Особенности использования ДНК-маркеров в селекции картофеля

А.П. Ермишин

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

MAS-marker assisted selection, marker aided selection – отбор с помощью ДНК-маркеров (маркер-ассоциированная селекция, маркер-сопутствующая селекция).

Преимущества ДНК-маркеров:

- **их использование позволяет проводить оценку селекционного материала по генотипу;**
- **при необходимости идентификации в организме того или иного гена такая оценка является более точной, чем оценка по фенотипу**
- **во многих случаях она менее трудоемка и оказывается более дешевой**
- **ее можно применять в любое время года.**

MAS у диплоидных культур

1. Интрогрессия новых генов с помощью беккросса сортам (линиям)

Скрещивания: AABBcc × aabbCC = AaBbCc

F1 AaBbCc

BC1 AaBbCc × AABBcc = A-B-Cc ; A-B-cc

…

BC6 AABBCc

Самопыление: AABBCc × AABBCc = AABBCC + 2AABBCc + AABBcc

Отбор гомозигот AABBCC

MAS у диплоидных культур

2. Интрогрессия новых генов с помощью беккросса гибридам

Гибрид AABB**cc** × DDEE**ff**

Улучшенный гибрид AABB**CC** × DDEE**FF**

MAS у диплоидных культур

Использование MAS при выведении новых сортов

Скрещивания: AABBccDD × AABBCCdd

F1 AABBCcDd

F2 AABBC-D-, AABBC-dd, AABBccD-, AABBccdd,

…

F6 AABBCCDD

На каких этапах селекционного процесса диплоидов применяется MAS

1. При подборе родительских форм для гибридизации
2. В процессе отбора
3. При оценке полученных сортов (линий)

Особенности картофеля *Solanum tuberosum* как объекта селекции

- Вегетативно размножаемая культура
- Автотетраплоид: 2n=4x=48
- Высокая степень гетерозиготности исходного селекционного материала и сортов картофеля

Схема
традиционной селекции картофеля

- Скрещивания
- F1 (сеянцы)
- F1C1 (первое клубневое поколение)
- F1C2 (второе клубневое поколение)
- F1C3 (Предварительное испытание)
- F1C4 (Конкурсное испытание первого года)
- ….
- F1C7 (Конкурсное испытание четвертого года)
- F1C8 (Государственное испытание первого года)
- ….
- Включение сорта в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород

Возможные аллельные варианты:

аааа – нуллиплекс

Аааа - симплекс

ААаа – дуплекс

АААа - триплекс

АААА - квадруплекс

MAS у картофеля

Скрещивания:

A---B---ccccD--- × A---B---C---dddd

F1 A---B---C---D--- ,

а также: aaaaB---C---D---, A---bbbbC---D---
A---B---cccc D---, A---B---ccccdddd, …
aaaabbbbccccdddd

Схема
традиционной селекции картофеля

- Скрещивания
- F1 (сеянцы)
- F1C1 (первое клубневое поколение)
- F1C2 (второе клубневое поколение)
- F1C3 (Предварительное испытание)
- F1C4 (Конкурсное испытание первого года)
- ….
- F1C7 (Конкурсное испытание четвертого года)
- F1C8 (Государственное испытание первого года)
- ….
- Включение сорта в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород

На каких этапах селекционного процесса может применяться MAS у картофеля

1. При подборе родительских форм для гибридизации
2. На заключительных этапах отбора или при оценке полученных сортов

При использовании MAS при подборе родительских форм для гибридизации важно определить:

- Какие конкретно ценные для селекции гены представлены у родительских форм (какие ДНК-маркеры)
- Аллельный состав этих генов

ДНК-маркеры, используемые в селекции картофеля

Ген	Признак	Происхождение	Маркер
H1	Уст. к нематоде	*S. andigenum*	CP113 (SCAR)
H1	Уст. к нематоде	*S. andigenum*	TG689 (SCAR)
Gro1-4	Уст. к нематоде	*S. spegazzinii*	Gro1-4 (SCAR)
Ry_{adg}	Уст. к PVY	*S. andigenum*	RYSC3 (SCAR)
Ry_{sto}	Уст. к PVY	*S.stoloniferum*	Yes3-3A (STS)
$Ry\text{-}f_{sto}$	Уст. к PVY	*S.stoloniferum*	GP122 (CAPS)
R_{X1}	Уст. к PVX	*S. andigenum*	CP60 (CAPS)
PLRV1	Уст. к PLRV		NL27 (SCAR)
PLRV4	Уст. к PLRV		UBS864R (псевдоSCAR)
Sen1	Уст. к раку		NL25 (CAPS)
$R1_{dms}$	Уст. к фитофторозу	*S. demissum*	$R1_{dms}$ (SCAR)

- В лаборатории генетики картофеля Института генетики и цитологии НАН Беларуси было проведено изучение на предмет наличия 13 ДНК-маркеров генов устойчивости к болезням и вредителям большой коллекции селекционного материала картофеля (в общей сложности 105 образцов). Она включала 84 сорта, в том числе селекции Республики Беларусь (35 сортов), России (12 сортов), Германии (15 сортов), Нидерландов (13 сортов), США (7 сортов), Франции (1 сорт), Украины (3 сорта), Польши (1 сорт), Болгарии (1 сорт), а также более 20 перспективных гибридов «НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству».

ДНК-маркеры у сортов картофеля

Сорт	*H1* CP113/ TG869	*Gro1-4* Gro1-4	*Ryadg* RYSC3	*Rysto/RyFsto* Yes3-3F/GP122	*Rxadg* CP60/ IPM4	*PLRV1* NL27	PLRV4 UBC 864R	*Sen1* NL25	*R1 dms* R1dms
Лилея	+/+	+	0	0/0	+/+	+	+	+	+
Уладар	+/+	+	+	0/0	0/+	+	+	+	+
Янка	+/+	0	+	+/+	0/+	0	+	0	0
Чарауник	+/+	0	+	0/+	0/+	0	+	+	0
Assia	+/0	+	+	0/0	+/+	0	+	+	0
Heidrun	+/0	+	0	+/+	+/+	0	+	+	0

Частоты ДНК-маркеров доминантных аллелей генов устойчивости к болезням и вредителям в сортах картофеля

Частота	*H1* CP113/ TG869	*Gro1-4* Gro1-4	*Ryadg* RYSC3	*Rysto/Ry Fsto* Yes3-3F/GP122	*Rxadg* CP60/ IPM4	*PLRV1* NL27	PLRV4 UBC 864R	*Sen1* NL25	*R1 dms* R1dms
Частота в коллек-ции	85/28	7,5	51,9	17/9	12/43	15,1	98,1	63,2	15,1
Частота среди белорус ских сортов	89/36	7,5	58,5	17/13	8/42	18,9	100	54,7	7,5

Определение аллельного состояния генов у исходного материала картофеля

В селекции картофеля все большее распространение получает стратегия, основанная на использовании мультиплексных родительских линий: выгоднее анализировать большие объемы небольшого количества гибридных популяций, имеющих высокую селекционную ценность, а не большого количества популяций, селекционная ценность которых неизвестна [Tai et al. 1986]

Гибридные популяции с высокой селекционной ценностью получают, используя предварительно изученные селекционные клоны, обладающие хорошей комбинационной способностью по показателям продуктивности и являющиеся носителями комплекса генов устойчивости к болезням и вредителям. При этом желательно, чтобы такие селекционные клоны являлись мультиплексами по многим хозяйственно-ценным генам.

Эффективность использования родительских форм картофеля с различным аллельным составом селекционно-ценных генов

- Симплекс × нуллиплекс

Hhhh × hhhh = 1 уст. : 1 воспр.

- Симплекс × симплекс

Hhhh × Hhhh = 3 уст. : 1 воспр.

- Дуплекс × нуллиплекс

HHhh × hhhh = 5 уст. : 1 воспр.

- Дуплекс × симплекс

HHhh × Hhhh = 11 уст. : 1 воспр.

- Триплекс × нуллиплекс

HHHh × hhhh = все устойчивые

Доля генотипов в гибридной популяции с комбинацией двух признаков (АВ) в зависимости от состава и аллельного состояния генов этих признаков у родительских форм

- Симплекс × нуллиплекс ($Aa^3Bb^3 \times a^4b^4$) – 25%
- Симплекс × симплекс ($Aa^3Bb^3 \times Aa^3Bb^3$) – 75%
- Дуплекс × нуллиплекс ($A^2a^2B^2b^2 \times a^4b^4$) – 70%
- Дуплекс × симплекс ($A^2a^2B^2b^2 \times Aa^3Bb^3$) – 91,7%
- Триплекс × нуллиплекс ($A^3aB^3b \times a^4b^4$) – 100%

Возможны два подхода селекции родительских мультиплексных линий:

- путем отбора из коллекций существующих сортов картофеля, селекционных линий;
- путем специальной селекции, направленной на их получение.

Определение аллельного состояния генов у исходного материала картофеля

- Гибридизация с тестером (нуллиплексом)

  A - - - × аааа
- Анализ расщепления в F1 по наличию/отсутствию ДНК маркера:

Считается, что достаточно проанализировать около тридцати гибридов F1, чтобы установить достоверную разницу между расщеплением 5:1 (дуплекс×нуллиплес) и 1:1 (симплекс×нуллиплекс), или убедиться, является ли изучаемая линия квадруплексом или триплексом, а не дуплексом или симплексом [Bradshaw, Mackay, 1994].

Определение аллельного состояния генов у исходного материала картофеля

- **Требования к тестерам:**
- должны быть нуллиплексами по максимально большому числу анализируемых генов
- должны быть мужски фертильными:

  обильно и продолжительное время цвести,

  формировать большое количество функционально фертильной пыльцы

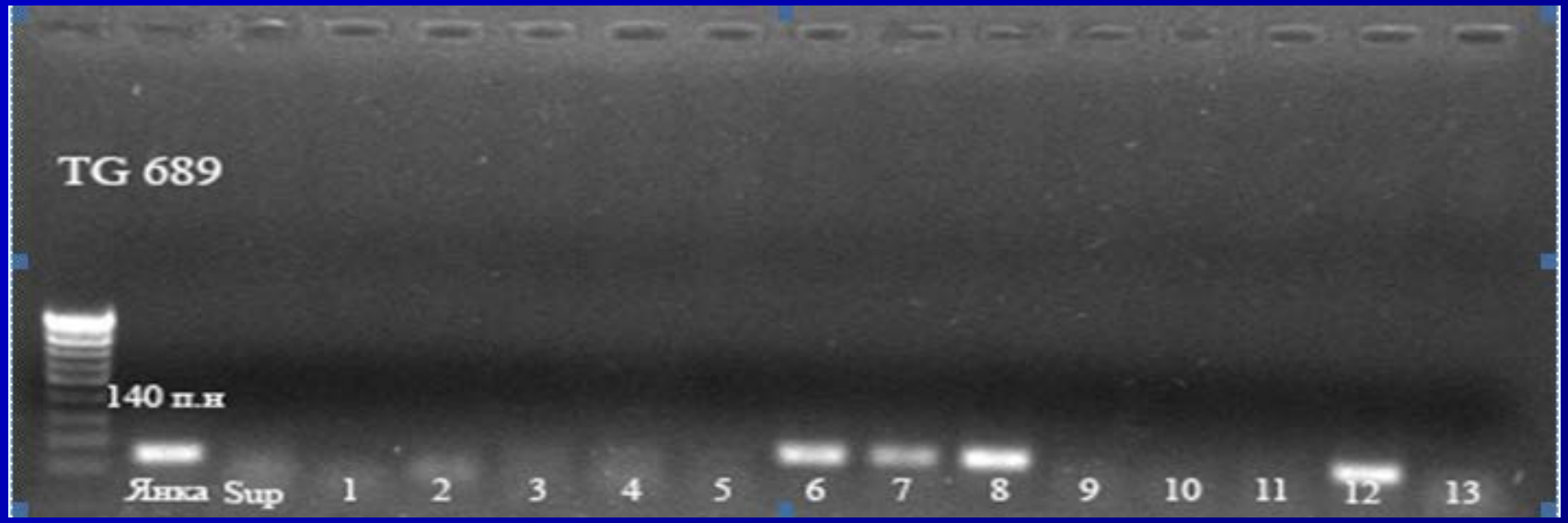
ДНК-маркеры у сортов картофеля-претендентов на роль тестеров для оценки аллельного состояния генов устойчивости к болезням и вредителям

Сорт	*H1* CP113/ TG869	*Gro1-4* Gro1-4	*Ryadg* RYSC3	*Rysto/RyFsto* Yes3-3F/GP122	*Rxadg* CP60/ IPM4	*PLRV1* NL27	PLRV4 UBC 864R	*Sen1* NL25	*R1 dms* R1dms
Katahdin	+/0	0	+	+/0	0/+	0	+	+	0
Superior	+/0	0	+	0/0	0/+	0	+	0	0
Red Pontiak	+/0	0	0	0/0	0/+	0	+	0	0
Kennebeck	+/0	0	+	+/0	0/+	0	+	+	+
Norchip	+/0	0	+	+/0	0/0	0	+	+	0
Russet Burbank	+/0	0	0	+/0	0/0	0	+	+	0

ДНК-маркеры у диплоидных линий, формирующих фертильную нередуцированную пыльцу

Линия	*H1* CP113/ TG869	*Gro1-4* Gro1-4	*Ryadg* RYSC3	*Rysto/RyFsto* Yes3-3F/GP122	*Rxadg* CP60/ IPM4	*PLRV1* NL27	PLRV4 UBC 864R	*Sen1* NL25	*R1 dms* R1dms
8н.9	+/+	0	0	+/0	0/0	0	+	0	0
16н.8	+/+	0	0	+/0	0/0	0	+	0	0
17 н.8	+/+	0	0	0/0	0/0	0	0	0	0
17н.3	0/0	0	0	0/0	0/0	+	+	0	0
19н.4	0/+	0	0	0/0	0/0	+	+	0	0
25 н.15	0/+	0	0	0/0	+/0	+	+	+	0
27 н.11	0/0	0	0	0/0	0/0	0	+	+	0
28 н.16	0/0	0	0	0/0	0/0	+	+	+	+

Электрофореграмма продуктов ПЦР с парой праймеров TG689 к гену *H1* устойчивости к глободерозу картофеля. Показано наличие маркерного фрагмента размером 140 п.н. у материнского сорта Янка, а также у гибридов под номерами 6,7,8 и 12. Фрагмент отсутствует у сорта-тестера Superior, и у гибридов 1-5, 9-11, 13



Расщепление по наличию ДНК-маркера TG689 в гибридных популяциях сорт × тестер (нуллиплекс по гену *H1*)

Сорт	Фактическое расщепление M : 0*	Ожидаемое расщепление при симплексном состоянии гена, 1 : 1 M : 0	Ожидаемое расщепление при дуплексном состоянии гена 5:1 M : 0	χ^2	Уровень значимости P
Янка	14:24	19:19		2,62	0,104
Максимум	20:15	17,5:17,5		0,7	0,398
Чарауник	30:10		33,3:6,7	0,7	0,429
106-04-17	34:5		31,2:7,8	1,26	0,262

Методы создания мультиплексных родительских линий с комплексом генов устойчивости к болезням и вредителям

- получение с помощью культуры пыльников in vitro удвоенных дигаплоидов сортов картофеля, несущих комплекс генов устойчивости к болезням и вредителям (отобранных по наличию соответствующих ДНК-маркеров)

- Получение дигаплоидов сортов, несущих комплекс генов устойчивости к болезням и вредителям (отобранных по наличию соответствующих ДНК-маркеров) с последующим митотическим удвоением хромосом у дигаплоидов, отобранных по наличию нескольких маркеров

- создание с помощью комбинативной селекции на диплоидном уровне диплоидных родительских линий с комплексом ценных для селекции генов, способных образовывать фертильную нередуцированную пыльцу.

- **В лаборатории генетики картофеля Института генетики и цитологии НАН Беларуси с помощью культуры пыльников получены 140 тетраплоидных андрогенетических растений-регенерантов сортов Верас, Луговской, Ласунак, Аноста, Дубрава, Прамень и Блакит**
- В ближайшее время планируется оценить аллельное состояние генов устойчивости у ряда андроклонов с целью выделения мультиплексных линий

ДНК-маркеры у сортов картофеля и дигаплоидов на их основе

Сорта и дигаплоиды	H1 CP113	Gro 1-4 Gro 1-4	Ry adg ADG2	PVXadg CP60	PLRV1 NL27	PLRV4 UBS864	Sen1 Nl 25	R1dms
Дубрава	+	+	+	0	+	+	+	0
IGC 07/9.1	+	0	+	0	+	+	+	0
IGC 07/9.2	+	0	0	0	+	0	+	0
IGC 07/9.22	0	0	0	0	0	0	0	0
IGC 08/5.11	+	0	+	0	+	+	0	0
Пирола	+	0	+	0	+	+	+	0
IGC 07/6.1	0	0	+	0	0	+	0	0
IGC 08/4.1	+	0	0	0	0	+	0	0
IGC 08/4.2	0	0	+	0	0	+	+	0
Карлита	+	0	+	+	+	+	+	+
IGC 08/2.5	+	0	0	0	0	+	0	0
IGC 07/7.1	+	0	+	0	+	+	0	0
IGC 08/2.7	0	0	0	0	0	0	0	+

- **В лаборатории генетики картофеля ИГиЦ НАНБ с помощью гаплопродюсера *S. phureja* IvP 35 было получено 98 первичных дигаплоидов сортов Блакит, Дубрава, Лилея, Уладар, Assia, Carlita, Heidrun, Lyra, Pirola, Saphir, а также ценных селекционных клонов, среди которых выделено 53 генотипа, несущие те или иные маркеры к генам устойчивости к болезням и вредителям, в том числе 33 дигаплоида, несущие 4 и более маркеров [Лукша и др. 2012].**
- **Лучшие первичные дигаплоиды включены в программу гибридизации с линиями-донорами фертильности и образования 2n-пыльцы, донорами новых генов устойчивости к фитофторозу и вирусам, интрогрессированных от диких видов. Полученные гибриды проходят испытания**

Заключение

- Возможные направления рационального использования MAS в селекции картофеля с учетом генетических характеристик культуры и особенностей селекционного процесса включают:

  - определение состава и аллельного состояния генов хозяйственно-ценных признаков в исходном материале,

  - создание мультиплексных тетраплоидных родительских линий, а также формирующих нередуцированные гаметы диплоидных родительских линий с комплексом генов устойчивости к болезням и вредителям.
- В лаборатории генетики картофеля Института генетики и цитологии НАН Беларуси проведено изучение 105 сортов и селекционных клонов картофеля на предмет наличия 13 ДНК-маркеров генов устойчивости к золотистой цистообразующей нематоде, вирусам PVX, PVY, PLRV, раку картофеля и фитофторозу. Сформирована база данных в виде информационного ресурса.

- **Отобраны тетраплоидные сорта и формирующие фертильную нередуцированную пыльцу диплоидные линии, пригодные для использования в качестве тестеров для определения с помощью MAS аллельного состояния генов устойчивости к болезням и вредителям в исходном материале.**
- **С помощью гаплопродюсера *S. phureja* IvP 35 было получено 98 первичных дигаплоидов сортов Блакит, Дубрава, Лилея, Уладар, Assia, Carlita, Heidrun, Lyra, Pirola, Saphir, а также ценных селекционных клонов, среди которых выделено 53 генотипа, несущие те или иные маркеры к генам устойчивости к болезням и вредителям, в том числе 33 дигаплоида, несущие 4 и более маркеров.**

Благодарю за внимание