

Детекция генов устойчивости к цистообразующим нематодам в сортообразцах картофеля с помощью SCAR- маркеров

**О.В. Маханько, А.И. Силиверстова, Н.И. Дробот,
К.А. Щурко, Г.А. Яковлева**

*Научно-практический центр НАН Беларуси по
картофелеводству и плодоовощеводству,
Самохваловичи, Минская обл.*



Globodera rostochiensis

- золотистая цистообразующая картофельная нематода

Globodera pallida

- бледная цистообразующая картофельная нематода



Циста, молодая особь *Globodera pallida* (по Achenbach, Ute , 2007)

Вредоносность цистообразующих картофельных нематод

В зависимости от зараженности почвы, ее особенностей, погодных условий и свойств возделываемых сортов урожай снижается на 20-95% (Букасов, Камераз 1972)

500 млн € составляют ежегодные потери урожая в Европе



Посадки картофеля, пораженные
Globodera pallida

Методы контроля золотистой и бледной цистообразующих картофельных нематод:

1. Нематициды

2. Севооборот (5-9 лет)

3. Создание нематодоустойчивых сортов



MAS селекция



Цель – подобрать маркеры и адаптировать методики их детекции:

- недорогие и простые в исполнении;

- являющиеся диагностическими для данной селекционной популяции.

- с надежным однозначным ответом;



Сложности в работе по MAS – селекции с *Globodera pallida*

на сегодняшний день известны в основном локусы устойчивости количественного характера (QTL)



возможен контроль лишь «частичной» устойчивости к этой нематоде.

в Беларуси биотесты на устойчивость растений к этому вредителю не проводятся



установить ассоциацию маркеров с устойчивостью в белорусском селекционном материале не представляется возможным

превентивный характер исследований, однако они необходимы, так как снижение численности только одного вредителя может привести к ускоренной эволюции другого вследствие микроэволюционных процессов



Схема селекционного процесса

7

Год	Полевые испытания	Лабораторные испытания
1 Гибридизация		
2 Сеянцы 1-го года, 1 растение		
3 1-е клубневое поколение, 1 куст		
4 Гибриды 2-го года, 10-14 кустов		
5 Предварительное испытание, 100-120 кустов	Рак картофеля	Фитофтороз клубней
6 Конкурсное испытание 1-го года, (размножение 400 кустов)	Рак картофеля Картофельная нематода	Клубневые гнили
7 Конкурсное испытание 2-го года, (размножение 2000 кустов)	Динамическое испытание Картофельная нематода Вирусы	Клубневые гнили Биохимическая оценка
8 Конкурсное испытание 3-го года, (размножение 8000 кустов)	Динамическое испытание Госиспытание: рак, нематода Экологическое испытание Засухоустойчивость Бактериозы и грибные болезни, вирусы	Мехповреждения Клубневые гнили Биохимическая оценка Период покоя
9 Конкурсное испытание 4-го года, (размножение 0,5 га)	Динамическое испытание Экологическое испытание Засухоустойчивость Бактериозы и грибные болезни, вирусы	Мехповреждения Клубневые гнили Биохимическая оценка Период покоя
10 Государственное испытание 1-го года, (размножение 1 га)	Переувлажнение	
11 Государственное испытание 2-го года, (размножение 2 га)	Агропаспорт	
12 Государственное испытание 3-го года, (размножение 2 га)	Агропаспорт	

Внесение в Госреестр

Схема селекционного процесса



Внесение в Госреестр

Каждый последующий год селекционного процесса
увеличивает стоимость работы с сортообразцом
в 3-5 раз



ДНК-тестирование 50 сортов картофеля белорусской селекции по маркерам устойчивости к

Globodera rostochiensis

Globodera pallida

SCAR-маркеры CP113, TG689, Gro1-4
к R-генам устойчивости

Gpa2 – к R-гену устойчивости
SPUD1636, HC – к QTL



Отобраны маркеры и адаптированы методики для скрининга
TG689, Gro1-4,
Gpa2, SPUD1636



ДНК-тестирование 92 гибридов из питомника конкурсного
испытания

Отбор перспективных гибридов с маркерами генов устойчивости

Характеристика использованных маркеров

10

Локус	Хромосома/ R-ген (QTL)	Источник устойчивости	Маркер /праймер	Последовательность нуклеотидов от 5' к 3' концу	Размер фрагмента	Литературный источник
-------	---------------------------	--------------------------	--------------------	--	---------------------	--------------------------

Маркеры устойчивости к *Globodera rostochiensis*

H1	V / R-ген	<i>S. tuberosum ssp andigena</i>	CP113F	GCGTTACAGTCGCCGTAT	760 п.н.	Ермишин и др., 2010 Niewohner J., e.a., 1995 Skupinova S., e.a., 2002
			CP113R	GTTGAAGAAATATGGAATCAAA		
H1	V / R-ген	<i>S. tuberosum ssp andigena</i>	TG689F	TAAAACTCTTGTTATAGCCTAT	141 п.н.	Бирюкова и др., 2008
			TG689R	CAATAGAATGTGTTGTTTCACCAA		
Gro1-4	VII / R-ген	<i>S. spegazzinii</i>	Gro1-4F	TCTTTGGAGATACTGATTCTCA	602 п.н.	Ермишин и др., 2010 Gebhardt , e.a., 2006 Paal et al, 2004
			Gro1-4R	CGACCTAAAATGAAAAGCATCT		

Маркеры устойчивости к *Globodera pallida*

RGp5- vrnHC	V / QTL	<i>S.vernei</i>	HC F	ACACCACCTGTTTGATAAAAAACT	276 п.н.	Sattarzadeh et al, 2006 Achenbach, Ute , 2007
			HC R	GCCTTACTTCCCTGCTGAAG		
-	V / QTL	<i>S.vernei</i>	SPUD1636 F	GTGCGCACAGGGTAAAACC	210 п.н.	Bryan et al, 2002
			SPUD1636 R	ACCTTAGCGGATGAAAGCC		
Gpa2	XII / R-ген	<i>S. tuberosum ssp andigena</i>	Gpa2 F	GCAGATATAACCACACTAGCTC	380 п.н.	van der Voort et al, 1997 Achenbach, Ute , 2007
			Gpa2 R	ATGCTCCATTTGACTTCCC		

Внутренний положительный контроль (определяет качество ДНК)

BCH	-	-	BCH F	CGTTTGGCGCTGCCGTAAGTT	290 п.н.	Бирюкова и др., 2008
			BCH R	CATGACATAGTTTGAATTTTGAGTC		

Маркеры устойчивости к *Globodera rostochiensis* у белорусских сортов картофеля

Ген	Маркер	Количество проанализированных сортов, шт.						
		всего			с маркером		без маркера	
		48	устойчивых	неустойчивых	устойчивых	неустойчивых	устойчивых	неустойчивых
H1	CP113		28	20	27	20	1	0
	TG689				23 (82 %)	4	5	16 (80 %)
	Gro1-4				Gro1-4	3	0	25

Положительный контроль (CP113, TG689, Gro1-4) – сорт Живица

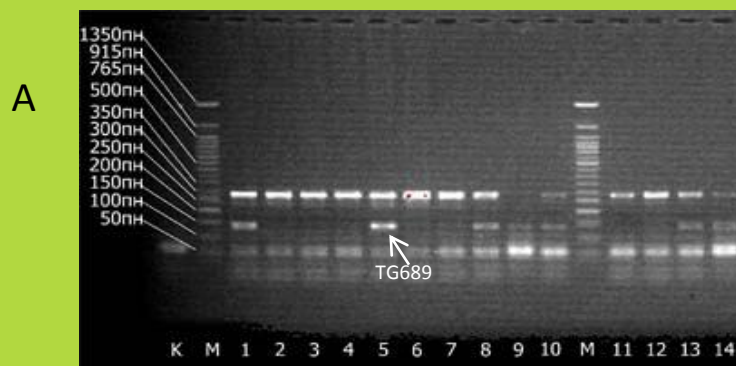


Маркеры устойчивости *Globodera pallida* у белорусских сортов картофеля

Ген	Маркер	Положительные контроли	Количество проанализированных сортов (шт.)	Количество сортов с маркером (шт.)
<i>Gpa2</i>	Gpa2	Innovator Живица	50	8
QTL (V хр.)	SPUD163 6	Elles, Sante Журавинка		2
QTL (V хр.)	HC	Innovator Бриз		20



Электрофореграммы продуктов ПЦР сортов картофеля с праймерами, перспективными для определения устойчивости к вредителю *Globodera rostochiensis*:



К – вода, М – маркер молекулярного веса 50bp (NEB), 1 – Аксамит, 2 – Лазурит, 3 – Талисман, 4 – Каприз, 5 – Ласунак, 6 – Ветразь, 7 – Лилея, 8 – Нептун, 9 – Гарант, 10 – Атлант, 11 – Бриз, 12 – Сузорье, 13 – Уладар, 14 – Акцент

К – вода, М – маркер молекулярного веса 50 bp (NEB); 1 – Зарница, 2 – Живица, 3 – Дельфин, 4 – Ветразь, 5 – Гранат, 6 – Журавинка, 7 – Янка, 8 – Верба, 9 – Веснянка, 10 – Вектар

рисунок А – праймер TG689 для идентификации гена H1 (размер амплифицируемого фрагмента 141 п.н.)

рисунок В – праймер Gro1-4 для идентификации гена Gro1-4 (размер амплифицируемого фрагмента 602 п.н.)

Маркеры устойчивости к *Globodera rostochiensis* у гибридов из питомника конкурсного испытания картофеля

Ген	Маркер	Количество проанализированных гибридов, шт.						
		всего			с маркером		без маркера	
		92	устойчивых	неустойчивых	устойчивых	неустойчивых	устойчивых	неустойчивых
			66	26	61 (92 %)	8	5	18 (69 %)
12	0				54	26		

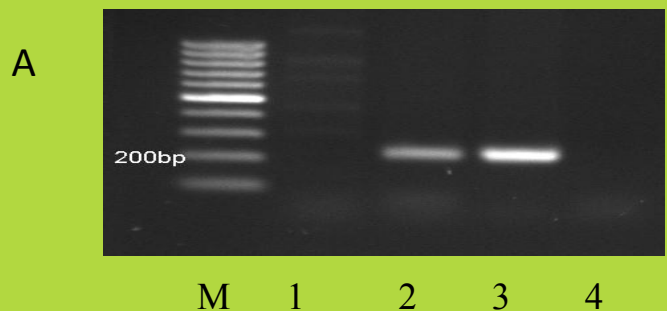


Маркеры устойчивости к *Globodera pallida* у гибридов из питомника
конкурсного испытания картофеля

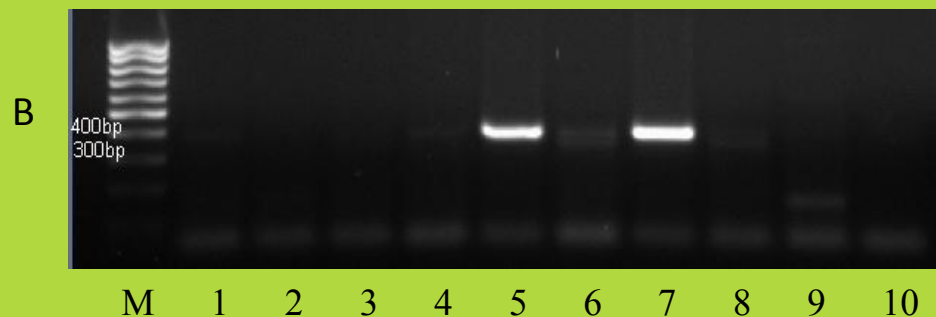
Ген	Маркер	Количество проанализированных сортов (шт.)	Количество сортов с маркером (шт.)
<i>Gpa2</i>	<i>Gpa2</i>	92	16
QTL (V хр.)	SPUD1636		2



Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК сортов картофеля с праймерами, перспективными для определения устойчивости к вредителю *Globodera pallida*:



М – маркер молекулярного веса 100 bp, «Праймтех»;
1 – гибрид 117-06-7, 2 - Elles, 3 – Журавинка, 4 – отрицательный контроль (вода)



М - – маркер молекулярного веса 100 bp, «Праймтех»; 1 - Колорит, 2 – Росинка, 3 – Веснянка, 4 – Атлант, 5 – Одиссей, 6 – Ветразь, 7 – Талисман, 8 – Гранат, 9 – Темп, 10 – отрицательный контроль - реакционная смесь без ДНК.

рисунок А – праймер SPUD1636 для идентификации QTL на V хромосоме (размер амплифицируемого фрагмента 210 п.н.)

рисунок В – праймер Gra2 для идентификации R-гена Gra2 (размер амплифицируемого фрагмента 380 п.н.)

По результатам исследований выделились 23 перспективных гибрида из питомника конкурсного испытания с маркерами генов устойчивости к нематодам:

- 1) по трем маркерам : TG689, SPUD1636, Gpa2 – 1 гибрид;
TG689, Gro1-4, Gpa2 – 1 гибрид;
- 2) по двум маркерам устойчивости к *Globodera rostochiensis* TG689, Gro1-4 – 11 гибридов;
- 3) по двум маркерам устойчивости к *Globodera rostochiensis* (TG689) и *Globodera pallida* (Gpa2), - 9 гибридов;
- 4) по двум маркерам TG689 и SPUD1636 устойчивости к обеим нематодам – 1 гибрид.



Совпадение данных о присутствии у
сортобразцов устойчивости к
G. rostochiensis, полученные с помощью
анализа по маркеру TG689 и биотеста, %

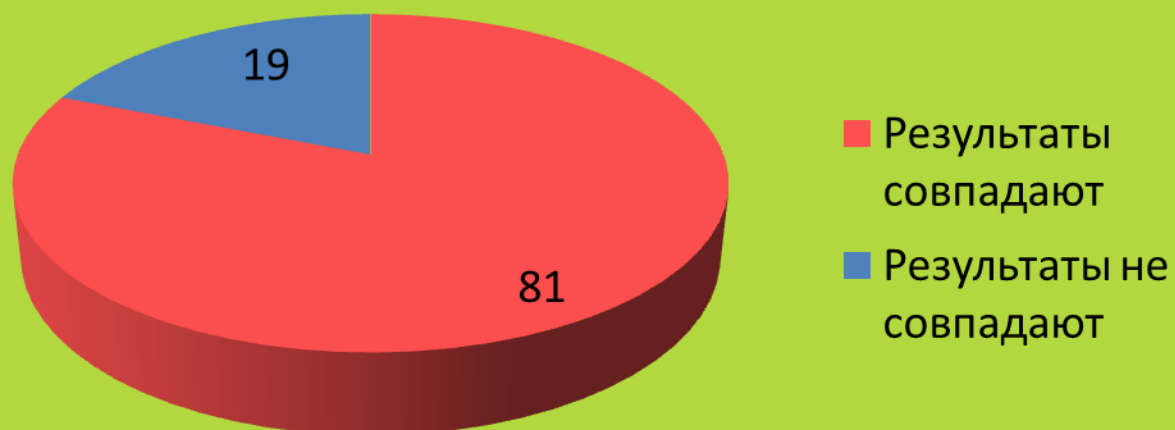
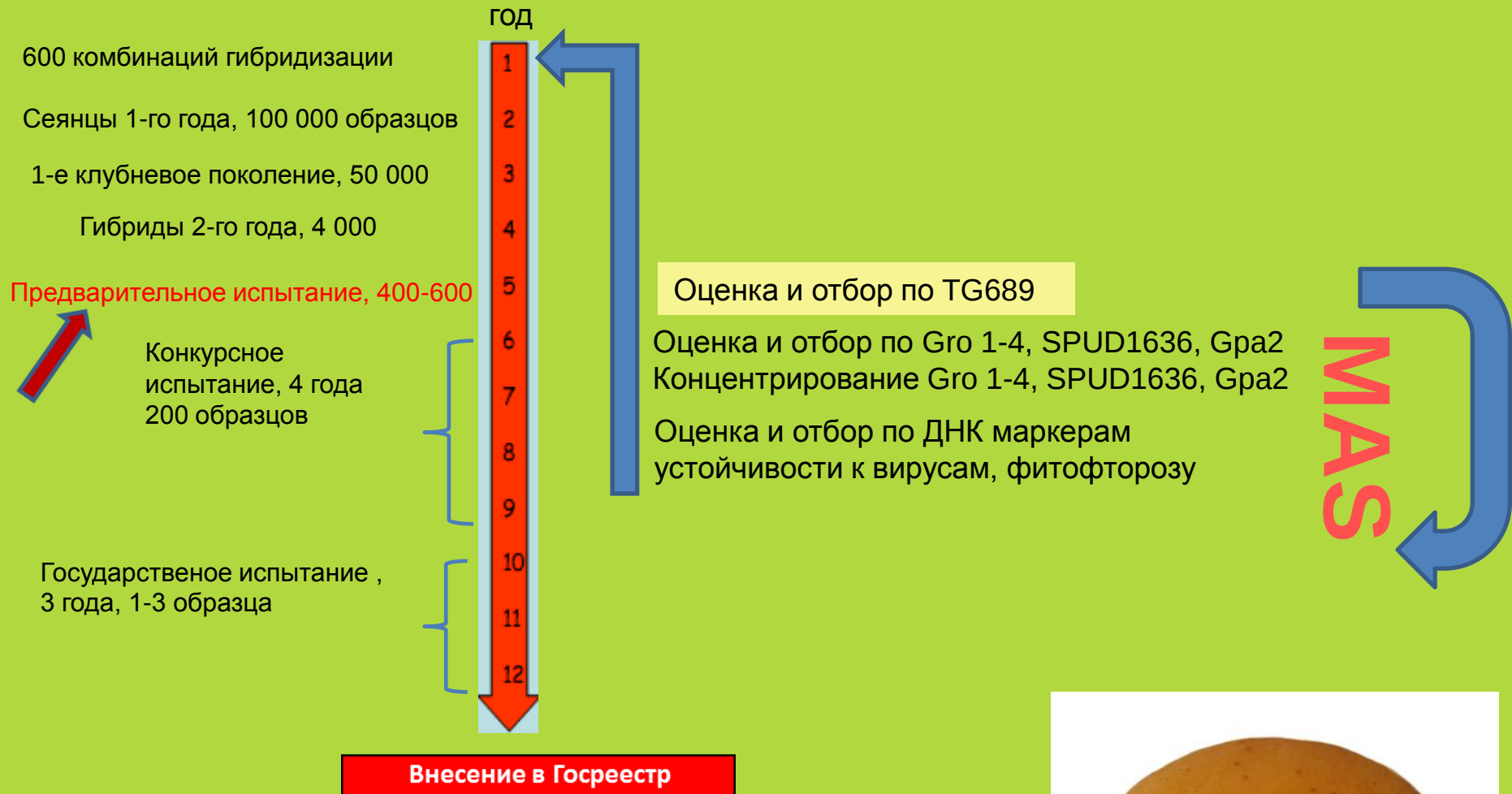


Схема селекционного процесса



Таким образом,

Отобраны 4 маркера для скрининга устойчивости картофеля к цистообразующим нематодам TG689, Gro1-4, Gra2 и SPUD1636. Адаптированы методики их детекции.

Маркер TG689 к гену *H1* устойчивости к *Globodera rostochiensis* обнаруживает наиболее тесную связь с проявлением признака (согласие данных по фитопатологической оценке и данных ПЦР-диагностики составило более 80 %) и может использоваться для отбора гибридов, устойчивых к этому вредителю, на более ранних этапах селекции.

Маркер Gro1-4 к одноименному гену устойчивости к *Globodera rostochiensis* и маркеры Gra2 и SPUD1636 устойчивости к *Globodera pallida* являются более редкими в белорусском селекционном материале и могут использоваться в MAS-селекции для отбора и с целью концентрации в селекционном материале генов устойчивости к цистообразующим нематодам картофеля.



Спасибо за внимание!

