваючого буферу)

20) Центрифугуємо но 10тис обертів, 2 хвилини

21) Виливаємо рідину

22) Ставимо приблизно на годину на термостат за температури 65 С

2.2.2 Протокол ПЛР-реакції, що використовувався у дослідженні:

1) Перед проведенням реакції готуємо потрібну кількість пробірок для ПЛР. В нашому випадку це 10 штук
2) Маркуємо пробірки згідно проведеного аналізу.
3) Додаємо у всі пробірки по 5 мкл. суміші праймерів. Рекомендована кінцева концентрація праймерів 0.1-0.5 мкМ.
4) Додаємо у всі пробірки, враховуючі контролі, по 10 мкл. 2х суміші для ПЛР.
5) Додати у пробірки по 3 мкл. ДНК зразків, що досліджуються і (+) контроль. В нашому досліді контроль не використовувався. Загальний об'єм реакційної суміші – 20 мкл.
6) Перенести пробірки в термоблок ампліфікатора і вибрати відповідну програму.
7) Після завершення ампліфікації всі пробірки перенести в кімнату для проведення електрофорезу (детекції) ДНК.

Слід зазначити що всі роботи з підготовки мікроепіндорфів для ПЛР-реакції необхідно проводити в ПЛР-боксі

Рис. 2.3 ПЛР-бокс

Рис 2.4 Ампліфікатор

ПЛР в реальному часі здійснювали на ампліфікатори Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler. Даний прилад порівняно дешевий і ефективний, має 96 лунок для мікроепіндорфів і широкий спектр налаштувань, що робить роботу з ним досить простою.

НУБіП України

2.3 Електрофорез – принцип дії та основні види.

Електрофорез в агарозному гелі - це метод, який служить для поділу макромолекул на основі їх розміру, електричного заряду і інших фізичних властивостей. Термін електрофорез описує міграцію заряджених частинок під впливом електричного поля. Наразі власником патенту «Electrophoresis Gel and Method of Making Same» є науковець William F. Alpenfels (Вільям Алпенфельс).

Гель-електрофорез - це метод, при якому молекули змушені рухатися через гелевий простір під впливом електричного струму. Рушійною силою електрофорезу є напруга, що подається на електроди на кожному кінці гелю. Властивості молекул визначають, наскільки швидко електричне поле може переміщати їх через желеподібне середовище.

Рис. 2.5 Прилад для електрофорезу.

Багато важливих біологічних макромолекул (наприклад, амінокислоти, пептиди, білки, нуклеотиди та нуклеїнові кислоти) володіють іонізуючими групами, і при любому заданому значенні pH, містяться в розчині як електрично заряджені частинки, або як катіони (+) або як аніони (-). У залежності від природи зарядженого середовища, заряджені частини будуть мігрувати або до

катоду, або до аноду. Наприклад, коли електричне поле приєднується до гелю при нейтральному pH, негативно заряджені фосфатні групи ДНК забезпечують її переміщення в сторону анода.

Електрофорез в агарозному гелі є стандартним методом, що використовується для розділення, ідентифікації та очищення фрагментів ДНК. Ця методика проста, швидко здійснюється та здатна розділити фрагменти ДНК, які не можуть бути розділені належною формою за допомогою інших процедур. Більше того, локалізація ДНК в гелі може бути визначена за допомогою зафарбовування бромистим етидієм, - флуоресцентним інтеркалярним барвником у низьких концентраціях.

Гель-електрофорез – це метод, який використовується для поділу нуклеїнових кислот і білків. Поділ макромолекул залежить від двох змінних: заряду і маси. Коли біологічний зразок, такий як ДНК, змішується в буферному розчині і наноситься на гель, дві ці змінні діють одночасно. Електричний заряд від одного електрода відштовхує молекули, в той час як інший електрод одночасно притягує молекули. Сили тертя матеріалу, що утворює гель, діють як «молекулярне сито», розділяючи молекули за розміром. В процесі електрофорезу макромолекули змушені переміщатися через пори, і швидкість їх переміщення через електричне поле залежить від наступних параметрів:

- сила електричного поля
- розмір і форма молекул• відносна гідрофобність зразків
- іонна сила і температура буфера, в якому рухаються молекули

Лінійна дволанцюжкова ДНК переміщається через матрикс гелю зі швидкістю, яка обернено пропорційна десятковому логарифму числа нуклеотидних пар. Молекули більшого розміру переміщаються повільніше, внаслідок більшого опору тертя і меншою ефективності проходження через пори гелю.

Так як основна частина потужності, що виробляється в процесі електрофорезу, витрачається у вигляді тепла, можуть виникати такі небажані ефекти:

1. збільшена швидкість дифузії іонів досліджуваного зразка і буфера, що призводить до розширення зони розділяється зразка
2. освіту конвекційних струмів, що призводить до перемішування розділених зразків
3. термічна нестабільність зразків, які більш чутливі до нагрівання, наприклад, може виклікатися денатурація ДНК.

2.3.1 Компоненти електрофорезу в агарозному гелі

Агароза, природний колоїд, який виділяють з морських водоростей, є лінійним полісахаридом, утвореним повторюваним елементом - агаробіозою, яка в свою чергу складається з чергуються елементів: галактози і 3,6 - ангідрогалактози. Агароза дуже крихка, і легко руйнується при маніпулюванні. Агарозні гелі мають «пори» великого розміру і використовується переважно для поділу великих молекул з молекулярною масою більшою, ніж 200 кДа.

Поділ в агарозних гелях відбувається швидко, але з обмеженим дозволом, так як смуги, що утворюються в агарозник гелях, мають тенденцію розмиватися, дифундувати і поширюватися в сторони. Агарозній гель отримують суспендуванням сухого порошку агарози у водному буфері, і кип'ятінням суміші до того моменту, коли агароза розплавиться і утворює прозорий розчин. Потім розчин наливають на підкладку і дають охолонути до кімнатної температури, щоб сформувався міцний гель. При застиганні агароза формує матрикс, щільність якого визначається концентрацією.

2.3.2 Буфер для електрофорезу

Перед тим як виконувати завершальну фазу аналізу необхідно також зробити електродний буфер.

Таблиця 2.4.

Електродний буфер (10X TBE) на 1л

Назва реактиву	Кількість
трис(гідроксиметил)амінометан($(HOCH_2)_3CNH_2$	108 г
H_3BO_3	55 г
0.5М розчин ЕДТА	40 мл
Дистильована вода	800 мл

1) Зважуємо 108 г трис(гідроксиметил)амінометану ((HOCH2)3CNH2) та 55 г борної кислоти H3BO3;

2) Додаємо 40 мл 0.5М розчину ЕДТА, pH 8.0;

3) Доливаємо приблизно 800 мл дистильованої води;

4) Витримуємо при постійному помішуванні до повного розчинення компонентів буферу;

5) Переливаємо в пікнометр на 1000 мл, доводимо до мітки дистильованою водою та фільтруємо.

На електрофоретичну рухливість ДНК впливають склад і іонна сила буфера для електрофорезу. У відсутності іонів, електропровідність мінімальна, і переміщення ДНК відбувається повільно, якщо взагалі відбувається. У буфері з високою іонною силою електропровідність дуже ефективна, і утворюється значна кількість тепла. У гіршому випадку, гель розплавляється і ДНК денатурує.

Існує кілька буферів для електрофорезу нативної дволанцюгової ДНК. Вони містять EDTA (pH 8.0) і Tris-ацетат (TAE), Tris-борат (TBE), або Tris-фосфат (TPE) в концентрації приблизно 50 мМ (pH 7.5 - 7.8). Буфери для електрофорезу зазвичай готують у вигляді концентрованих розчинів і зберігають при кімнатній температурі. Буфер TBE спочатку використовували для електрофорезу в агарозному гелі при робочій силі буфера 1x (одноразовий). Однак, виявилося, що робочий розчин 0.5x забезпечує більш ніж достатню

ємність буфера, і в даний час майже завжди електрофорез в агарозному гелі проводять з використанням цієї концентрації буфера.

В нашому дослідженні ми використовували 100-Lender в якості маркера молекулярних мас. Маркери довжин ДНК 100 п.н. призначені для визначення молекулярної ваги фрагментів дволандюгової ДНК завдовжки від 100 до 1500 п.н. Маркер приготований на основі плазміди, що містить повторні послідовності ДНК по 100 п.н. і складається з 15 фрагментів з тупими кінцями довжиною від 100 до 1500 п.н. з інтервалами в 100 п.н., та одного додаткового фрагмента довжиною 2072 п.н. Такий маркер ідеально підходить для визначення розмірів продуктів ПЛР.

Концентрація агарози

Фрагмент ДНК заданого розміру переміщається в гелі на різні відстані в залежності від концентрації агарози. При відповідних концентраціях агарози і / або буфера можливо розділити сегменти ДНК, що містять від 20 до 50000 н.п. (Нуклеотидних пар).

У горизонтальних гелях агароза зазвичай використовується в концентрації від 0.7% до 3%

Таблиця 2.5

Рекомендована концентрація агарозного гелю для поділу лінійних молекул ДНК

Концентрація агарози	Діапазон розмірів ДНК
0,75	10000-15000
1,00	500-10000
1,25	300-5000
1,50	200-4000
2,00	100-2500
2,50	50-1000

Приготування 2% агарозного гелю:

1) Зважити 2 г сухої агарози;
2) Відібрати 100 мл 1X TBE буферу;
3) Залити агарозу 1X TBE буфером у мірній колбі;
4) Мірну колбу поставити в мікрохвильову піч для повного розчинення агарози;
5) Витримати при кімнатній температурі близько 5-ти хвилин;
6) Додати 10 мкл. 1 % розчину бромистого етидію та перемішуємо мірну колбу;
7) Залити в попередньо зібрану форму з гребінкою для формування лунок
8) Витримуємо при кімнатній температурі до повної полімеризації гелю (до пів години).

Маркерна ДНК

При заданій напрузі, концентрації агарозного гелю і буфера, відстань переміщення залежить від молекулярного ваги вихідного матеріалу. Тому, маркерна ДНК відомого розміру повинна наноситися на доріжки і з лівого, і з правого краю гелю. Маркер зазвичай містить певний набір відомих сегментів ДНК. В якості маркера довжин використовувався 100-Lenderз ціною поділки 100 пар нуклеотидів.

Візуалізація результатів проводилася за допомогою система для гель-документації VISION Gel

НУБіП України

Рис. 2.6 Прилад для візуалізації результатів електрофорезу VISION Gel

2.4 Характеристика молекулярних маркерів, що були використані в роботі

2.4.1 Сайти з відомою послідовністю (STS)

На відміну від ПЛР с довільними праймерами, технологія STS покладається на певну ступінь знань про послідовність матричної ДНК. Така ПЛР-методика використовує унікальні сиквенс-специфічні праймери і визначає відмінності у алелях геномної ДНК. STS-маркери ко-домінантні, що дозволяє виявляти гетерозиготи та гомозиготи [54]. Вони також легко відтворювані по причині використання праймерів с довгими послідовностями и суворого критерія реакції. Використання STS-ПЛР дозволяє швидко отримати данні при мінімальних кількостях ДНК. Всі основні STS-базовані методи використовують схожі основні протоколи. Однак вони мають такі особливості, як необхідність попередніх знань про послідовність ДНК в певних регіонах та часових та фінансових затрат для створення специфічної пари праймерів для кожного локуса.

2.4.2 SCAR маркери

Маркери ампліфікованої області, що характеризується послідовністю (SCAR), розроблені з розширеної послідовності праймера з випадково

ампліфікованою поліморфною ДНК (RAPD) із специфічною послідовністю приблизно з 20 азотистих основ. Порівняно з універсальними праймерами, специфічні праймери для особливих областей знижують чутливість результатів до умов реакції та роблять їх більш відтворюваними за рахунок збільшення специфічності

Для отримання локус специфічних маркерів і отримання потрібного фрагменту його екстрагують з гелю, клонують і секвенують. На основі отриманої нуклеотидної послідовності підбирають високоспецифічні праймери, які ампліфікують одиничний фрагмент з високим ступенем відтворюваності. Багато з них домінантні і можуть бути використані як унікальні маркери для паспортизації генотипів.[54].

2.4.3 Коротка характеристика особливостей Ry генів картоплі

Рівень екстремальної резистентності (ЕР) однаковий серед генів Ry, а стійкість контролюється одним домінантним алелем. Немає різниці в рівні резистентності на рівнях симплексу та квадриплексу для алеля Ry. Таким чином, генотип Rygygygy у тетраплоїді має той самий рівень стійкості, що і генотип RyRyRyRy. Крім того, гени Ry не мають адитивного ефекту за рахунок накопичення різних локусів Ry[55]. Додаткова інформація про маркери, що були використані в роботі наведена у таблицях 2.6, 2.7, 2.8.

НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України

Таблиця 2.6.

Інформація про маркери, що використовувались у роботі

Назва гену/локусу	Тип	Хромосома	Стійкість	Маркер	Довжина фрагментів	Посилання
Ry_{adg}	SCAR	XI	PVY	RYSC3 (dominant)	321	Kasai et al., 2000
Ry_{chc}	STS	VII	PVY^{o}	$Ry_{o}186$ (dominant)	587	Mori et al., 2011
H1	SCAR	V	G. rostochiensis	TG 689 (dominant)	141	Brodie et al., 1999; Бирюкова и др., 2008

НУБіП України

Таблиця 2.7.

Нуклеотидні послідовності маркерів

Ген/контроль*	Маркер (тип)	Нуклеотидна послідовність (5-3)	Розмір фрагменту
ДНК маркери стійкості до вірусу Y			
Ry_{adg}	RYSC3 (SCAR)	F: 5'-ATACACTCATCTAAATTTGATGG-'3	321
		R: 5'-AGGATATACGGCATTTTTCCGA-'3	
Ry_{chc}	Ry186 (STS)	F: 5'-TGGTAGGGATATTTTCCTTAGA-'3	587
		R: 5'-GCAAATCCTAGGTTATCAACTCA-'3	
ДНК маркери стійкості до Globodera rostochiensis			
H1	TG 689 (SCAR)	F: 5'-TAAAACTCTTGGTTATAGCCTAT-'3	141
		R: 5'-CAATAGAATGTGTTGTTTCACCAA-'3	
β-каротин*	BCH	F: 5'-CGTTTGGCGCTGCCGTAAGTT-'3	290
		R:5'-CATGACATAGTTTGAATTTTGAGTC-'3	

Таблиця 2.8.

Умови ПЛР реакції для використаних у дослідженні маркерів

Етапи ПЛР	BCH		TG-689 (H1)		Ry-186 (Ry_{chc})		Rych-3 (Ry_{adg})	
Кількість циклів	35		35		35		36	
	час	T	час	T	час	T	час	T
Початкова денатурація	12хв	95	12хв	95	10 хв	94	12 хв	95
Денатурація у циклі	20 с	94	20 с	94	30 с	94	45 с	94
Відпал у циклі	20с	55	20с	55	30 с	54	45с	60
Елонгація	30 с	72	30 с	72	1 хв	72	1хв	72
Фінальна елонгація	5 хв	72	5 хв	72	5хв	72	7хв	72

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1 Коротка характеристика вихідних умов досліду

Результати роботи в нашому дослідженні ми подаємо у вигляді результатів візуалізації електрофорезу та таблиць. Вибірка з 70 сортозразків, з довільної вибірки сортозразків Поліського дослідного відділення ІК НААН врожаю 2020р, що проходять випробування першого або другого років були поділені на 7 груп по 10 зразків. Для розуміння того, чи вдало виділена ДНК використовували маркер ВСН на В-каротин що давав фрагмент довжиною в 290 bp (Рис.3.1)

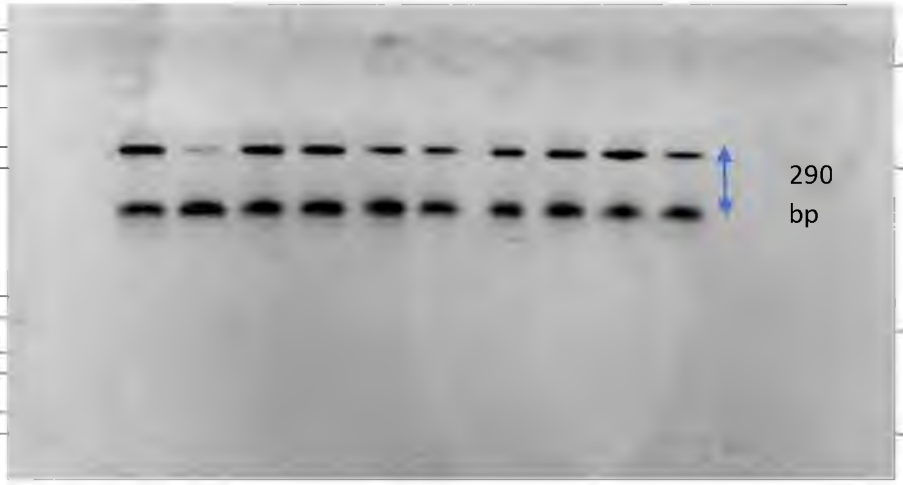


Рис. 3.1 Приклад візуалізації результатів електрофорезу за праймером ВСН зразків 1-17

3.2 Візуалізація ПЛР сортозразків картоплі з маркером TG-689

Протокол реакції наведений у Таблиці 2.8, дані про праймер TG-689 наведені в Таблиці 2.6. Результати візуалізації зразків подані на рисунках 3.1.1-3.1.7.

Результати візуалізації ПЛР реакцій з маркером TG-689 наведені в таблиці в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1.

Довільна вибірка сортозразків Поліського дослідного відділення ІК НААН врожаю 2020р, стійкість проти золотистої картопляної нематоди (1-й рік).

№	№ каталожний	Селекційний номер	Походження сорту	Забарвлення бульби	Фенотипова стійкість	Результат (маркери TG 689[141])

1	1	П.17.1-4	10.11-5/Аладін	Рожевий	слабостійкий	+
2	3	П.19.5/18	Ф.09.209-3/10.9-3	Жовтий	слабостійкий	+
3	4	П.17.8-2	14.36-10/14.4-3	Жовтий	нестійкий	+
4	8	П.17.8-45	14.36-10/14.4-3	Жовтий	нестійкий	+
5	11	П.17.9-5	14.13/1/12.21/2	Червоний	нестійкий	+
6	13	П.19.9/7	09.26/2/Альянс	Червоний	стійкий	+
7	14	П.19.9/17	09.26/2/Альянс	Рожевий	стійкий	+
8	15	П.17.12-3	13.18/1/Ф.11.12-8	Рожевий	стійкий	+
9	16	П.17.13/12	13.18/1/Ф.11.12-8	Жовтий	стійкий	+
10	17	П.17.14-4	12.13-14/Ф.11.12-8	Рожевий	слабостійкий	+
11	18	П.17.14-10	12.13-14/Ф.11.12-8	Сл.Рожевий	стійкий	+
12	20	П.19.15/19	Радомисль/Світлана	Жовтий	нестійкий	+
13	21	П.18.17/4	13.6-4/15.4/40	Жовтий	стійкий	+
14	22	П.17.8-3	Ф.11.8-8/Бажанна	Сл.Рожевий	стійкий	+
15	24	П.17.19-2	13.54-2/Взірець	Сл.Рожевий	слабостійкий	+
16	25	П.17.19/5	13.54-2/Взірець	Червоний	стійкий	+
17	29	П.17.19-26	13.54-2/Взірець	Жовтий	слабостійкий	+
18	31	П.17.20-13	Палац/Взірець	Сл.Рожевий	стійкий	+
19	32	П.17.20-30	Палац/Взірець	Жовтий	стійкий	+
20	33	П.19.22/2	12.14-8/13.56-2	Жовтий	слабостійкий	+
21	34	П.19.22/36	12.14-8/13.56-2	Червоний	стійкий	+
22	39	П.17.27-3	13.17-1/Взірець	Жовтий	стійкий	+
23	40	П.17.28-6	Лілея/Взірець	Жовтий	стійкий	+
24	42	П.17.29-3	Вектар/Взірець	Сл.Рожевий	стійкий	+
25	43	П.17.29-5	Вектар/Взірець	Жовтий	стійкий	+
26	44	П.17.29-7	Вектар/Взірець	Рожевий	стійкий	+
27	45	П.19.29/6	13.42/3/Соннедар	Рожевий	стійкий	+
28	49	П.17.33-3	Лель/Взірець	Жовтий	стійкий	+
29	50	П.18.33/1	15.13-20/Адрета	Жовтий	стійкий	+

30	51	П.18.33/7	15.13-20/Адрета	Рожевий	нестійкий	+
31	52	П.17.36-8	Батя/Взірець	Жовтий	стійкий	+
32	54	П.18.36/1	Маніфест/15.67-3	Жовтий	стійкий	+
33	55	П.17.38-1	Вектар/Радомисль	Сл.Рожевий	стійкий	+
34	59	П.17.38-11	Вектар/Радомисль	Червоний	стійкий	-
35	63	П.17.38-33	Вектар/Радомисль	Жовтий	стійкий	+
36	68	П.17.40-1	Янка/Вигода	Жовтий	слабостійкий	+
37	71	П.18.45/7	12.35-1/10.10/35	Сл.Рожевий	стійкий	+
38	72	П.17.51-2	00.31/26/Сантарка	Жовтий	стійкий	+
39	73	П.18.51/3	Н.08.197/105/Ред Конік	С. Фіолет.	стійкий	+
40	75	П.18.55/15	Радомисль/Беллароза	Сл.Рожевий	стійкий	+
41	76	П.18.56/7	Поран/Радинка	Рожевий	слабостійкий	+
42	78	П.18.61/7	Взірець/Талачинський	Жовтий	стійкий	+
43	79	П.18.65/8	Н.09236.с/1/Маг	Рожевий	нестійкий	+
44	82	П.18.69/2	Н.08.173/9/Фальварк	Сл.Рожевий	стійкий	+
45	84	П.18.74/1	15.23/1/Слаута	Жовтий	стійкий	+
46	85	П.18.75/8	Чарунка/Альянс	Жовтий	стійкий	+
47	87	П.18.75/23	Чарунка/Альянс	Рожевий	нестійкий	+
48	89	П.18.78/1	Лєтана/Фальварок	Жовтий	стійкий	+
49	91	П.18.87/2	F_1Б.9-10-11	Червоний	стійкий	+
50	96	Г.08.194/33	89.715с88/Тирас	Рожевий	стійкий	+
51	101	Г.08.197/48	91.285с5/Сантарка	Рожевий	стійкий	+
52	103	Г.10.3/11	87.791с4/Тирас	Жовтий	стійкий	+
53	104	Г.10.6/7	89.715с88/Тирас	Червоний	слабостійкий	+
54	115	П.17.1/13	10.11-5/Аладін	Жовтий	стійкий	+
55	117	П.16.2-9	10.42/7/Н.07.162-1	Червоний	слабостійкий	+
56	119	П.17.2/5	13.45-3/Аладін	Червоний	стійкий	+
57	120	П.17.3-1	Поран/Аладін	Червоний	стійкий	+
58	122	П.17.4/22	13.41-6/Аладін	Червоний	стійкий	+

59	123	П.17.5-1	13.51-13/14.36-13	Червоний	стійкий	+
60	124	П.17.8/18	10.36-10/14.4-3	Жовтий	стійкий	+
61	126	ВМ.12.9-8	Батя/Белларoза	С. Фіолет.	стійкий	+
62	127	П.17.12/16	13.18/1/Ф.11.12-8	Рожевий	стійкий	+
63	128	П.17.13/7	Ф.11.12-8/Бажана	Рожевий	стійкий	+
64	129	П.16.16-9	12.2-3/12/19-15	Жовтий	стійкий	+
65	132	П.17.13/9	Ф.11.8-8/Бажана	Рожевий	стійкий	+
66	134	П.17.18/13	Ф.11.8-8/Бажана	Жовтий	стійкий	-
67	135	П.17.19/1	13.54-2/Взірець	Жовтий	стійкий	+
68	141	П.16.20-4	09.26/2/08.102/4	Червоний	стійкий	-
69	142	П.16.21-8	09.26/2/09.62/1	Червоний	стійкий	+
70	143	П.17.21/36	12.48-22/Сонцедар	С. Фіолет.	стійкий	+

Виявлено ряд зразків у яких спостерігалася невідповідність між результатом молекулярного аналізу та досліджень на фенотипову стійкість. Причиною цьому можуть бути – зависокий або занизький ступінь зараження, супресія генів на алелі H1, хибнопозитивний аналіз.

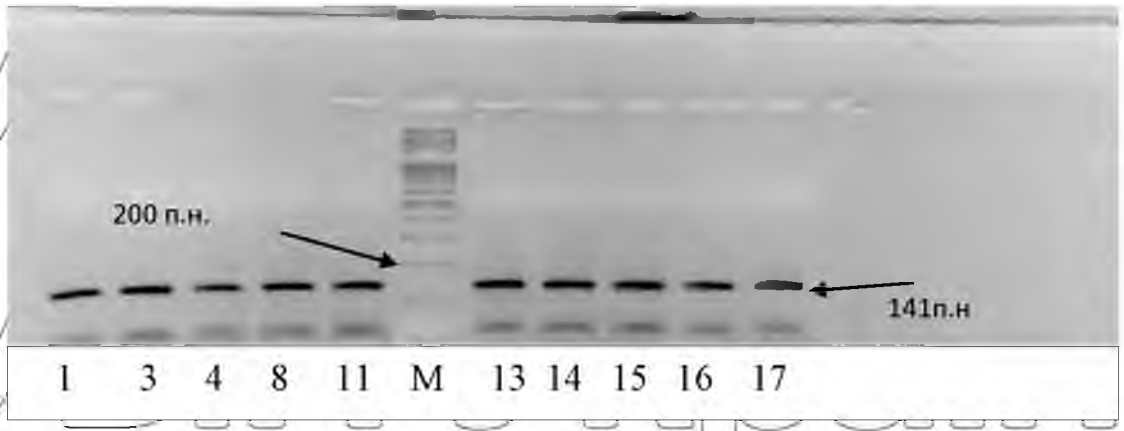


Рис. 3.1.1 Візуалізація електрофореграми зразків №1-17 з каталогу сортозразків Поліського дослідного відділення ІК (праймер TG-689): № 1 -(+); № 3-(+); № 4-(+); №8-(+); № 11-(+) № 13-(+); № 14-(+); № 15-(+); № 16-(+); № 17-(+)

Проявляли результати електрофорезу за допомогою приладу VISION Gel. Даний маркер показував дуже високі відсотки позитивних реакцій. Маркер молекулярних мас ціною поділки 100 п.н.

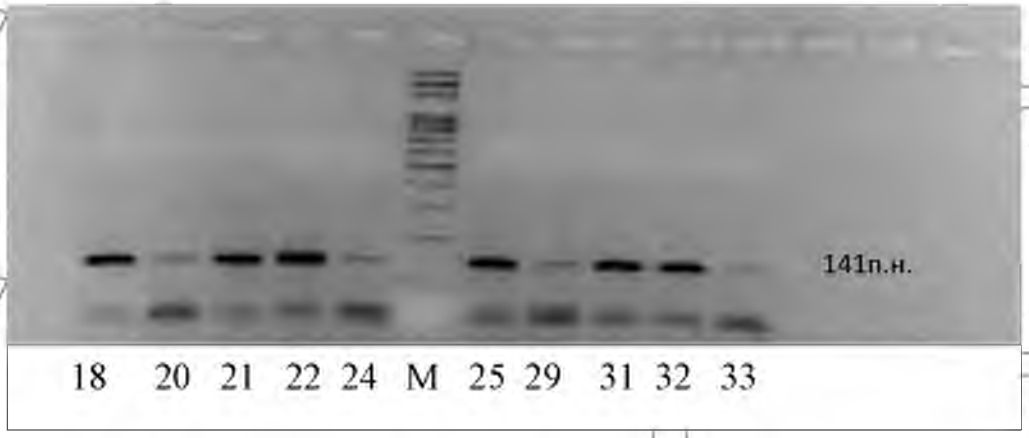


Рис. 3.1.2 Візуалізація електрофореграми зразків №18-33 з каталогу сортозразків Поліського дослідного відділення ІК (праймер TG-689)

№ 18 -(+); № 20-(+); № 21-(+); № 22-(+); № 24-(+) № 25-(+); № 29-(+); № 31-(+); № 32-(+); № 33-(+)

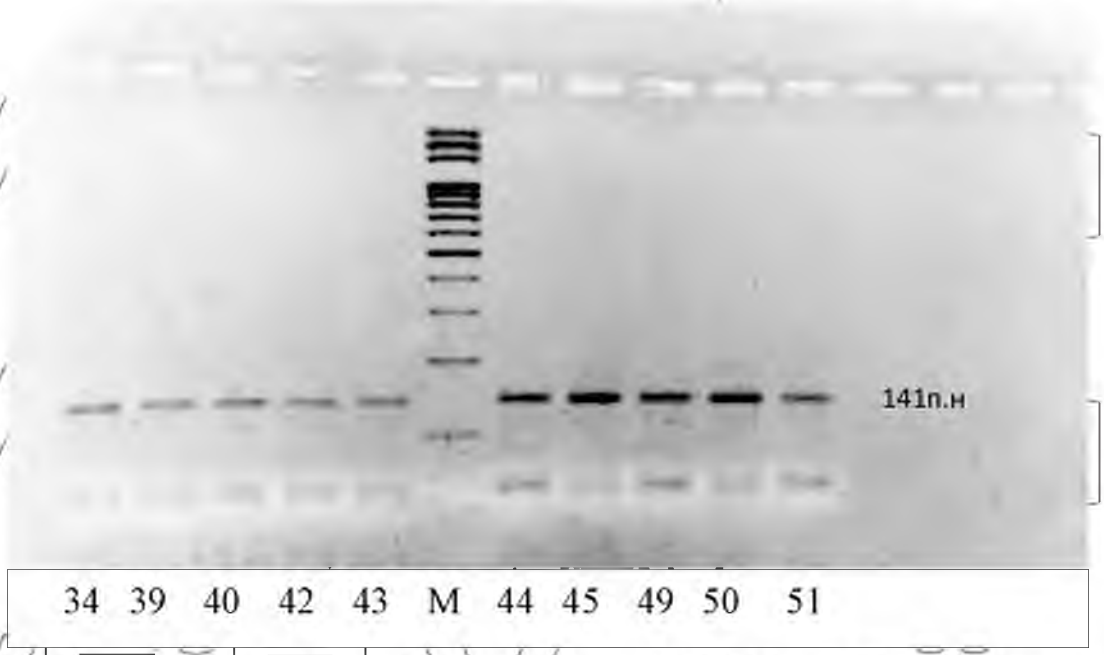


Рис. 3.1.3 Візуалізація електрофореграми зразків №34-51 з каталогу сортозразків Поліського дослідного відділення ІК (праймер TG-689)

№ 34 -(+); № 39-(+); № 40-(+); № 42-(+); № 43-(+) № 44-(+); № 45-(+); № 49-(+); № 50-(+); № 51-(+)

НУБіП України

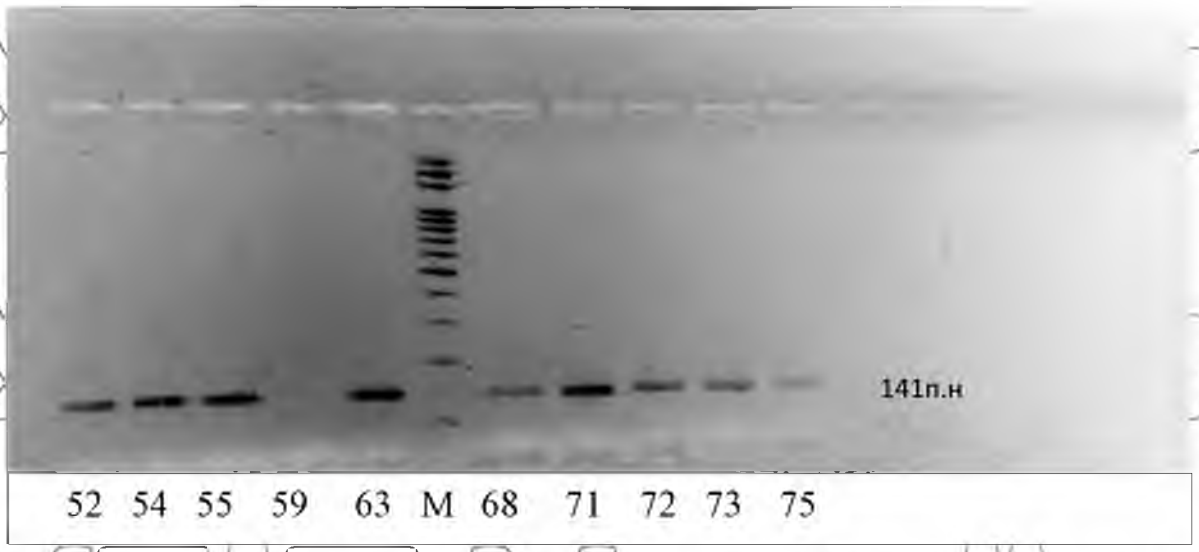


Рис. 3.1.4 Візуалізація електрофореграми зразків №52-75 з каталогу сортозразків Поліського дослідного відділення ІК (праймер TG-689)

№ 52 -(+); № 54-(+); № 55-(+); № 59-(-); № 63-(+) № 68-(+); № 45-(+); № 49-(+); № 50-(+); № 51-(+)

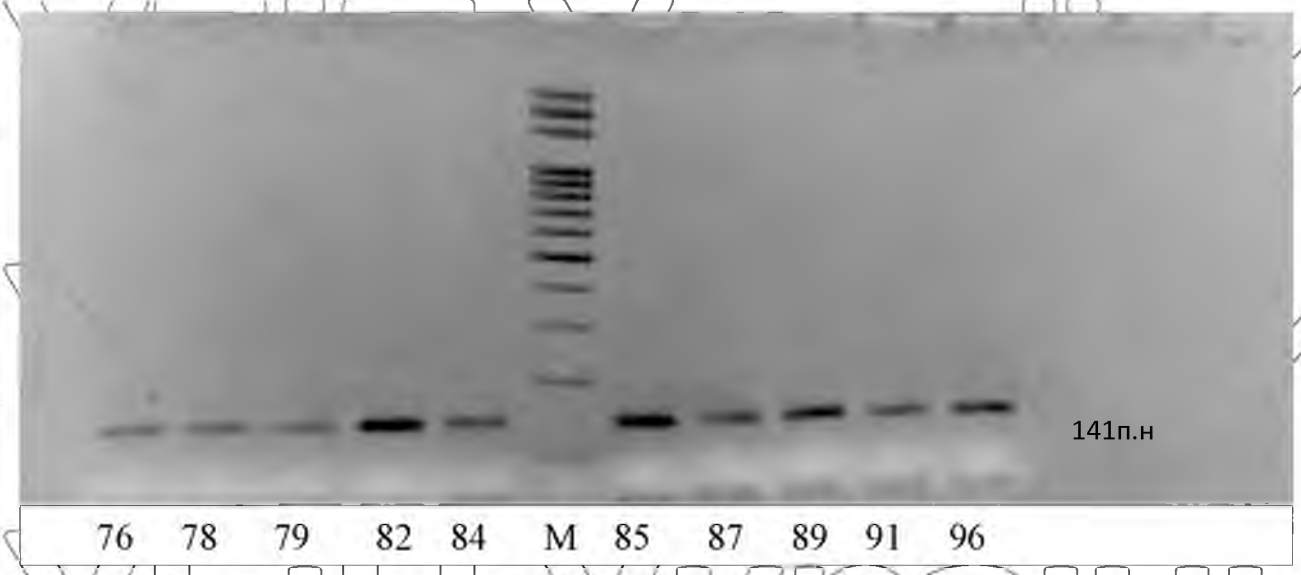


Рис. 3.1.5 Візуалізація електрофореграми зразків №76-96 з каталогу сортозразків Поліського дослідного відділення ІК (праймер TG-689)

№ 76 -(+); № 78-(+); № 79-(+); № 82-(+); № 84-(+) № 85-(+); № 87-(+); № 89-(+); № 91-(+); № 96-(+)

НУБіП України

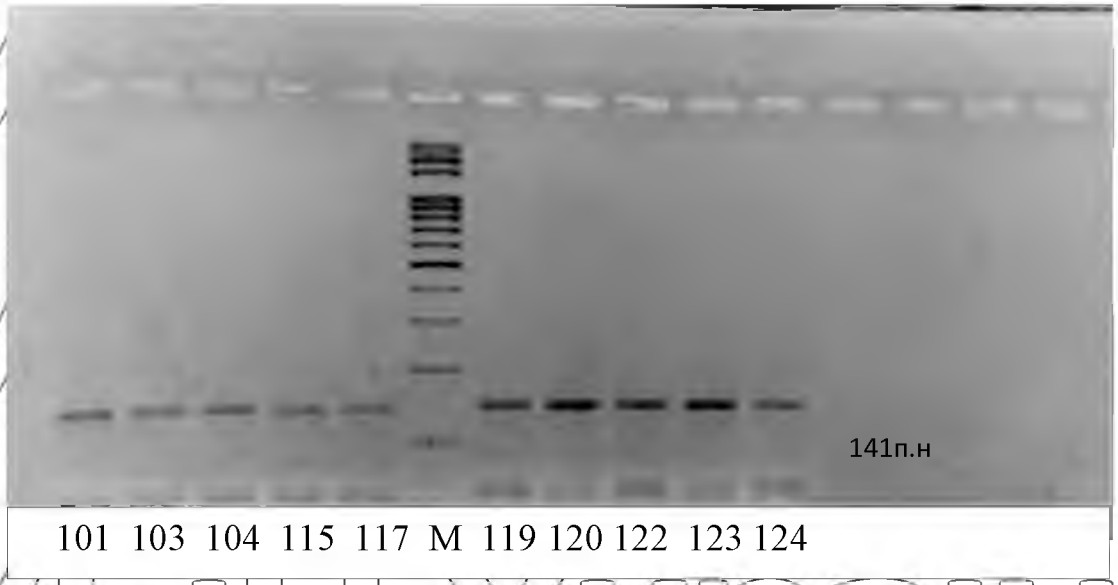


Рис. 3.1.6 Візуалізація електрофореграми зразків №101-124 з каталогу сортозразків Поліського дослідного відділення ІК (праймер TG-689)

№ 101 -(+); № 103-(+); № 104-(+); № 115-(+); № 117-(+) № 119-(+); № 120-(+); № 122-(+); № 123-(+); № 124-(+)

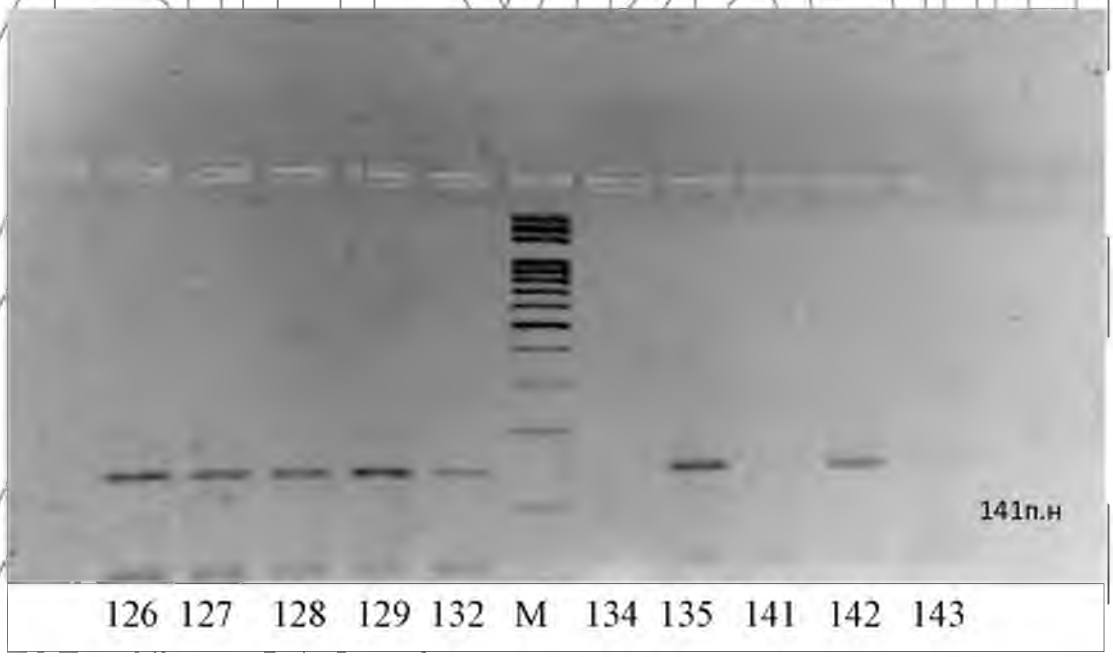


Рис 3.1.7 Візуалізація електрофореграми зразків №126-143 з каталогу сортозразків Поліського дослідного відділення ІК (праймер TG-689)

№ 126 -(+); № 127-(+); № 128-(+); № 129-(+); № 132-(+) № 134-(+); № 135-(+); № 141-(-); № 142-(+); № 143-(+)

Ймовірною причиною присутності маркерних фрагментів, ампліфікованого з використаними праймерами, в уражених нематодою зразків картоплі може бути складна структура локусу H1, для якого характерна багатокопійність фрагментів гомологів інших R-генів або генів, що кодують структурний білок у складі клітинної стінки рослин.[58]

3.3. Візуалізація ПЛР сортозразків картоплі з маркером Ry_o-186

Результати дослідження наявності молекулярної стійкості наведені у Таблиці 3.2. Інформація про маркер знаходиться у таблицях 2.6, 2.7, 2.8. результати візуалізації приведені на рисунках 3.2.1 – 3.2.7.

Таблиця 3.2

Довільна вибірка сортозразків Поліського дослідного відділення ІК НААН врожаю 2020р, стійкість проти потівіруеу Y картоплі(1-й рік)

№	№ каталожний	Селекційний номер	Походження сорту	Забарвлення бульби	Результат (Ry_o-186^{587})
1	1	П.17.1-4	10.11-5/Аладін	Рожевий	+
2	3	П.19.5/18	Ф.09.209-3/10.9-3	Жовтий	+
3	4	П.17.8-2	14.36-10/14.4-3	Жовтий	+
4	8	П.17.8-45	14.36-10/14.4-3	Жовтий	+
5	11	П.17.9-5	14.13/1/12.21/2	Червоний	+
6	13	П.19.9/7	09.26/2/Альянс	Червоний	+
7	14	П.19.9/17	09.26/2/Альянс	Рожевий	+
8	15	П.17.12-3	13.18/1/Ф.11.12-8	Рожевий	+
9	16	П.17.13/12	13.18/1/Ф.11.12-8	Жовтий	+
10	17	П.17.14-4	12.13-14/Ф.11.12-8	Рожевий	+
11	18	П.17.14-10	12.13-14/Ф.11.12-8	Сл.Рожевий	+
12	20	П.19.15/19	Радомисль/Світлана	Жовтий	+

13	21	П.18.17/4	13.6-4/15.4/40	Жовтий	-
14	22	П.17.8-3	Ф.11.8-8/Бажана	Сл.Рожевий	+
15	24	П.17.19-2	13.54-2/Взірець	Сл.Рожевий	-
16	25	П.17.19/5	13.54-2/Взірець	Червоний	+
17	29	П.17.19-26	13.54-2/Взірець	Жовтий	+
18	31	П.17.20-13	Палац/Взірець	Сл.Рожевий	+
19	32	П.17.20-30	Палац/Взірець	Жовтий	+
20	33	П.19.22/2	12.14-8/13.56-2	Жовтий	+
21	34	П.19.22/36	12.14-8/13.56-2	Червоний	+
22	39	П.17.27-3	13.17-1/Взірець	Жовтий	+
23	40	П.17.28-6	Лілея/Взірець	Жовтий	+
24	42	П.17.29-3	Вектар/Взірець	Сл.Рожевий	+
25	43	П.17.29-5	Вектар/Взірець	Жовтий	+
26	44	П.17.29-7	Вектар/Взірець	Рожевий	+
27	45	П.19.29/6	13.42/3/Сонцедар	Рожевий	+
28	49	П.17.33-3	Лель/Взірець	Жовтий	+
29	50	П.18.33/1	15.13-20/Адрета	Жовтий	-
30	51	П.18.33/7	15.13-20/Адрета	Рожевий	-
31	52	П.17.36-8	Батя/Взірець	Жовтий	+
32	54	П.18.36/1	Маніфест/15.67-3	Жовтий	-
33	55	П.17.38-1	Вектар/Радомисль	Сл.Рожевий	+
34	59	П.17.38-11	Вектар/Радомисль	Червоний	+
35	63	П.17.38-33	Вектар/Радомисль	Жовтий	+
36	68	П.17.40-1	Янка/Вигода	Жовтий	+
37	71	П.18.45/7	12.35-1/10.10/35	Сл.Рожевий	+
38	72	П.17.51-2	00.31/26/Сантарка	Жовтий	+

НУБіП України

39	73	П.18.51/3	Н.08.197/105/Ред Конік	С. Фіолет.	+
40	75	П.18.55/15	Радомисль/Беллароза	Сл.Рожевий	+
41	76	П.18.56/7	Поран/Радинка	Рожевий	-
42	78	П.18.61/7	Візірець/Талачинський	Жовтий	-
43	79	П.18.65/8	Н.09236.с/1/Мат	Рожевий	-
44	82	Н.18.69/2	Н.08.173/9/Фальварк	Сл.Рожевий	-
45	84	П.18.74/1	15.23/1/Слаута	Жовтий	-
46	85	П.18.75/8	Чарунка/Альянс	Жовтий	+
47	87	П.18.75/23	Чарунка Альянс	Рожевий	-
48	89	Н.18.78/1	Летана/Фальварок	Жовтий	+
49	91	П.18.87/2	F_1Б.9-10-11	Червоний	+
50	96	Г.08.194/33	89.715с88/Тирас	Рожевий	-
51	101	Г.08.197/48	91.285с5/Сантарка	Рожевий	+
52	103	Г.10.3/11	87.791с4/Тирас	Жовтий	+
53	104	Г.10.6/7	89.715с88/Тирас	Червоний	+
54	115	П.17.1/13	10.11-5/Аладін	Жовтий	+
55	117	П.16.2-9	10.42/7/Н.07.162-1	Червоний	-
56	119	П.17.2/5	13.45-3/Аладін	Червоний	-
57	120	П.17.3-1	Поран/Аладін	Червоний	+
58	122	Н.17.4/22	13.41-6/Аладін	Червоний	+
59	123	П.17.5-1	13.51-13/14.36-13	Червоний	-
60	124	П.17.8/18	10.36-10/14.4-3	Жовтий	+
61	126	ВМ.12.9-8	Батя/Беллароза	С. Фіолет.	-
62	127	П.17.12/16	13.18/1/Ф.11.12-8	Рожевий	+
63	128	П.17.13/7	Ф.11.12-8 Бажана	Рожевий	+
64	129	П.16.16-9	12.2-3/12/19-15	Жовтий	+

65	132	П.17.18/9	Ф.11.8-8/Бажана	Рожевий	-
66	134	П.17.18/13	Ф.11.8-8/Бажана	Жовтий	-
67	135	П.17.19/1	13.54-2/Взірець	Жовтий	+
68	141	П.16.20-4	09.26/2/08.102/4	Червоний	+
69	142	П.16.21-8	09.26/2/09.62/1	Червоний	+
70	143	П.17.21/36	12.48-22/Сонцедар	С. Фіолет.	+

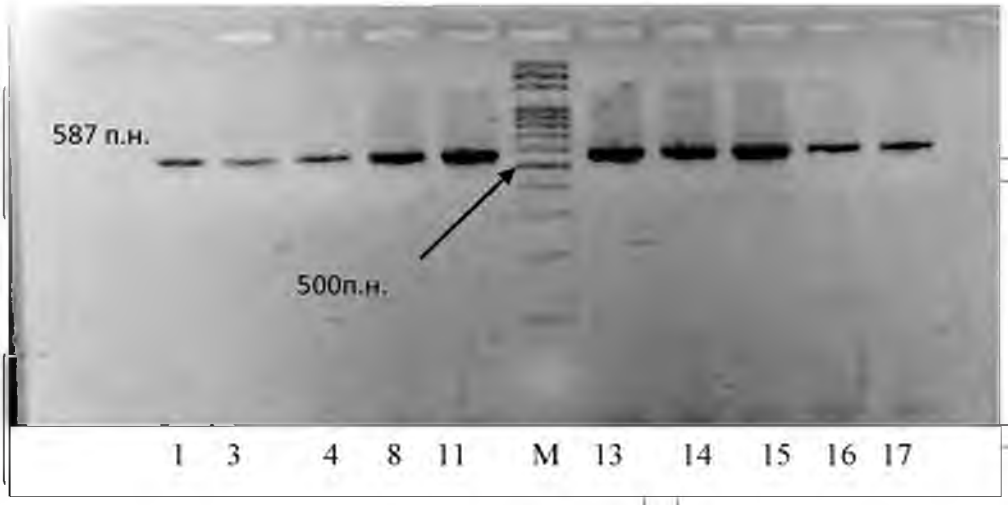


Рис 3.2.1 Візуалізація електрофореграми зразків №1-17 з каталогу сортозразків Поліського дослідного відділення ІК (маркер Ry_o-186)

№ 1 -(+); № 3-(+); № 4-(+); № 8-(+); № 11-(+) № 13-(+); № 14-(+); № 15-(+) № 16-(+); № 17-(+)

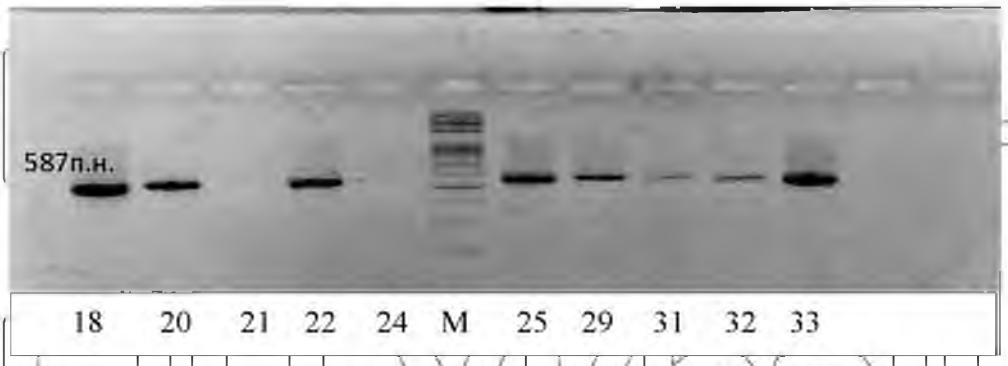


Рис 3.2.2 Візуалізація електрофореграми зразків №18-33 з каталогу сортозразків Поліського дослідного відділення ІК (маркер Ry_o-186)

№ 18 -(+); № 20-(+); № 21-(-); № 22-(+); № 24-(-) № 25-(+); № 29-(+); № 31-(+); № 32-(+); № 33-(+)

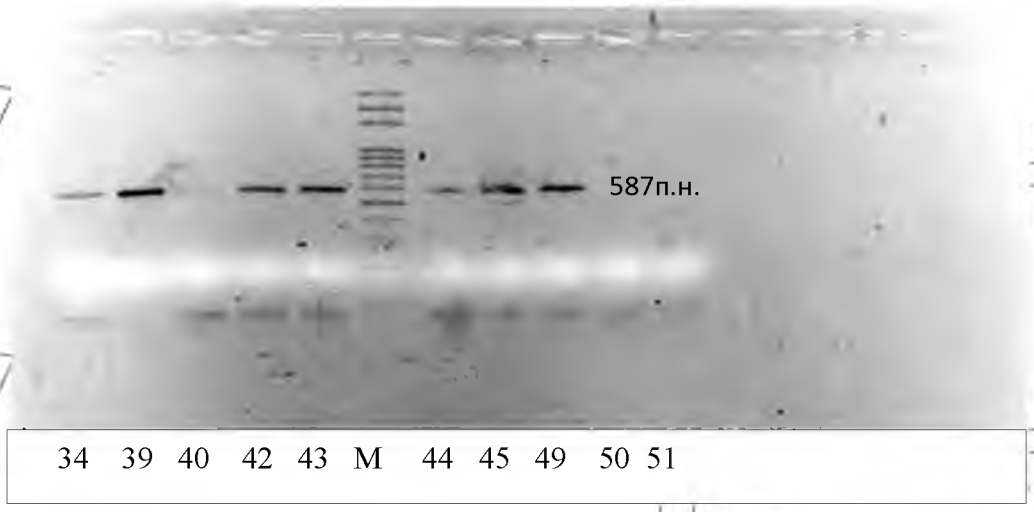


Рис 3.2.3 Візуалізація електрофореграми зразків №34-51 з каталогу сортозразків Поліського дослідного відділення ІК (маркер Ry_o-186)

№ 34 -(+); № 39-(+); № 40-(+); № 42-(+); № 43-(+) № 44-(+); № 45-(+); № 49-(+); № 50-(-); № 51-(-)

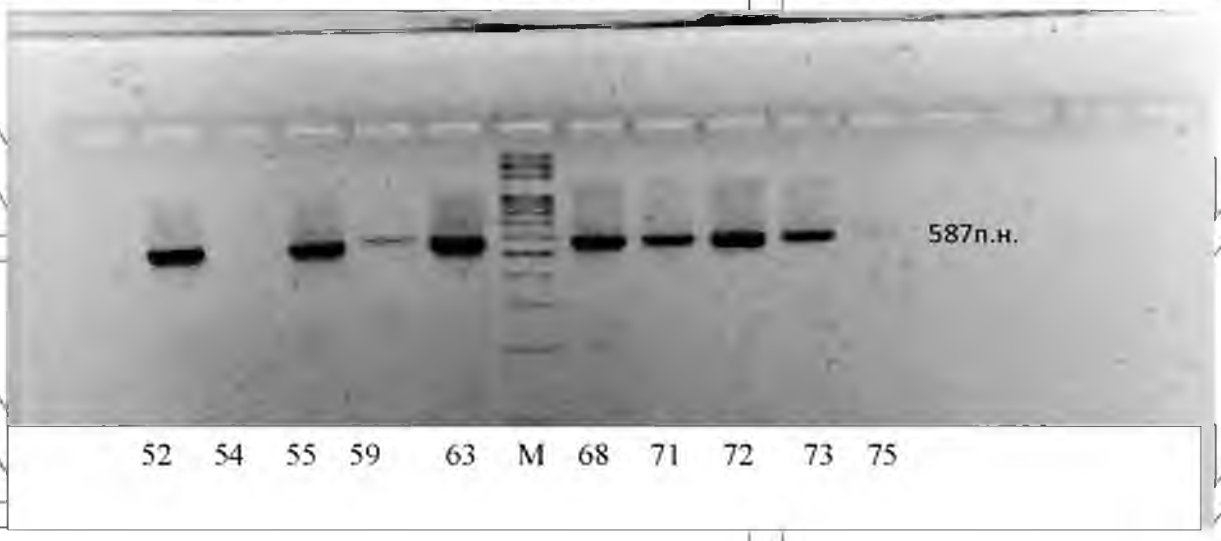


Рис 3.2.4 Візуалізація електрофореграми зразків №52-75 з каталогу сортозразків Поліського дослідного відділення ІК (маркерRy_o-186)

№ 52 -(+); № 54-(-); № 55-(+); № 59-(+); № 63-(+) № 68-(+); № 71-(+); № 72-(+); № 73-(+); № 75-(+)

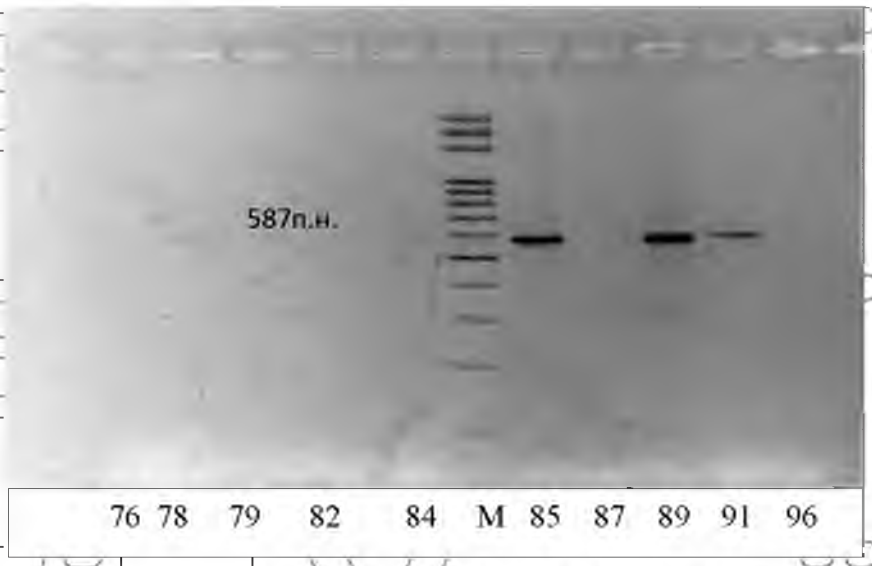


Рис 3.2.5 Візуалізація електрофореграми зразків №76-96 з каталогу сортозразків Поліського дослідного відділення ІК (маркер Ry_o-186)

№ 76 -(-); № 78-(-); № 79-(-); № 82-(-); № 84-(-) № 85-(+); № 87-(-); № 89-(+); № 91-(+); № 96-(-)

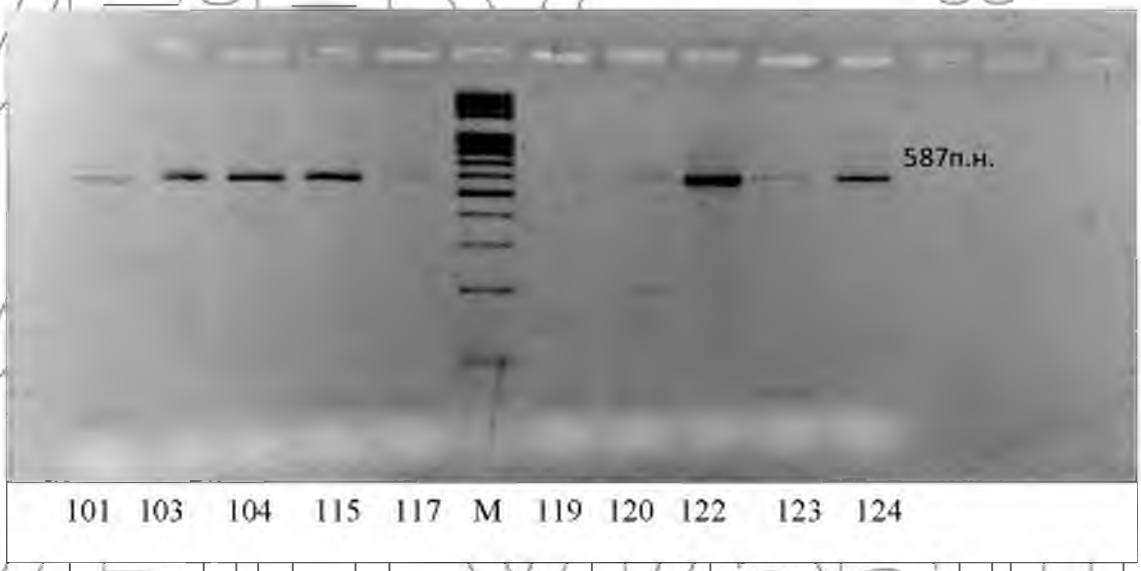


Рис 3.2.6 Візуалізація електрофореграми зразків №101-124 з каталогу сортозразків Поліського дослідного відділення ІК (маркер Ry_o-186)

№ 101 -(+); № 103-(+); № 104-(+); № 115-(+); № 117-(+) № 119-(-); № 120-(+); № 122-(+); № 123-(+); № 124-(+)

НУБіП України

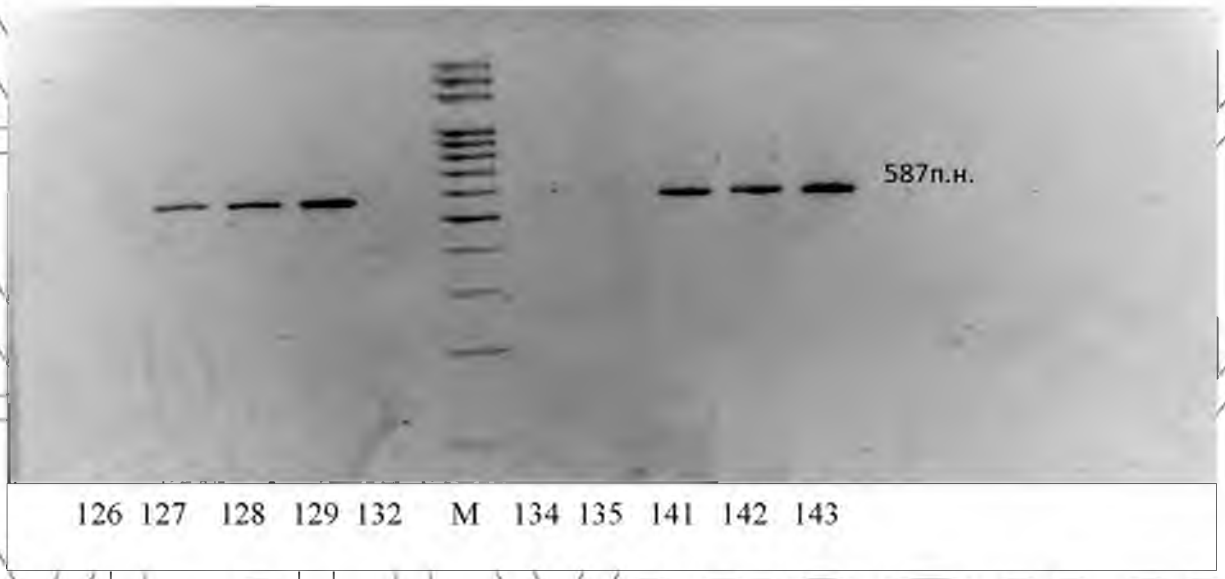


Рис 3.2.7 Візуалізація електрофореграми зразків №126-143 з каталогу сортозразків Поліського дослідного відділення ІК (маркер Ry_o-186)

№ 126 -(-); № 127-(+); № 128-(+); № 129-(+); № 132-(-) № 134-(-); № 135-(+); № 141-(-); № 142-(+); № 143-(+)

3.4. Візуалізація ПЛР сортозразків картоплі з маркером Rych-3

Результати дослідження наявності молекулярної стійкості наведені у Таблиці 3.3. Інформація про маркер знаходиться у Таблиці 2.6, 2.7, 2.8. Результати візуалізації ПЛР-реакцій показані на малюнках 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3;

Таблиця 3.3

Довільна вибірка сортозразків Поліського дослідного відділення ІК НААН врожаю 2020р, стійкість проти потівірусу У картоплі(1-й рік)

№	№ каталожний	Селекційний номер	Походження сорту	Забарвлення бульби	Результат (Rych-3)
1	1	П.17.1-4	10.11-5/Аладін	Рожевий	-
2	3	П.19.5/18	Ф.09.209-3/10.9-3	Жовтий	-
3	4	П.17.8-2	14.36-10/14.4-3	Жовтий	-
4	8	П.17.8-45	14.36-10/14.4-3	Жовтий	-
5	11	П.17.9-5	14.13/1/12.21/2	Червоний	-
6	13	П.19.9/7	09.26/2/Альянс	Червоний	-
7	14	П.19.9/17	09.26/2/Альянс	Рожевий	-
8	15	П.17.12-3	13.18/1/Ф.11.12-8	Рожевий	-
9	16	П.17.13/12	13.18/1/Ф.11.12-8	Жовтий	-
10	17	П.17.14-4	12.13-14/Ф.11.12-8	Рожевий	-

11	18	П.17.14-10	12.13-14/Ф.11.12-8	Сл.Рожевий	-
12	20	П.19.15/19	Радомисль/Світлана	Жовтий	-
13	21	П.18.17/4	13/6-4/15.4/40	Жовтий	-
14	22	П.17.8-3	Ф.11.8-8/Бажанна	Сл.Рожевий	-
15	24	П.17.19-2	13.54-2/Взірець	Сл.Рожевий	-
16	25	П.17.19/5	13.54-2/Взірець	Червоний	-
17	29	П.17.19-26	13.54-2/Взірець	Жовтий	-
18	31	П.17.20-13	Палац/Взірець	Сл.Рожевий	-
19	32	П.17.20-30	Палац/Взірець	Жовтий	-
20	33	П.19.22/2	12.14-8/13.56-2	Жовтий	-
21	34	П.19.22/36	12.14-8/13.56-2	Червоний	-
22	39	П.17.27-3	13.17-1/Взірець	Жовтий	-
23	40	П.17.28-6	Лілея/Взірець	Жовтий	-
24	42	П.17.29-3	Вектар/Взірець	Сл.Рожевий	-
25	43	П.17.29-5	Вектар/Взірець	Жовтий	-
26	44	П.17.29-7	Вектар/Взірець	Рожевий	-
27	45	П.19.29/6	13.42/3/Сонцедар	Рожевий	-
28	49	П.17.33-3	Лель/Взірець	Жовтий	-
29	50	П.18.33/1	15.13-20/Адрета	Жовтий	-
30	51	П.18.33/7	15/13-20/Адрета	Рожевий	-
31	52	П.17.36-8	Батя/Взірець	Жовтий	-
32	54	П.18.36/1	Маніфест/15.67-3	Жовтий	-
33	55	П.17.38-1	Вектар/Радомисль	Сл.Рожевий	-
34	59	П.17.38-11	Вектар/Радомисль	Червоний	-
35	63	П.17.38-33	Вектар/Радомисль	Жовтий	-
36	68	П.17.40-1	Янка/Вигода	Жовтий	-
37	71	П.18.45/7	12.35-1/10.10/35	Сл.Рожевий	-
38	72	П.17.51-2	00.31/26/Сантарка	Жовтий	-
39	73	П.18.51/3	Н.08.197/105/Ред Конік	С. Фіолет.	-
40	75	П.18.55/15	Радомисль/Беллароза	Сл.Рожевий	-
41	76	П.18.56/7	Поран/Радинна	Рожевий	-
42	78	П.18.61/7	Взірець/Талачинський	Жовтий	-
43	79	П.18.65/8	Н.09236.с/1/Маг	Рожевий	-
44	82	П.18.69/2	Н.08.173/9/Фальварк	Сл.Рожевий	-
45	84	П.18.74/1	15.23/1/Слаута	Жовтий	-
46	85	П.18.75/8	Чарунка/Альянс	Жовтий	-
47	87	П.18.75/23	Чарунка/Альянс	Рожевий	-
48	89	П.18.78/1	Летана/Фальварок	Жовтий	-
49	91	П.18.87/2	$Г_1$Б.9-10-11	Червоний	-

50	96	Г.08.194/33	89.715c88/Тирас	Рожевий	-
51	101	Г.08.197/48	91.285c5/Сантарка	Рожевий	-
52	103	Г.10.3/11	87.791c4/Тирас	Жовтий	+
53	104	Г.10.6/7	89.715c88/Тирас	Червоний	-
54	115	П.17.1/13	10.11-5/Аладін	Жовтий	-
55	117	П.16.2-9	10.42/7/Н.07.162-1	Червоний	-
56	119	П.17.2/5	13.45-3/Аладін	Червоний	+
57	120	П.17.3-1	Поран/Аладін	Червоний	-
58	122	П.17.4/22	13.41-6/Аладін	Червоний	-
59	123	П.17.5-1	13.51-13/14.36-13	Червоний	+
60	124	П.17.8/18	10.36-10/14.4-3	Жовтий	-
61	126	ВМ.12.9-8	Батя/Белларoза	С. Фіолет.	+
62	127	П.17.12/16	13.18/1/Ф.11.12-8	Рожевий	-
63	128	П.17.13/7	Ф.11.12-8/Бажана	Рожевий	-
64	129	П.16.16-9	12.2-3/12/19-15	Жовтий	-
65	132	П.17.18/9	Ф.11.8-8/Бажана	Рожевий	-
66	134	П.17.18/13	Ф.11.8-8/Бажана	Жовтий	-
67	135	П.17.19/1	13.54-2/Взірець	Жовтий	-
68	141	П.16.20-4	09.26/2/08.102/4	Червоний	-
69	142	П.16.21-8	09.26/2/09.62/1	Червоний	+
70	143	П.17.21/36	12.48-22/Сонцедар	С. Фіолет.	+

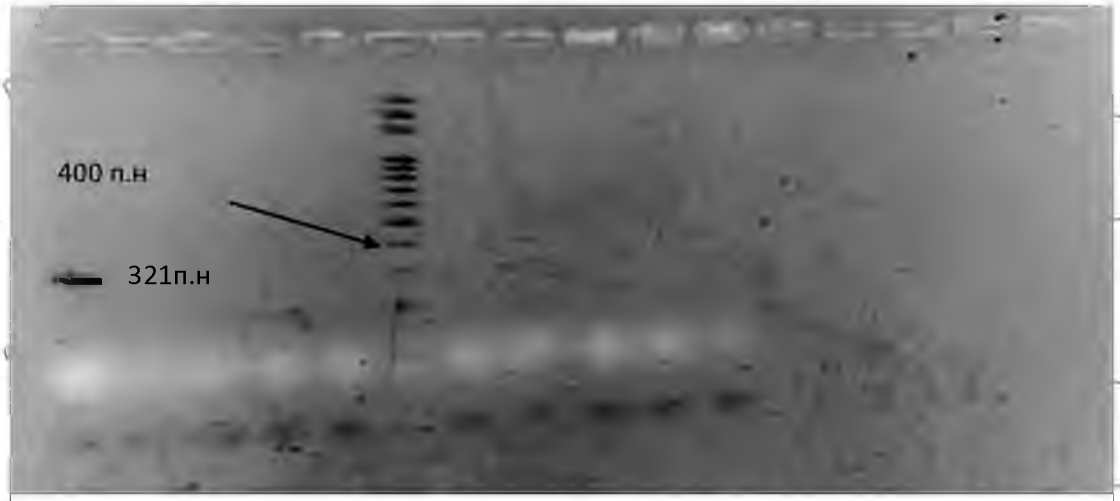
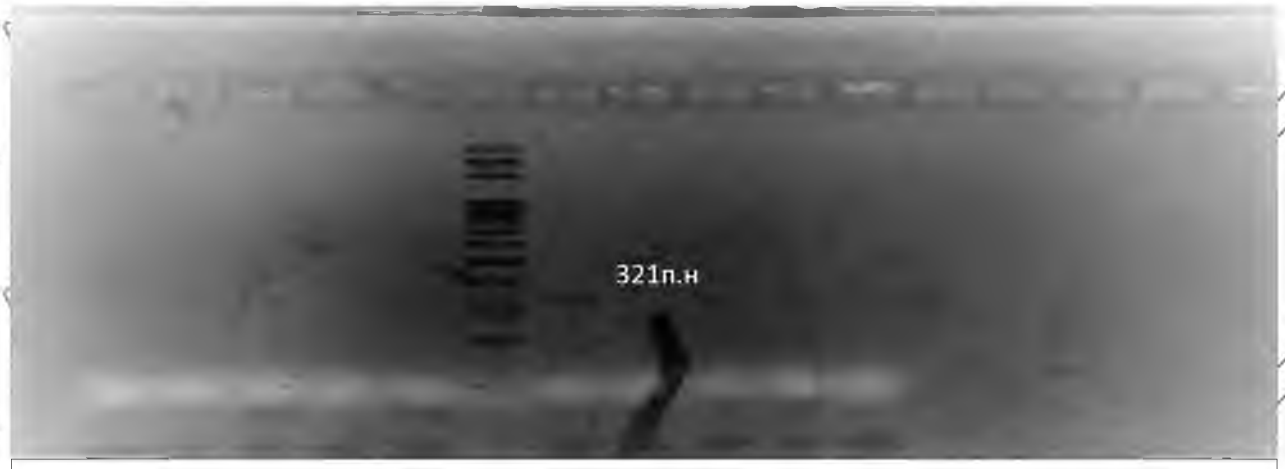


Рис 3.3.1 Візуалізація електрофореграми зразків №52-75 з каталогу сортозразків Поліського дослідного відділення ІК (маркер Rych-3)

№ 52 -(+); № 54-(-); № 55-(-); № 59-(-); № 63-(-) № 68-(-); № 71-(-); № 72-(-); № 73-(-); № 75-(-)

Перші 30 зразків не показали жодного позитивного результату. Перший зразок який показав результат під каталожним номером 52 (Рис 3.3.1.)



101 103 104 115 117 M 119 120 122 123 124

Рис 3.3.2 Візуалізація електрофореграми зразків №101-124 з каталогу сортозразків Поліського дослідного відділення ІК (маркер Rysh-3)

№ 101 -(-); № 103-(+); № 104-(-); № 115-(-); № 117-(-) № 119-(+); № 120-(-); № 122-(-); № 123-(+); № 124-(-)

На цьому зображенні було помічено три нечіткі зразки що дали явно позитивні результати. Причина різниці прояву може бути як суб'єктивна, тобто людський фактор, так і тетраплоїдність картоплі.

НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України

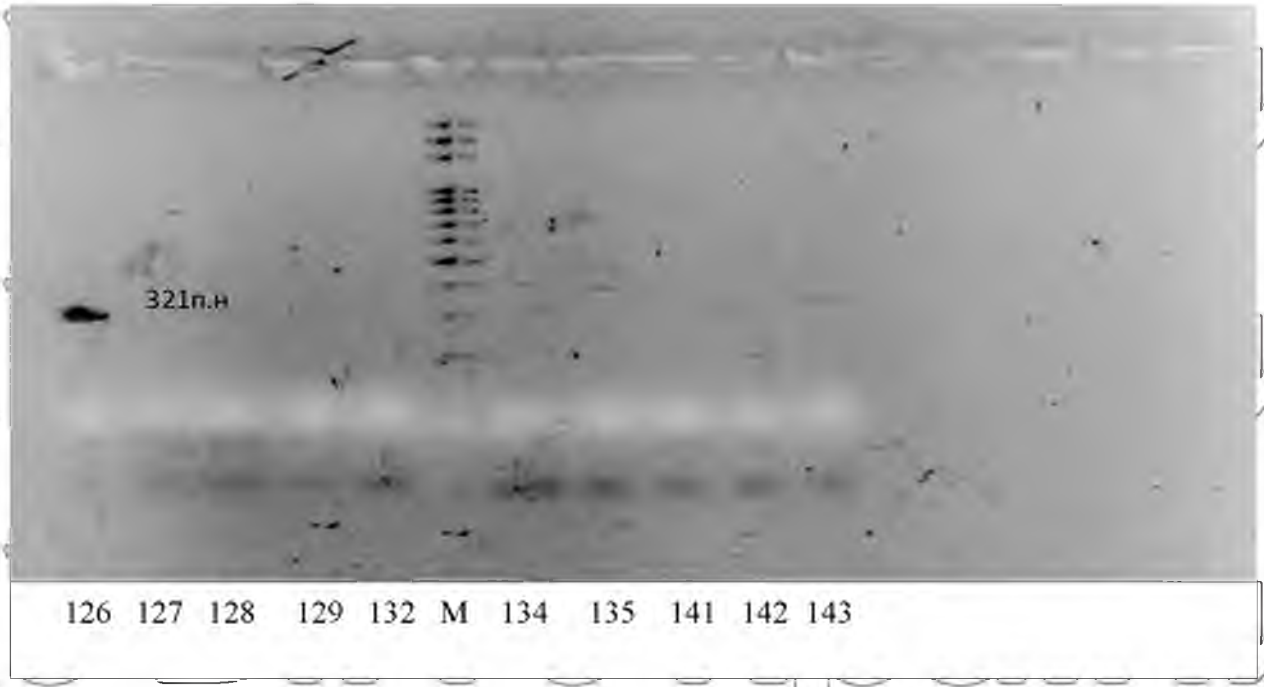


Рис 3.3.3 Візуалізація електрофореграми зразків №126-143 з каталогу сортозразків Поліського дослідного відділення ІК (маркер Rych-3)

№ 126 -(+); № 127-(-); № 128-(-); № 129-(-); № 132-(-) № 134-(+); № 135-(-); № 141-(-); № 142-(+); № 143-(-)

Низький відсоток позитивного прояву по цьому маркеру не корелює з більшістю досліджень, що були зроблені іншими дослідниками.

3.5.Обговорення результатів роботи та порівняння результатів з іншими дослідами

Згідно за нашими результатами молекулярного дослідження вибірки сортозразків на стійкість до золотистої нематоди було отримано 10 (14,28%) результатів, які не збігаються з дослідженнями фенотипової стійкості. 7 зразків вибірки (10%) показали хибнопозитивний результат, коли на візуалізації результатів ми побачили позитивну реакцію маркера на шуканий локус H1, але фенотипової стійкості не спостерігалося.

Було знайдено 3 зразки(4,28%) з негативним результатом, який показувала візуалізація електрофореграми, але зараження нематодами не було виявлено.

Через те, що маркер є домінантним, можемо лише припустити що інфекційний фон для цих зразків був недостатнім.

В таблицях 3.4, 3.5, 3.6. наведені відсоткові результати в порівнянні з нашими зразками. Частота зустрічання алелю H1 у наших сортозразках близька до результатів польських дослідників Renata Galek [48], та Milczarek D [56]. Думаю це можна пояснити подібністю і близкістю вихідних ліній сортів (загалом по країнах).

Також, у наших дослідженнях було досліджено частоту прояву гена Rychc (за маркером Ry-186) і гена маркера Ryadg (за геном Rych-3). Дані маркери хоч і вказують на стійкість до PVY а також обидва є Ry генами розміщені на різних хромосомах і природньо не мають між собою жодних кореляцій. Можна сказати що наші результати по маркеру Ry-186 схожі на результати Е. П. Шаніної[50], а результати по маркеру Rych-3 не корелюють з іншими дослідженнями. Так як повну стійкість до всіх штамів PVY можна забезпечити лише мінімум за трьома генами, я думаю, що необхідно впроваджувати сорти що мають ген Ryadg.

Слід також зазначити, що позитивна детекція маркером шуканого гену не дає гарантії того що дана стійкість збережеться в умовах дослідної теплиці або на полі. Справа в тому що даний аналіз вивчає наявність самого гену а не типу і якості самої стійкості, що може бути порушена, наприклад, дуже вираженим інфекційним фоном. Дослідження фенотипової стійкості до золотистої нематоди що проводилися для колекції сортозразків показали невеликий відсоток не співпадіння і суперечливих результатів, причиною яких можуть бути як супресія генів так і похибки дослідження.

НУБіП України

Таблиця 3.4

Порівняльна таблиця результатів тестування різних сортів і гібридів картоплі на стійкість до золотистої нематоди *(G.rostochiensis)*

Маркер	Стійкість	Ген	%	Дослідник/посилання
TG-689	Золотиста нематода Ro-1, Ro-4	H1	92	Шаніна, [50]
TG-689	Золотиста нематода Ro-1, Ro-4	H1	90	Карелов [49]
TG-689	Золотиста нематода Ro-1, Ro-4	H1	94	Renata Galek [48]
TG-689	Золотиста нематода Ro-1, Ro-4	H1	95,6	Miczarek D [56]
TG-689	Золотиста нематода Ro-1, Ro-4	H1	87,6	Антонова [40]
TG-689	Золотиста нематода Ro-1, Ro-4	H1	32,4	Сайнакова [35]
TG-689	Золотиста нематода Ro-1, Ro-4	H1	95,7	Результати дослідження

Таблиця 3.5

Порівняльна таблиця результатів тестування різних сортів і гібридів картоплі на стійкість до PVY (Ry-186)

Маркер	Стійкість	Ген	%	Дослідник/посилання
Ry-186	PVY	Rychc	81	Е. П. Шаніна [50]
Ry-186	PVY	Rychc	16	Elison, G.L [59]
Ry-186	PVY	Rychc	5	Бирюкова В.А. [60]
Ry-186	PVY	Rychc	75,72	Дані дослідження

НУБіП України

Таблиця 3.6

Порівняльна таблиця результатів тестування різних сортів і гібридів картоплі на стійкість до PVY (Rych-3)

Маркер	Стійкість	Ген	%	Дослідник/посилання
Rych-3	PVY	Ryadg	29~	Е. В. Рогозина [47]
Rych-3	PVY	Ryadg	41~	Brittney M [46]
Rych-3	PVY	Ryadg	22,5	Bonis Sagredo D. [43]
Rych-3	PVY	Ryadg	25	Elison, G.L[59]
Rych-3	PVY	Ryadg	25	Сайнакова[35]
Rych-3	PVY	Ryadg	10	Дані дослідження

НУБіП України

ВИСНОВКИ

Ця робота була націлена на вивчення сортозразків української селекції Поліського дослідного відділення ІК НААН першого та другого років випробування з точки зору їх стійкості до золотистої нематоди, *Globodera rostochiensis* та ординарної форми потівірусу картоплі Y (*Potivirus Y).* Обидва захворювання вважаються карантинними на території України, мають велику шкодочинність та здатні, у сприятливих для себе умовах, також у комплексах з іншими менш інвазійними захворюваннями або фітофагами знищувати понад 80% урожаю.

1) За результатами досліджень було встановлено високу частоту досліджуваного гена Ry_{chc} за маркером Ry-186 у сортозразків Поліського дослідного відділення ІК НААН – 75,72%. Наявність даного гена у ДНК зразках вказує на повну стійкість до ординарної форми *Potivirus Y.*
2) Стійкість по маркеру Rych-3 (ген Ry_{adg}) зустрічалася у близько 10% зразків, що не корелює з його частотою у інших дослідженнях. Це вказує на низьку частоту зустрічання стійкості до PVY за даним геном у досліджуваних сортозразках.
3) Маркер TG-689 на зустрічався у 95,7% зразків що є найбільшим результатом серед тих досліджень, що нам вдалося знайти. Це свідчить про високу стійкість сортів української селекції до золотистої нематоди (*Globodera rostochiensis)* .
4) Було отримано 10 (14,28%) результатів, які не збігаються з дослідженнями фенотипової стійкості. З них 7 зразків вибірки (10%) показали хибнопозитивний результат, на візуалізації результатів було встановлено позитивну реакцію маркера на шуканий локус H1 але фенотипової стійкості не спостерігалося. І 3 зразки(4,28%) з

негативним результатом, який показувала візуалізація електрофореграми, але зараження нематодами не було виявлено.

НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Атлас хвороб картоплі [навч. посібник.] / О. Є. Недвига, І. І. Мостовяк, О. О. Фоменко ; за ред. проф. О. Є. Недвиги. — Вінниця ; Умань: Едельвейс і К, 2014. — 335 с. : кольор. іл. — Бібліогр.: с. 322—330.
2. Картопля. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%BE%D0%BF%D0%BB%D1%8F#cite_note-Spooner_2005_14694-99-8
3. КАРТОПЛЯ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://buklib.net/books/30598/
4. Potato genetics, genomics, and applications / Kazuo Watanabe // Breeding Science 65, 2015: p. 53 – 68
5. Україна увійшла у ТОП-3 країн-виробників картоплі. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.ukrinform.ua/rubric-economy/3090497-ukraina-uvijsla-u-top3-krainvirobnikiv-kartopli.html
6. Ринок картоплі України — хто, де і скільки? [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://kurkul.com/spetsproekty/337-rinok-kartopli-ukrayini
7. Картопля: практична енциклопедія / П. С. Теслюк [та ін.] ; ред. П. С. Теслюк [та ін.] ; ТзОВ «Інститут насінництва картоплі». — Луцьк: Надстир'я, 2003.
8. https://svitroslyn.ua/upload/medialibrary/f50/f50e15b1ef047a4b6cfea5ae9104dd5a.jpg
9. Каталог сортів картоплі / [авт. та упоряд.: Теслюк П. С. та ін.] ; за ред. Теслюка П. С., Сидорчука В. І. — Луцьк: Надстир'я, 2011.
10. Картопля: історія, харчова та лікувальна цінність, сорти. Реферат. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://ru.osvita.ua/vnz/reports/biolog/26950/
11. Адаптивна здатність та урожайність насіннєвого матеріалу сортів картоплі різних груп стиглості в умовах Полісся України / Тимко Людмила // дис. на

зд. наук. ст. к. с-г. н. за спец. 06.01.05 – селекція і насінництво, сільськогосподарські науки, 2019, с. 161.

12. Тимко Л.В. Оцінка параметрів адаптивної здатності сортів картоплі в умовах правобережного Полісся України. Картоплярство України. 2017. № 1–2 (42–43). С.18–22.

13. Бондарчук А.А., Верменко Ю.Я., Фурдыга Н.Н., Тымко Л.В. Адаптивный потенциал сортов картофеля в условиях Правобережного Полесья Украины. Картофелеводство: Сб. науч. тр. Минск, 2018. Т.26. С. 22–30.

14. Шкодочинність карантинних організмів на картоплі. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://obivet.org.ua/novini/shkodochinnist-karantinnih-organizmiv-na-kartopli/

15. Fábia S.O. Lima, Mattos V.S., Silva E.S., Carvalho M.A.S., Teixeira R.A., Silva J.C., Correa V.R. Nematodes Affecting Potato and Sustainable Practices for their Management, Potato – from Incas to All Over the World, Mustafa Yildiz, IntechOpen (February 16th 2018).

16. Blacket M.J., Agarwal A.A., Wainer J., Triska M.D., Renton M., Edwards J. Molecular assessment of the introduction and spread of potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, in Victoria, Australia. Phytopathology. 2019;109: p. 659-669.

17. Потенциально опасные для отечественного картофелеводства карантинные виды и патотипы нематод: изменчивость популяций и генетика устойчивости картофеля / Н.В. Мироненко, Т.А. Гавриленко // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020; 24 (7): с. 705-721.

18. Хвороби картоплі. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.syngenta.ua/hvorobi-kartopli

19. Dandurand L.M., Zasada I.A., Wang X., Mimee B., De Jong W., Novy R., Whitworth J., Kuhl J.C. Current status of potato cyst nematodes in North America. Annu. Rev. Phytopathology. 2019; 25(57): p. 117-133.

20. Potato virus Y [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://en.wikipedia.org/wiki/Potato_virus_Y
21. https://agroflora.ru/wp-content/uploads/2014/08/Tobacco-rattle-virus.jpg
22. Lorenzen, J.H., Meacham, T., Berger, P.H., Shiel, P.J., Crosslin, J.M., Hamm, P.B. and Kopp, H. (2006). Whole genome characterization of Potato virus Y isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada. Arch. Virol., 151. p. 1055-1074.
23. Boonham, N., Walsh, K., Preston, S., North, J., Smith, P. and Barker, I. (2002). The detection of tuber necrotic isolates of Potato Virus Y, and the accurate discrimination of PVY^{O}, PVY^{N} and PVY^{C} strains using RT-PCR. J. Virol. Meth., 102: p. 103–112.
24. Crosslin, J., Hamm, P., Shiel, P., Hane, D., Brown, C. and Berger, P. (2005). Serological and Molecular Detection of Tobacco Veinal Necrosis Isolates of Potato Virus Y (PVY^{NY}) from Potatoes Grown in the Western United States. Amer. J. Pot. Res., 82. p. 263-269.
25. Інноваційні розробки із захисту картоплі в Україні / Л. Гаврилюк, М. Круть // International scientific journal «Grail of Science» | № 2-3 (April, 2021), с. 202-206.
26. Чайка, В.М., Неверовська, Т.М. & Бакланова, О.В. (2007). Теоретичні основи розробки прогнозу фітосанітарного стану сільськогосподарських культур. Захист і карантин рослин, (53), с. 453–461.
27. Хвороби картоплі. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://propozitsiya.com/ua/hvoroby-kartopli
28. Хімічний метод захисту рослин. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://agromage.com/stat_id.php?id=77#:~:text=%D0%A5%D1%96%D0%BC%D1%96%D1%87%D0%BD%D0%B8%D0%B9%20%D0%BC%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4%20%D0%B7%D0%B0%D1%85%D0%B8%D1%81%D1%82%D1%83%20%D1%80%D0%BE%D1%81%D0%BB%D0%B8

%D0%BD%20%D0%BF%D0%BE%D0%BB%D1%8F%D0%B3%D0%B0%D1%94.%D0%BE%D1%80%D0%B3%D0%B0%D0%BD%D1%96%D0%B7%D0%B0%D1%86%D1%96%D0%B2%20%D0%B0%D0%B1%D0%BE%20%D0%BF%D0%BE%D1%80%D1%83%D1%88%D1%83%D0%B2%D0%B0%D1%82%D0%B8%20%D1%97%D1%85%20%D1%80%D0%BE%D0%B7%D0%B2%D0%B8%D1%82%D0%BE%D0%BA

29. Timmermans B.G.H., Vos J., Stomph T.J., Van Nieuwburg J., Van der Putten P.E.L. Growth duration and root length density of *Solanum sisymbriifolium* (Lam.) as determinants of hatching of *Globodera pallida* (Stone). Ann. Appl. Biol. 2006; 148: p. 213-222.

30. Applications of biotechnology and genomics in potato improvement / Philippa J. Barrell, Sathiyamoorthy Meiyalaghan, Jeanne M.E. Jacobs and Anthony J. Conner // Plant Biotechnology Journal (2013) 11, pp. 907–920.

31. Молекулярные маркеры – инструмент исследования генетического разнообразия. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.fao.org/3/a1250r/a1250r17.pdf

32. Молоцький М. Я., Васильківський С. П., Князюк В. І., Власенко В. А. Селекція і насінництво сільськогосподарських рослин: Підручник. — К.: Вища освіта, 2006. — 463 с.

33. Генетичні основи селекції рослин і тварин : навч. посіб. для студ. біол. спец. вищ. навч. закл. / Л. І. Воробйова, О. В. Тагліна. - Х.: Ранок, 2007. - 224 с.

34. Faggian R., Powell A., Slater A.T. Screening for resistance to potato cyst nematode in Australian potato cultivars and alternative solanaceous hosts. Australas. Plant Pathology. 2012; 41: p. 453-461.

35. Исследование коллекционных образцов картофеля на наличие генетических маркеров устойчивости к фитопатогенам / А. Б. Сайнакова, М. С. Романова, С. Н. Красников, О. В. Литвинчук, Я. И. Алексеев, А. В.

Никулин, Е. В. Терентьева // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018; 22(1) с. 18-24.

36. Slater A.T., Cogan N.O., Forster J.W. Cost analysis of the application of marker-assisted selection in potato breeding. Mol. Breed. 2013; 32(2): p. 299-310.

37. Gebhardt C. Bridging the gap between genome analysis and precision breeding in potato. Trends Genet. 2013; 29(4): p. 248-256.

38. Asano K., Kobayashi A., Tsuda S., Nishinaka M., Tamiya S. DNA marker assisted evaluation of potato genotypes for potential resistance to potato cyst nematode pathotypes not yet invading into Japan. Breed. Sci. 2012; 62: p. 142-150.

39. Biryukova V.A., Shmyiglya I.V., Abrosimova S.B., Manankov V.V., Mityushkin A.V., Rogozina E.V., Kiru S.D., Chalaya N.A., Meleshin A.A., Zharova V.A. *The use of molecular markers in breeding for potato cyst nematode resistance. Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii* = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 2017; 178(1): p. 92-103

40. Antonova O. Yu., Shvachko N.A., Novikova L. Yu., Shuvalov O. Yu., Kostina L.I., Klimenko N.S., Shuvalova A.R., Gavrilenko T.A. *Genetic diversity of potato varieties bred in Russia/ and near-abroad countries based on polymorphism of SSR-loci and markers associated with resistance R-genes.* Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016; 20(5): p. 596-606.

41. Генетика из первых рук / В. К. Шумный, П. М. Бородин, Е. К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2013, том 17 , № 4/2, с. 780-781.

42. ДНК-маркер. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%9D%D0%9A-%D0%BC%D0%B0%D1%80%D0%BA%D0%B5%D1%80

43. Evaluation of a scar Rysc3 marker of the Ryadg gene to select resistant genotypes to potato virus Y (PVY) in the INIA potato breeding program / Boris Sagredo

D., Mónica Mathias R., Claudia Barrientos P // chilean journal of agricultural research 69(3):305-315 (july-september 2009).

44. ДНК-маркеры генов устойчивости к фитофторозу и к вирусу Y у образцов дикого аллотетраплоидного вида картофеля Solanum stoloniferum / А. В. Левый, Е. В. Воронкова, Ю. В. Полюхович, А. П. Ермишин // Весці Нацыянальнай акадэмі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. 2017. № 2. С. 46–54.

45. Генетическое разнообразие *Solanum pinnatisectum* Dun. И *S. Chacoense* Bitt. По резистентности к вирусу картофеля Y и результатам анализа / Е. В. Рогозина, П. С. Ульянич // Генетика, 2019, том 55, № 11, с. 1279–1287

46. Genome Enhanced Marker Improvement for Potato Virus Y Disease Resistance in Potato / Brittney M. Caruana, Brendan C. Rodoni, Fiona Constable // Agronomy 2021, 11, 832, p. 1-13.

47. Идентификация родительских форм для селекции картофеля устойчивого к болезням и вредителям методом мультиплексного ПЦР-анализа / Е. В. Рогозина, Е. В. Терентьєва // Селькохозяйственная биология, 2019, том 54, [1] 1, с. 19-30.

48. Application of DNA markers linked to the potato H1 gene conferring resistance to pathotype Ro1 of *Globodera rostochiensis* / Renata Galek & Michał Rurek & Walter S. De Jong // J Appl Genetics (2011) 52: p. 407–411.

49. Аллельное состояние молекулярного маркера гена устойчивости к золотистой нематоде (*globodera rostochiensis*) H1 среди сортов картофеля (*Solanum tuberosum ssp. tuberosum*) украинской и мировой селекции / А. В. Карелов, Л. А. Пилипенко, Н. О. Козуб, І. О. Созінов // Цитология и генетика, 2013, с. 41-46.

50. Применение ДНК-маркеров для оценки исходного селекционного материала картофеля / Е. П. Шанина, Л. Б. Сергеева // Достижения науки и техники АПК. 2018. Т. 32. № 12, с. 47-49.

51. Фітофтори і парша: які сорти картоплі стійкі до цих захворювань? [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://jpbeergarden.com/fitoftori-i-parsha-yaki-sorti-kartopli-stiiki-do-cih-zahvoryv

52. Селекція картоплі. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.elitkartofel.com/selektsiya-kartopli/

53. Каталог сортів картоплі. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://agrovolyn.gov.ua/sites/default/files/attachments/katalog_kartopli.pdf

54. Сиволап Ю.М./ Варіабельність і специфічність геномів сільськогосподарських рослин/ Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Е., Календарь Р.М., 2011 р.

55. Kazuo Watanabe Potato genetics, genomics, and applications., Breed Sci. 2015 Mar; 65(1): 53–68. Published online 2015 Mar 1. doi: 10.1270/jsbbs.65.53PMCID: PMC4374564; PMID: 25931980

56. Milczarek D., Przetakiewicz A., Kamiński P., Flis B. (2014): Early selection of potato clones with the H1 resistance gene – the relation of nematode resistance to quality characteristics. Czech J. Genet. Plant Breed., 50: 278–284.

57. Asano K., Kobayashi A., Tsuda S., Nishinaka M., Tamiya S. DNA marker-assisted evaluation of potato genotypes for potential resistance to potato cyst nematode pathotypes not yet invading into Japan. Breeding Sci., 2012, 62(2): 142-150 (doi: 10.1270/jsbbs.62.142).

58. Iga Tomczyn´ska • Florian Jupe • Ingo Hein •Waldemar Marczewski • Jadwiga S/liwka: Hypersensitive response to Potato virus Y in potato cultivar Sa´rpo Mira is conferred by the Ny-Smira gene located on the long arm of chromosome IX. *Molecular Breeding.* August 2014. DOI 10.1007/s11032-014-0050-2

59. Elison, G.L., Hall, D.G., Novy, R.G. et al. Development and Application of a Multiplex Marker Assay to Detect PVY Resistance Genes in Solanum tuberosum. Am. J. Potato Res. 97, 289–296 (2020). [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://doi.org/10.1007/s12230-020-09777-1

60.Бирюкова В.А. Молекулярные маркеры генов экстремальной устойчивости к Y вирусу картофеля в сортах и гибридах Solanum tuberosum L. № 5 (2019), 17-22

НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України