

ПОИСК ИСТОЧНИКОВ УСТОЙЧИВОСТИ КАРТОФЕЛЯ К ЦИСТООБРАЗУЮЩЕЙ НЕМАТОДЕ *GLOBODERA* *ROSTOCHIENSIS* WOLL. С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ



**Н.В. Павлючук¹, М.И. Жукова², И.М. Мисюченко¹, О.Н. Зубкевич²,
Е.В.Воронкова¹, Е.А.Волуевич²**

¹ГНУ « Институт генетики и цитологии НАН Беларуси », Беларусь

²РУП « Институт защиты растений », Беларусь

E-mail: N.Pavlyichuk@igc.bas-net.by

Симптомы поражения картофеля золотистой нематодой



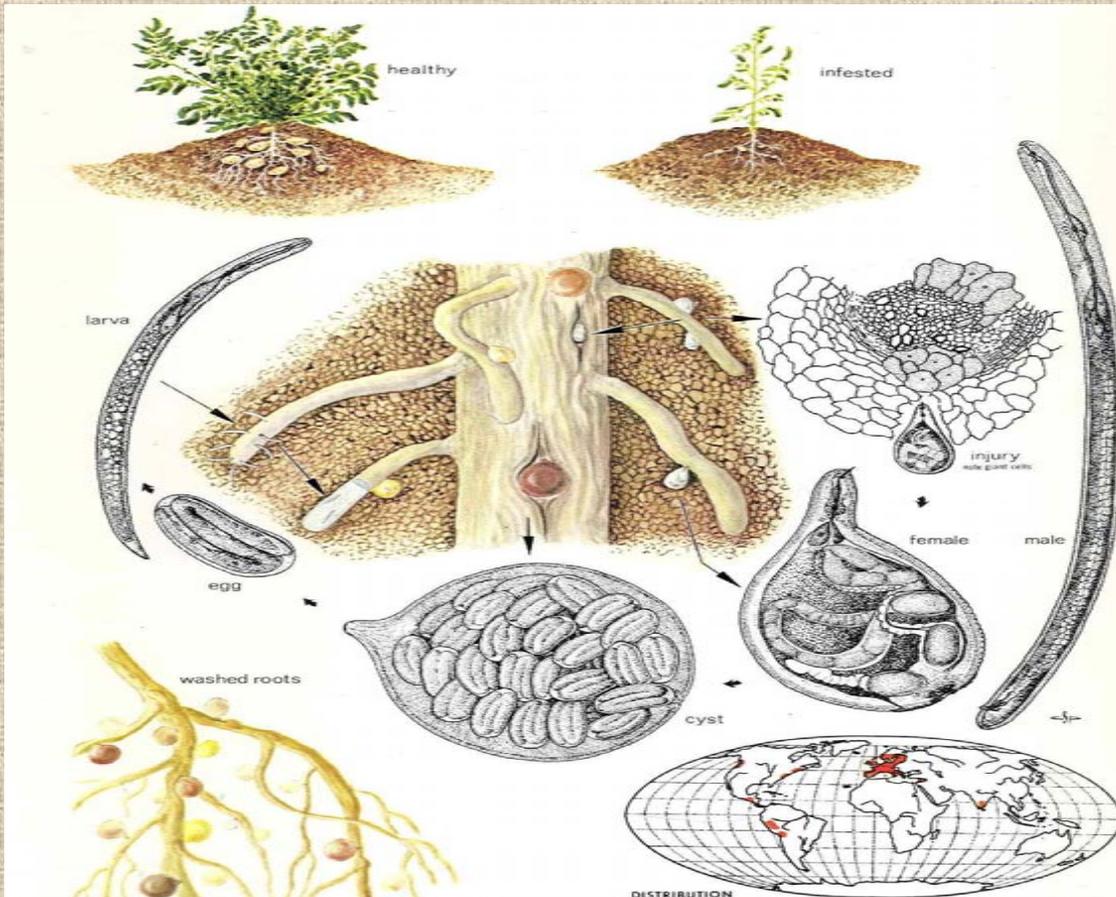
- задержка роста и развития растений
- истончение стебля и корней
- измельчение и деформация листьев
- отсутствие цветения
- корневая система приобретает мочковатый вид
- клубни отсутствуют или мелкие, их количество не превышает 2 – 3 штук

Картофель, пораженный глободерой



Потери урожая из-за инвазии глободеры в очагах сильного поражения посадок картофеля могут достигать 70%

Жизненный цикл золотистой картофельной нематоды



Цисты *Globodera rostochiensis* на корнях картофеля



Выход яиц и личинок из цисты

Цикл развития нематод – 40-66 дней. К концу цикла внутренние органы самки отмирают, ее наружные покровы затвердевают и превращаются в оболочку цисты, внутри которой находятся яйца и личинки. При уборке цисты опадают с корневой системы и зимуют в почве. В таком состоянии нематода способна сохраняться в почве 8-10 лет даже при отсутствии картофеля.

Генетическая детерминация устойчивости к *G. rostochiensis*

Ген/семейство генов	Локализация	Источник устойчивости к <i>G. rostochiensis</i>	Устойчивость к патотипам <i>G. rostochiensis</i>	Маркеры, используемые для идентификации генов устойчивости
<i>H1</i>	V хромосома	<i>S. tuberosum ssp. andigena</i>	Ro1 и Ro4	CP113, CD 78, TG689
<i>Grp1</i>	V хромосома	<i>S. vernei</i> , <i>S. oplocense</i> и <i>S. tuberosum ssp. andigena</i>	Ro5	Недостаточно изучены
<i>GroVI</i>	V хромосома	<i>S. vernei</i>	Ro1 – Ro5	Недостаточно изучены
<i>Gro1 (Gro1-4)</i>	VII хромосома	<i>S. spegazzinii</i>	Ro1 – Ro5	Gro1-4
QTL локусы		<i>S. spegazzinii</i> , <i>S. vernei</i>	Ro1 – Ro5	Недостаточно изучены
<i>Gro1.2</i>	X хромосома			
<i>Gro1.3</i>	XI хромосома			
<i>Gro1.4</i>	III хромосома			

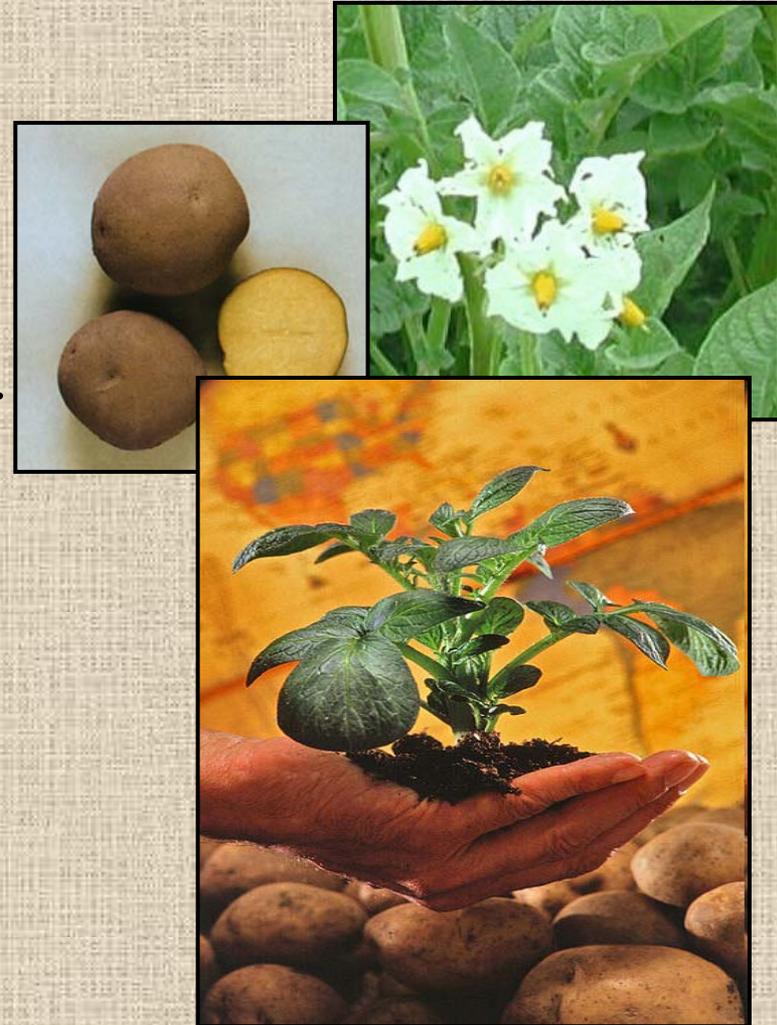
Цель настоящих исследований – идентификация генов устойчивости к цистообразующей нематоды *H1* и *Gro1-4* в селекционном материале картофеля с использованием молекулярных маркеров и отбор перспективных для селекции на этот признак образцов.

Материал

70 сортов картофеля *S. tuberosum* белорусской и иностранной селекции.

Метод

Молекулярно-генетический (ПЦР-анализ с использованием молекулярных маркеров генов устойчивости)



Условия проведения ПЦР-реакции для маркеров TG689 и Gro1-4

Ген	Маркер	Праймеры	Состав реакционной смеси для ПЦР (25 мкл)	Режим проведения ПЦР
<i>HI</i>	TG689	<p>TG689 allele specific: 5'-AAAAC TCTTGGTTATAGCSTAT-3'</p> <p>TG 689 indel 12: 5'-CAATAGAA TGTGTTGTTTCACCAA-3'</p> <p>BCH - F2: 5' - CGTTTGGCGCT GCCGTAAGTT - 3'</p> <p>BCH - R2: 5'- CATGACATAGT TTGAATTTTGAGTC- 3'</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪100 ng totalной ДНК ▪1.7 mM MgCl₂ ▪0.05 μM каждого из двух пар праймеров (TG689 и BCH) ▪0.2 mM каждого dNTP ▪0.75 U BioTaqpolymerase "DIALAT Ltd" (г. Москва) ▪2.5 мкл рекомендуемого для данной Taqpolymerase 10x реакционного буфера 	<p>94°C- 2 мин.</p> <p>94°C-20 с.</p> <p>56°C-30 с.</p> <p>72°C-40 с.</p> <p>72°C-5мин.</p> <p>} 35 циклов</p>
<i>Gro1-4</i>	Gro1-4	<p>Gro1-F: 5'-TCTTTGGAGATAC TGATTCTCA-3'</p> <p>Gro1-R: 5'-CGACCTAAAATGA AAAGCATCT -3'</p> <p>BCH - F2: 5' - CGTTTGGCGCT GCCGTAAGTT - 3'</p> <p>BCH - R2: 5'- CATGACATAGT TTGAATTTTGAGTC- 3'</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪100 ng totalной ДНК ▪2 mM MgCl₂ ▪0.025 μM каждого из двух пар праймеров ▪0.2 mM каждого dNTP ▪1 U BioTaqpolymerase "DIALAT Ltd" (г. Москва) ▪2.5 мкл рекомендуемого для данной Taqpolymerase 10 x реакционного буфера 	<p>94°C- 3 мин.</p> <p>92°C-45 с.</p> <p>58°C-45 с.</p> <p>72°C-60 с.</p> <p>72°C-5мин.</p> <p>} 35 циклов</p>



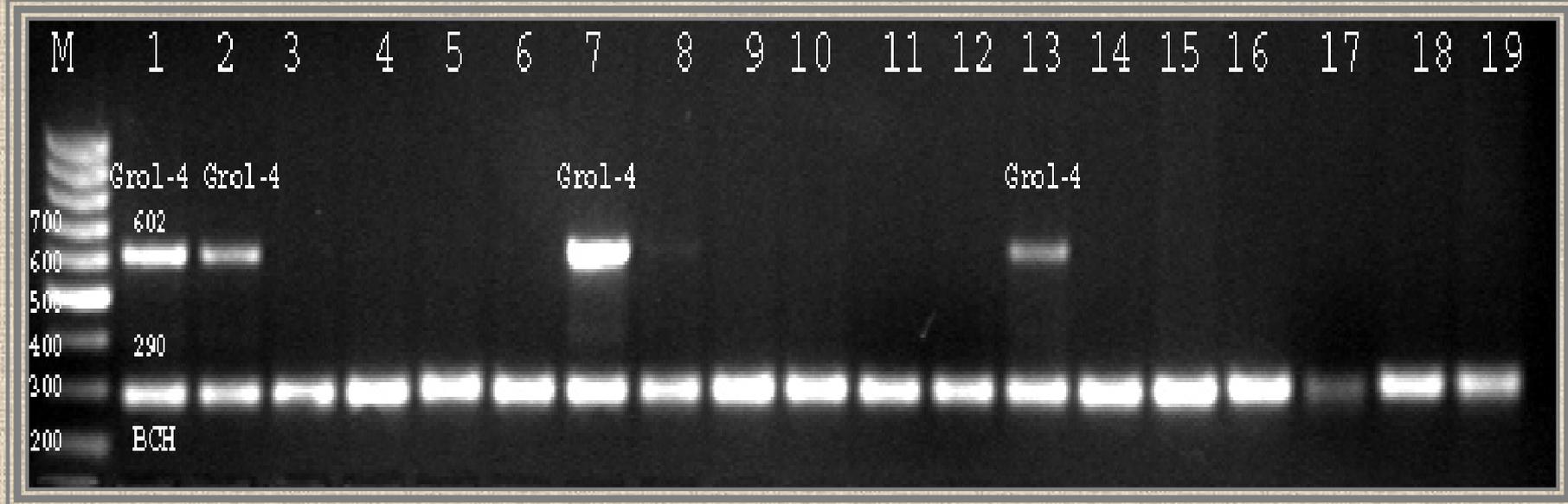
Результаты амплификации ДНК сортов картофеля с двумя наборами праймеров TG689 allele specific и TG689 indel12; ВСН-F2 и ВСН-R2

№№ 1–10– сорта картофеля (1-Аksamит, 2-Бриз, 3-Выток, 4-Дар, 5-Живица, 6-Журавинка, 7-Зарница, 8-Колорит, 9-Каприз, 10-Криница);

М – маркер молекулярного веса;

TG689 – наличие специфического фрагмента, соответствующего гену *H1*;

ВСН – внутренний положительный контроль.



Результаты амплификации ДНК сортов картофеля с двумя наборами праймеров *Gro1-F* и *Gro1-R*; *VCH-F2* и *VCH-R2*

№№ 1–19 – сорта картофеля (1-Miranda, 2-Уладар, 3-Аксамит, 4-Бриз, 5-Выток, 6-Дар, 7-Живица, 8-Журавинка, 9-Зарница, 10-Колорит, 11-Каприз, 12-Криница, 13-Лиля, 14-Ламбада, 15-Нептун, 16-Орбита, 17-Прамень, 18-Радео, 19-Росинка);

M – маркер молекулярного веса;

Gro1-4 – наличие специфического фрагмента, соответствующего гену *Gro1-4* ;

VCH – внутренний положительный контроль.

Название и характеристика исследуемых образцов картофеля по устойчивости к нематоде

№ п/п	Сорта картофеля	Виды – источники устойчивости к нематоде	Устойчивость к нематоде (по данным каталогов)	Результаты ПЦР на наличие/отсутствие (+/-) маркера Gro1-4 (ген Gro1-4)	Результаты ПЦР на наличие/отсутствие (+/-) маркера TG689 (ген H1)	№ п/п	Сорта картофеля	Устойчивость к нематоде (по данным каталогов)	Результаты ПЦР на наличие/отсутствие (+/-) маркера Gro1-4 (ген Gro1-4)	Результаты ПЦР на наличие/отсутствие (+/-) маркера TG689 (ген H1)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	Дубрава	adg, vrn	R (Ro1)	-	+	39	Нептун	S	-	-
2	Уладар	spg	R (Ro1)	+	+	40	Каприз	S	-	+
3	Журавинка	adg, vrn	R (Ro1)	-	+	41	Бриз	S	-	-
4	Янка	adg, vrn	R (Ro1)	-	+	42	Аksamит	S	-	+
5	Верас		R (Ro1)	-	+	43	Выток	S	-	-
6	Криница	adg	R (Ro1)	-	+	44	Зарница	S	-	-
7	Блакит		R (Ro1)	-	+	45	Лошицкий	S	-	-
8	Дар		R (Ro1)	-	+	46	Явар	S	-	-
9	Живица	adg, spg	R (Ro1)	+	+	47	Орбита	S	-	-
10	Колорит		R (Ro1)	-	+	48	Синтез	S	-	-
11	Лилея		R (Ro1)	+	-	49	Акцент	S	-	+
12	Прамень		R (Ro1)	-	-	50	Ласунак	S	-	-
13	Росинка	adg	R (Ro1)	-	+	51	Одиссей	S	-	-
14	Сузорье		R (Ro1)	-	-	52	Prof.Wohlman	S	-	-
15	Дельфин	adg	R (Ro1)	-	+	53	Кама	S	-	-
16	Веснянка		R (Ro1)	-	+	54	Apta	S	-	-
17	Ветразь		R (Ro1)	-	-	55	Mariella	S	-	-
18	Атлант		R (Ro1)	-	+	56	Monaliza	S	-	-
19	Талисман		R (Ro1)	-	-	57	Carla	S	-	-
20	Скарб	adg	R (Ro1)	-	+	58	Carola	S	-	-
21	Лазурит		R (Ro1)	-	-					

Продолжение таблицы

№ п/п	Сорта картофеля	Виды-источники устойчивости к нематоде	Устойчивость к нематоде (по данным каталогов)	Результаты ПЦР на наличие/отсутствие(+/-) маркера Gro1-4 (ген Gro1-4)	Результаты ПЦР на наличие/отсутствие(+/-) маркера TG689 (ген H1)	№ п/п	Сорта картофеля	Устойчивость к нематоде (по данным каталогов)	Результаты ПЦР на наличие/отсутствие(+/-) маркера Gro1-4 (ген Gro1-4)	Результаты ПЦР на наличие/отсутствие(+/-) маркера TG689 (ген H1)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
22	Лира	adg	R (Ro1-5)	+	+	59	Рагнеда	н/о	-	+
23	Miranda	spg	R (Ro1-5)	+	-	60	Универсал	н/о	-	-
24	Producent	adg, vrn	R (Ro1-3)	-	+	61	Ресурс	н/о	-	-
25	Ponto	spg	R (Ro1-5)	-	-	62	Никульский	н/о	-	-
26	Assia	spg, adg, vrn	R (Ro1,5)	+	-	63	Пранса	н/о	-	-
27	Quarta	adg,	R (Ro1,4)	-	+	64	Фазан	н/о	-	+
28	Sante	adg, vrn	R (Ro1-4)	-	+	65	Лазарь	н/о	-	-
29	Heidrun	spg	R (Ro1-5)	+	-	66	Ламбада	н/о	-	+
30	Pirola	adg	R (Ro1,4)	-	+	67	Karmoran	н/о	-	+
31	Planta	adg	R (Ro1)	-	+	68	Meridian	н/о	-	+
32	Berber	adg	R (Ro1)	-	+	69	Rita	н/о	-	-
33	Olga		R (Ro1)	-	+	70	Krasa	н/о	-	+
34	Anosta	adg,	R (Ro1)	-	+					
35	Elkana	adg, vrn	R (Ro1-3)	-	+					
36	Monza		R (Ro1)	-	+					
37	Darwina	adg, vrn	R (Ro1-3)	-	+					
38	Albatros		R (Ro1)	-	+					

Результаты ПЦР-анализа и биотеста устойчивости сортов картофеля к *G. rostochiensis*

№ п/п	Сорта картофеля	Устойчивость к нематодe (по данным каталогов)	Виды источники устойчивости к нематодe	Результаты ПЦР на наличие/отсутствие (+/-) маркера Gro1-4	Результаты ПЦР на наличие/отсутствие маркера TG689 (+/-)	Результаты биотеста (среднее количество цист на корнях растений, шт.)	
						Ro1	Ro2
1	Miranda	R (Ro1-5)	spg	+	-	0	0
2	Уладар	R (Ro1)	spg	+	+	0	0
3	Каприз	S		-	+	70	н/о
4	Нептун	S		-	-	30	н/о
5	Producent	R (Ro1-3)	adg, vrn	-	+	0	н/о
6	Ponto	R (Ro1-5)	spg	-	-	0	н/о
7	Журавинка	R (Ro1)	adg, vrn	-	+	0	8
8	Янка	R (Ro1)	adg, vrn	-	+	0	20
9	Верас	R (Ro1)		-	+	0	20
10	Prof. Wohltmann	S		-	-	40	15
11	Assia	R (Ro1,5)	adg, vrn, spg	+	-	0	4
12	Quarta	R (Ro1,4)	adg	-	+	0	30
13	Бриз	S		-	-	50	н/о
14	Sante	R (Ro1-4)	adg, vrn	-	+	0	5
15	Heidrun	R (Ro1-5)	spg	+	-	0	0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- Подтверждена высокая эффективность использования маркеров TG689 и Gro1-4 для идентификации доминантных генов устойчивости к цистообразующей нематоды *G. rostochiensis* в селекционном материале картофеля, так как уровень совпадения результатов ПЦР-анализа и биотеста составил 84%.
- Отмечены различия по частоте встречаемости этих маркеров, что свидетельствует о генетической однородности сортов по генам устойчивости и необходимости привлечения в селекцию большего разнообразия источников глободероустойчивости.
- Установлено, что ген *Gro1-4*, источником которого является дикий вид *S. spagazzinii* может контролировать устойчивость не только к патотипу Ro1, но и к более агрессивному патотипу Ro2, что свидетельствует о его высокой селекционной ценности.
- По результатам ПЦР-анализа из коллекционного материала картофеля выделено 7 носителей гена *Gro1-4* и 37 – гена *H1*. Сорта Лира, Уладар, Живица являются источниками двух доминантных генов устойчивости к цистообразующей нематоды *G. rostochiensis* (*Gro1-4*, *H1*) и представляют наибольший интерес для селекции на глободероустойчивость, поскольку объединение в одном сорте нескольких главных генов устойчивости способствует созданию длительно устойчивых генотипов.



Спасибо за
внимание