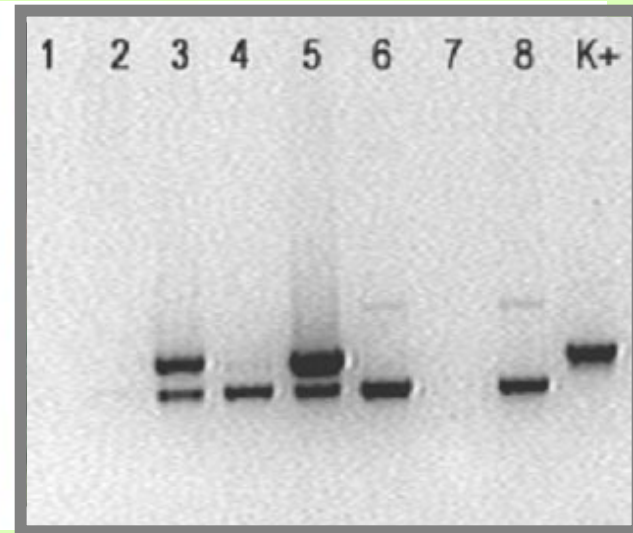




## SCAR МАРКЕРЫ ГЕНА *RB/RPI-BLB1* УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОФТОРОЗУ КАРТОФЕЛЯ

О.А. Фадина\*, Т.В. Белянцева\*, А.А. Панкин\*, Э.Е. Хавкин\*,  
Е.В. Рогозина\*\*, М.А. Кузнецова\*\*\*, Р.В. Джонс\*\*\*\*, К.Л. Дил\*\*\*\*

\*ВНИИСБ биотехнологии Россельхозакадемии, Москва;

\*\*ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова Россельхозакадемии,  
С. Петербург;

\*\*\*ВНИИ фитопатологии Россельхозакадемии, Большие Вяземы, Моск. обл.;

\*\*\*\*USDA-ARS BARC, Beltsville, MD, USA

## **Проект МНТЦ 3714р (2007 - 2013)**

**ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии,  
ВНИИ фитопатологии,  
ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова,  
ВНИИ картофельного хозяйства Россельхозакадемии**

## **Проект ЕврАзЭС, Госконтракт 16.M04.12.0007 (2011 – 2013)**

**ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии  
Партнер - Институт генетики и цитологии НАН Республики Беларусь, Минск**

## **Проект РФФИ 13-04-00163 (2013 – 2015)**

**ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии**



Растение *S. bulbocastanum* в теплице ВНИИФ. Фотография А.А. Панкина

***Solanum bulbocastanum* – надежды и разочарования.**

**Ключевые события:**

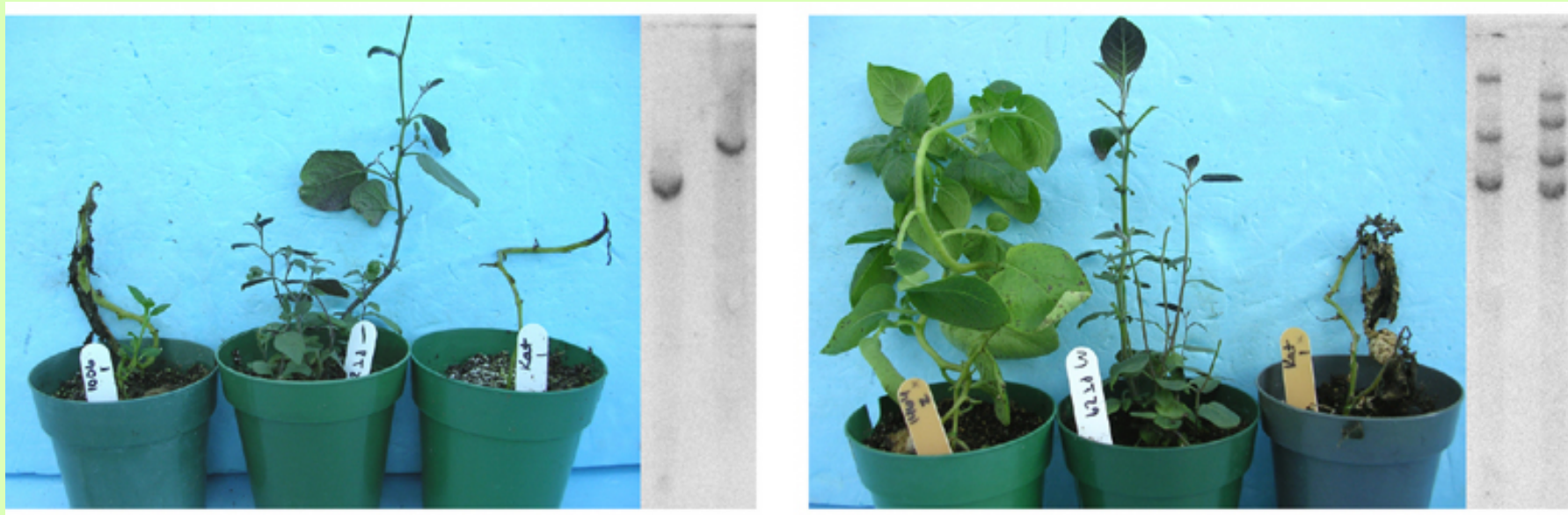
- соматическая гибридизация;
- трансформация геном *Rpi-blb1*;
- половая гибридизация (удобнее с *S. stoloniferum*);
- новые угрозы - формы *P. infestans* (13\_A2, или “Blue\_13”), преодолевающие *Rpi-blb1*-устойчивость;
- пирамидирование *Rpi* генов *S. bulbocastanum*;
- новый набор дифференциаторов для идентификации *Rpi* генов на основе ГМ форм сорта Desiree.

# ТРАНСФОРМАЦИЯ КАРТОФЕЛЯ ГЕНОМ УСТОЙЧИВОСТИ *RPI-BLB1*



Трансгенный сорт картофеля *Première* через три недели после заражения в июле 2008 г. Слева – контрольные растения (Havercort et al., 2009).

# УСТОЙЧИВОСТЬ КАРТОФЕЛЯ, ТРАНСФОРМИРОВАННОГО ГЕНОМ *RPI-BLB1*, ЗАВИСИТ ОТ ДОЗЫ ГЕНА



Слева – одна доза гена; справа множественная доза гена. Растения после заражения. В каждом блоке слева – растения сорта Katahdin, трансформированные *Rpi-blb1*; в центре растения *S. bulbocastanum* клон PT29; справа – контрольное растение Katahdin (Bradeen et al., 2009).

## УСТОЙЧИВОСТЬ ГИБРИДОВ *RB*-ТРАНСГЕННЫХ И НЕТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ



(g) *Solanum bulbocastanum* PT29, (h) клон Atlantic x RB-Katahdin SP904, (i) клон Atlantic x RB-Katahdin SP951, (j) клон Atlantic x RB-Katahdin SP951, (k) клон Granola x RB-Katahdin SP904), (l) клон Granola x RB-Katahdin SP951 (Ambarwati et al., 2011).

## **ДЛЯ ЧЕГО СОЗДАВАЛИСЬ МАРКЕРЫ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОФТОРОЗУ**

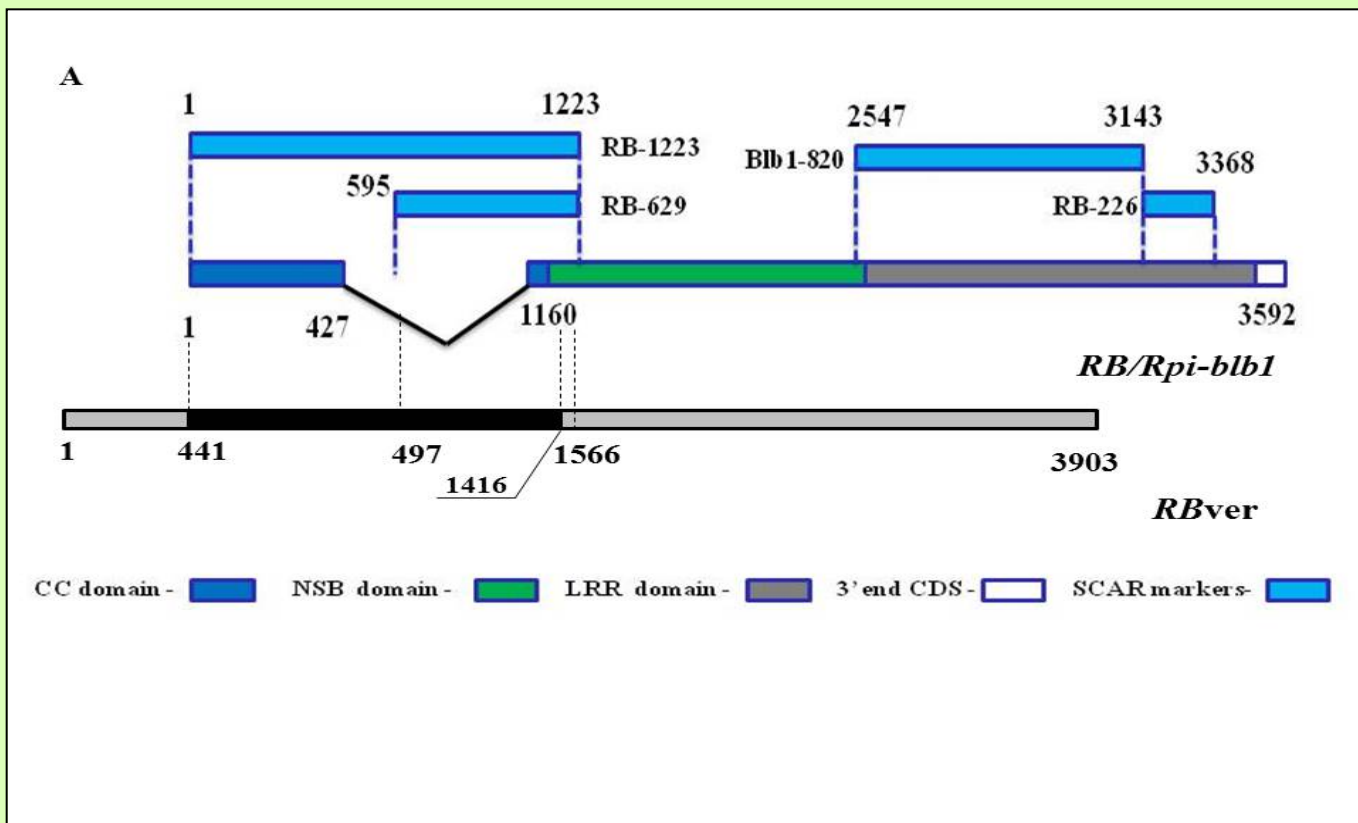
**Скрининг генетических коллекций для выявления потенциальных источников и доноров *R* генов.**

**Поиск новых гомологов *R* генов и их выделение.**

**Мониторинг гибридов и сегрегантов в процессе селекции.**

**Контроль подлинности сортов, несущих *R* гены.**

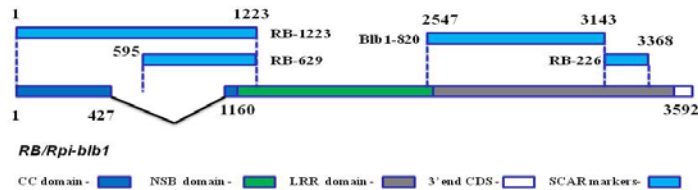
# МАРКЕРЫ ГЕНА *RB/Rpi-blb1* И ЕГО ГОМОЛОГОВ



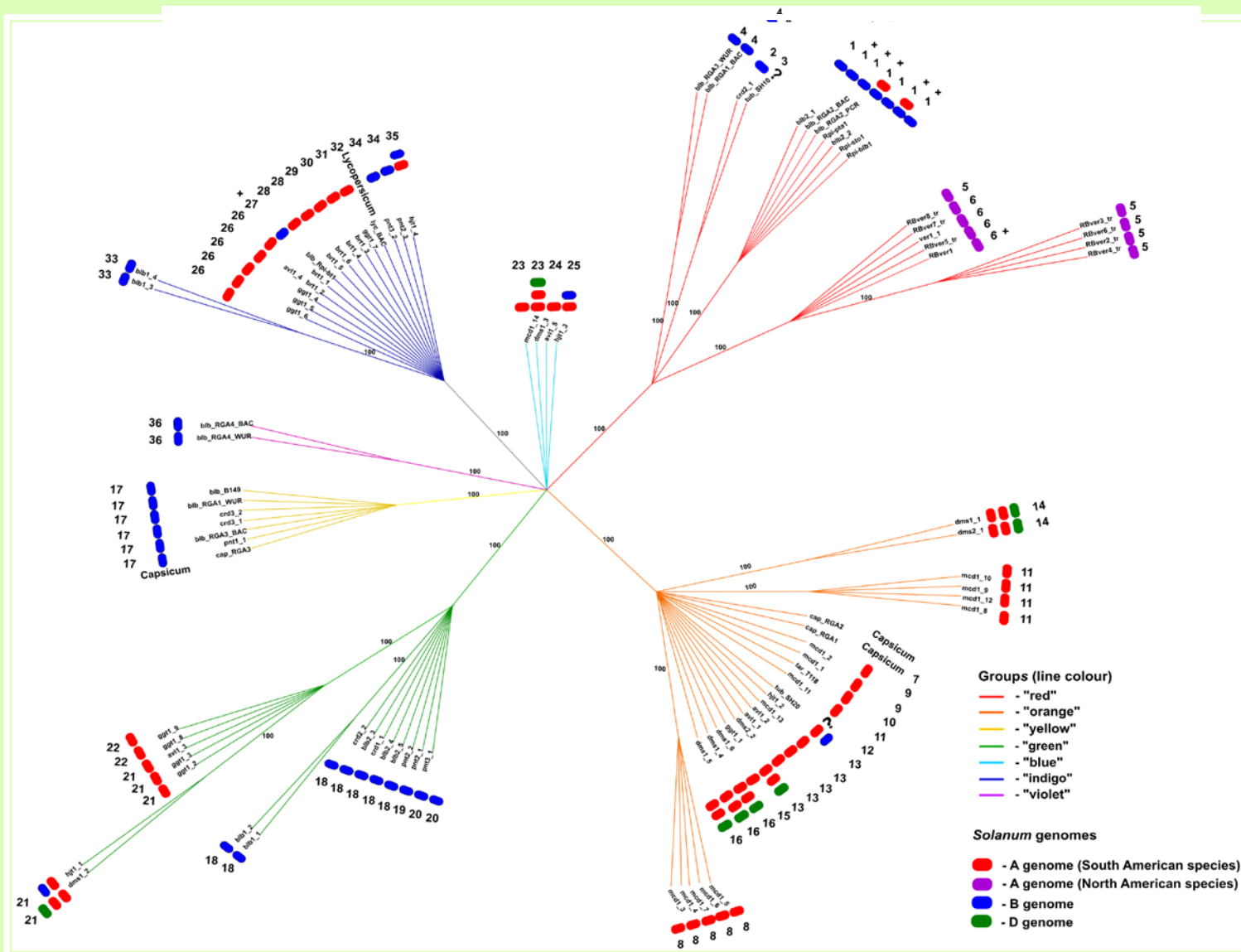
Положение маркеров, распознающих функциональный ген *RB/Rpi-blb1*. Цветом обозначены домены соответствующей рецепторной киназы. На рисунке А сходная область *RBver* с *Rpi/blb-1* обозначена прямоугольником серого цвета с черной обводкой, черный прямоугольник - область несоответствия.

## МАРКЕРЫ ГЕНА *RB/Rpi-blb1* У ВИДОВ *SOLANUM*

Маркеры RB-226 и Blb-820 соответствуют функциональному гену, маркеры RB-629 и RB-1223 обнаруживают также его структурные гомологи с неизвестной функцией (Fadina et al., in preparation).



| Геном | Функц. ген | Виды <i>Solanum</i>     | RB-629 | RB-226 | Blb-820 | Устойч., баллы |
|-------|------------|-------------------------|--------|--------|---------|----------------|
| B     | +          | <i>S. bulbocastanum</i> | 1      | 1      | 1       | 9              |
|       |            |                         | 0      | 0      | 0       | 9              |
|       |            |                         | 0      | 0      | 0       | 1              |
| A1B   | +          | <i>S. stoloniferum</i>  | 1      | 1      | 1       | 9              |
|       |            |                         | 1      | 0      | 0       | 9              |
|       |            |                         | 1      | 0      | 0       | 2              |
| A1    | +          | <i>S. verrucosum</i>    | 1      | 0      | 0       | 8              |
| B     | -          | <i>S. cardiophyllum</i> | 0      | 0      | 0       | 8              |
| B     | -          | <i>S. pinnatisectum</i> | 0      | 0      | 0       | 9              |



Гомологи гена *RB*. Цвета ветвей различают кластеры, выделенные на основе полиморфизма маркера RB-1223, цвета овалов – геномы *Solanum*. Знаком “+” отмечены гены устойчивости к *P. infestans* (Pankin et al., in preparation) .

# КАКИЕ ГЕНЫ МОГУТ СТОЯТЬ ЗА УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ФИТОФТОРОЗУ

| Геном | Вид <i>Solanum</i> ;<br>устойчивость,<br>баллы | SCAR маркеры,<br>кроме <i>Rpi-blb1</i> ,<br>в<br>исследованных<br>нами клонах | Данные из других источников                                  |                                                                           |                                                           |                                                                           |
|-------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
|       |                                                |                                                                               | SCAR<br>маркеры в<br>других<br>генотипах                     | Клониро-<br>вание                                                         | Козэкспрессия<br>в <i>N.<br/>benthamiana</i>              | Трансформа-<br>ция<br>картофеля                                           |
| B     | <i>S. bulbocastanum</i> ; 9                    | <i>R3a, R3b</i>                                                               | <i>Rpi-blb1</i> ,<br><i>R2/Rpi-blb3</i> ,<br><i>R3a, R3b</i> | <i>Rpi-blb1</i> ,<br><i>Rpi-blb2</i> ,<br><i>Rpi-blb3</i> ,<br><i>R3a</i> | <i>Rpi-blb1</i> ,<br><i>Rpi-blb2</i> ,<br><i>Rpi-blb3</i> | <i>Rpi-blb1</i> ,<br><i>Rpi-blb2</i> ,<br><i>Rpi-blb3</i> ,<br><i>R3a</i> |
| B     | <i>S. bulbocastanum</i> ; 9                    | Нет данных                                                                    |                                                              |                                                                           |                                                           |                                                                           |
| B     | <i>S. bulbocastanum</i> ; 1                    | Нет данных                                                                    |                                                              |                                                                           |                                                           |                                                                           |
| A1B   | <i>S. stoloniferum</i> ; 9                     | <i>R1, R3b</i>                                                                | <i>Rpi-blb1, R1</i> ,<br><i>R3a, R3b</i>                     | <i>Rpi-blb1</i> ,<br><i>R3a</i>                                           | <i>Rpi-blb1</i> ,<br><i>R3a</i>                           | <i>Rpi-blb1, R3a</i>                                                      |
| A1B   | <i>S. stoloniferum</i> ; 9                     | <i>R3a, R3b</i>                                                               |                                                              |                                                                           |                                                           |                                                                           |
| A1B   | <i>S. stoloniferum</i> ; 2                     | <i>R3b</i>                                                                    |                                                              |                                                                           |                                                           |                                                                           |
| A1    | <i>S. verrucosum</i> ; 8                       | Нет данных                                                                    | <i>RBver, R3b</i>                                            | <i>RBver</i> ,<br><i>R2/Rpi-blb3</i>                                      | <i>RBver</i>                                              | <i>RBver</i>                                                              |
| B     | <i>S. cardiophyllum</i> ; 8                    | <i>R3b</i>                                                                    | <i>R3a, R3b</i>                                              | <i>R3a</i>                                                                | Нет данных                                                | Нет данных                                                                |
| B     | <i>S. cardiophyllum</i> ; 4                    | <i>R3b</i>                                                                    |                                                              |                                                                           |                                                           |                                                                           |
| B     | <i>S. pinnatisectum</i> ; 9                    | Нет данных                                                                    | <i>R2/Rpi-blb3</i> ,<br><i>R3b</i>                           | <i>R2/Rpi-blb3</i>                                                        | Нет данных                                                | Нет данных                                                                |

## ВЫВОДЫ

- Ген *RB/Rpi-blb1* найден только в геноме В видов *S. bulbocastanum* и *S. stoloniferum*. По всей видимости, геном В *S. stoloniferum* происходит от *S. bulbocastanum*, а не от видов серии Pinnatisecta.
- Помимо *RB/Rpi-blb1*, устойчивость к фитофторозу *S. bulbocastanum* и гибридов с участием этого вида может определяться присутствием, по меньшей мере, трех других расоспецифичных генов: *Rpi-blb1*, *Rpi-blb2*, *Rpi-blb3* и *R3a*.
- SCAR маркеры RB-226 и Blb-820, соответствующие LRR участку *Rpi-blb1*, по всей видимости, обнаруживают функциональный ген и пригодны для решения самых различных генетических и селекционных задач.
- Неспецифичные маркеры RB-629 и RB-1223 выявляют весь класс генов *RB* и поэтому пригодны для селекционного мониторинга гибридных комбинаций, где только один партнер содержит ген *RB*.
- Наряду с маркерным анализом, на стадии пребридинга важно оценить функциональность гена с помощью *Avr* генов (генов эффекторов) *P. infestans*.

# ЧТО ДАЛЬШЕ?

## «ЭФФЕКТОРОМИКА»

(1) Предварительный поиск *Rpi* генов в генетических коллекциях *Solanum*: инфильтрации листа штаммами *A. tumefaciens*, несущими плазмиды с индивидуальными *Rpi* генами. Батарея эффекторов вместо набора дифференцирующих рас.

(2) Оценка специфичности и функциональности *Rpi* генов в тестах с эффекторами в *Nicotiana benthamiana*:

- коэкспрессия при инфильтрации листа штаммами *A. tumefaciens*, несущими плазмиды с *Rpi* геном и *Avr* геном;
- транзientная комплементация – отделенный лист инфильтрируют *A. tumefaciens*, несущим плазмиду с *Rpi* геном, а затем заражают изолятом *P. infestans* как в стандартном тесте с отделенными листьями.

(3) Новые ГМ сорта-дифференциаторы

## НОВЫЕ МАРКЕРЫ

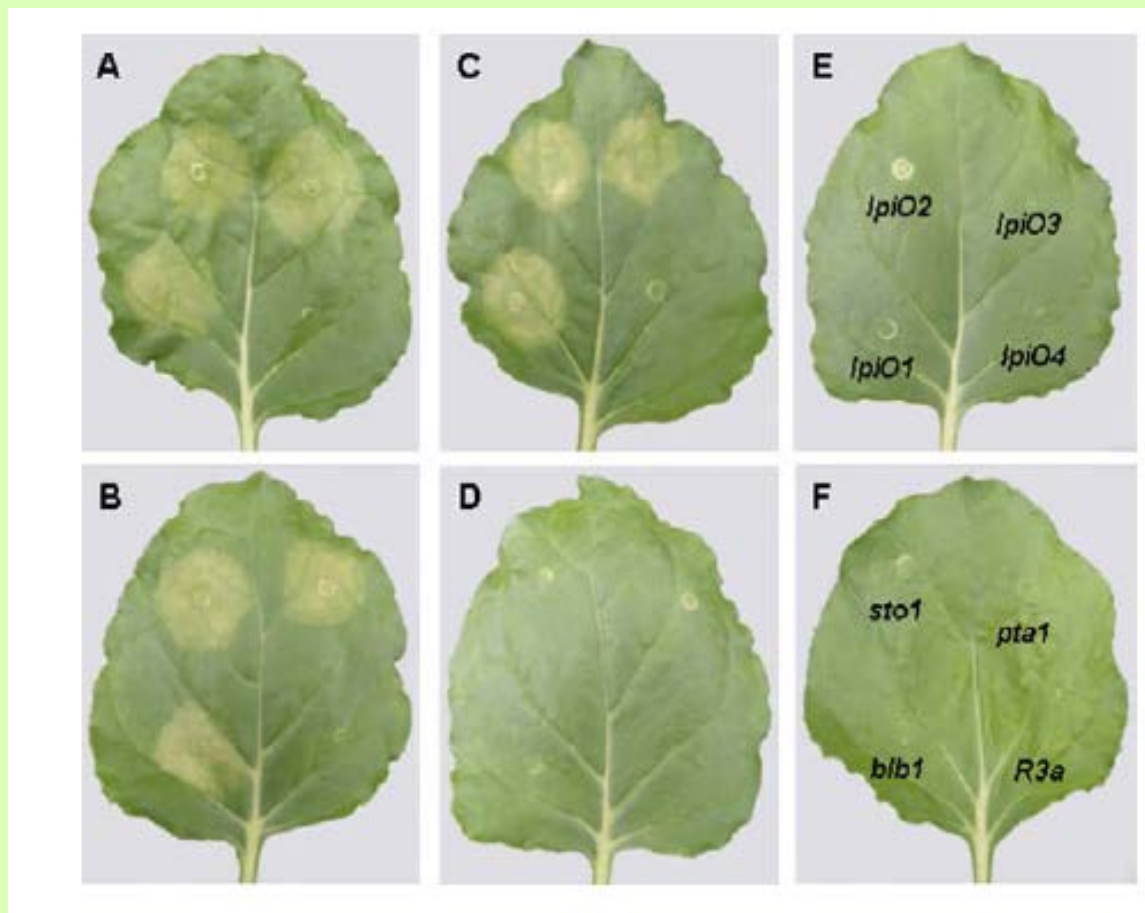
Различение аллелей *Rpi* и *Avr* генов. Двигаемся к barcoding?.

# ОХАРАКТЕРИЗОВАННЫЕ R ГЕНЫ *SOLANUM BULBOCASTANUM* И СООТВЕТСТВУЮЩИЕ AVR ГЕНЫ *P. INFESTANS*

| AVR гены                             | R гены устойчивости к<br>фитофторозу       | Хромо-<br>сома |
|--------------------------------------|--------------------------------------------|----------------|
| <i>Avr2</i>                          | <i>Rpi-blb3/R2</i>                         | IV             |
| <i>lpiO-1</i><br>( <i>Avr-blb1</i> ) | <i>RB/Rpi-blb1 (=Rpi-sto1, = Rpi-ptol)</i> |                |
| ?                                    | <i>Rpi-bt1, RBver</i>                      | VIII           |
| <i>Avr-blb2</i>                      | <i>Rpi-blb2</i>                            | VI             |
| <i>Avr-3a</i>                        | <i>R3a</i>                                 | XI             |

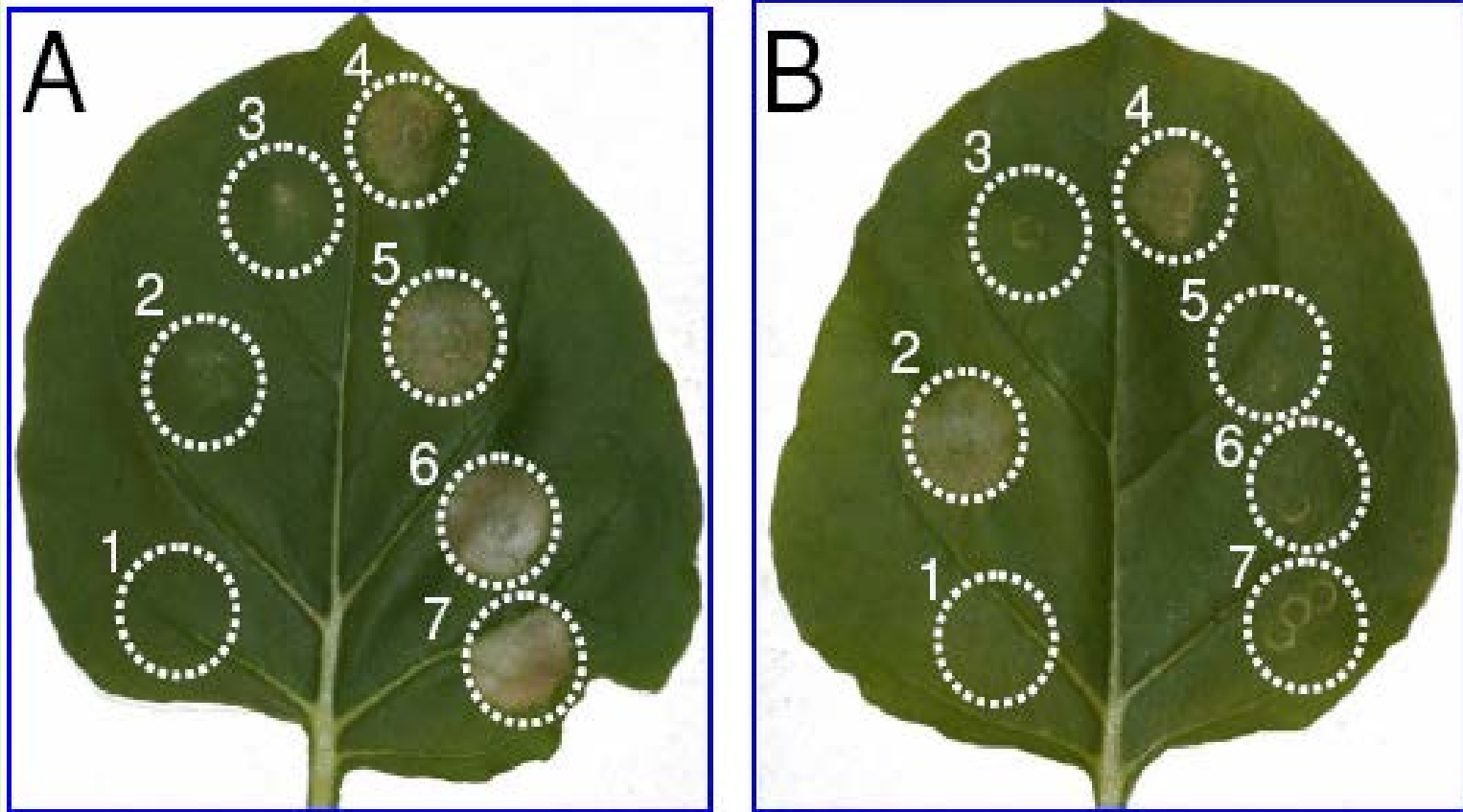
(Vleeshouwers et al., 2011)

# ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ *RPI\_BLB1* с ГЕНАМИ *IPIO* ПРИ КО-АГРОИНФИЛЬТРАЦИИ ЛИСТЬЕВ *NICOTIANA BENTHAMIANA*



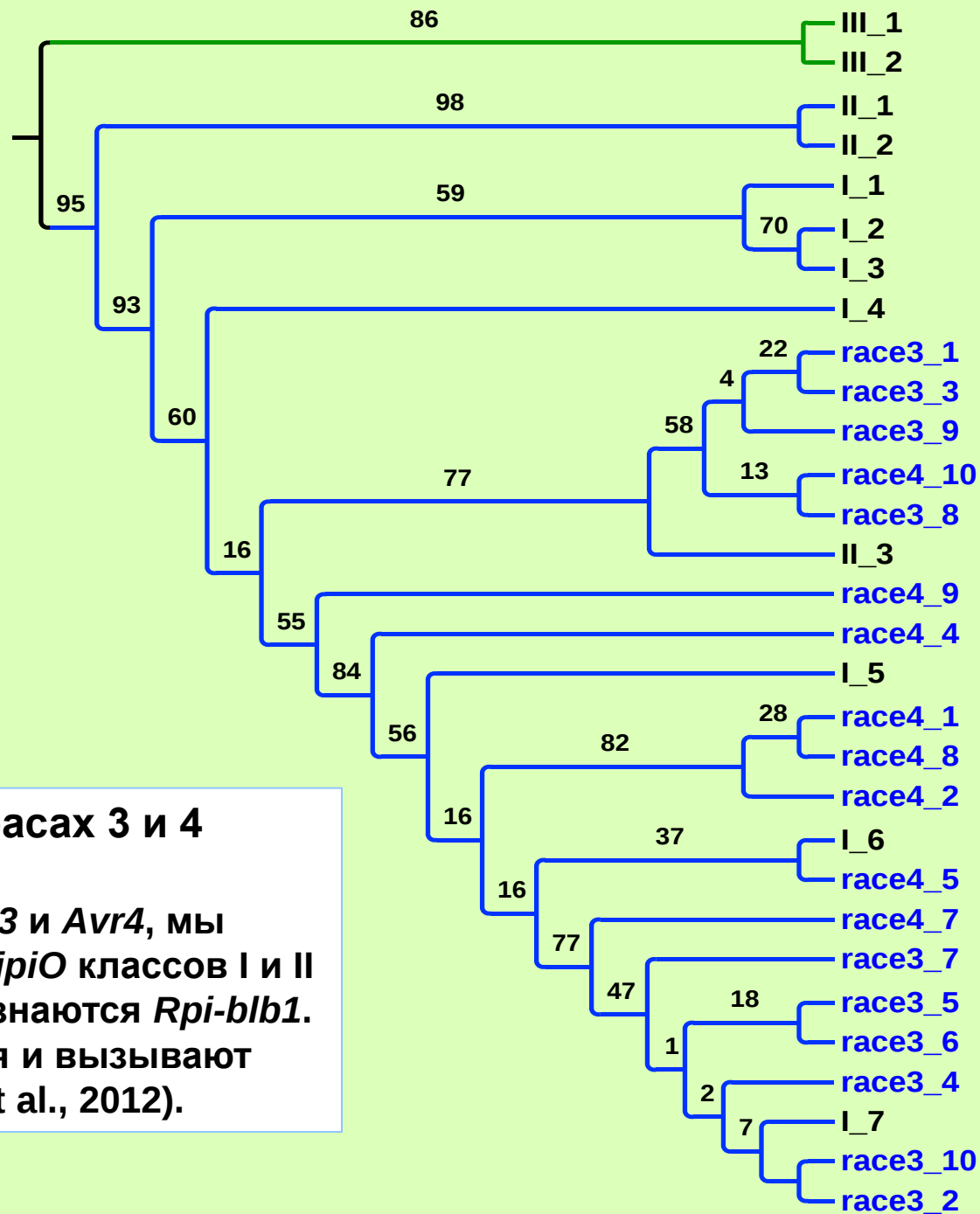
Ортологи *Rpi-blb1* (A), *Rpi-sto1* (B) and *Rpi-pta1* (C) дают реакцию сверхчувствительности при взаимодействии с *iprO* классов I и II. (D) отриц. контроль - ген *R3a*. (E) и (F) – инфильтрация только *iprO* или только *Rpi-blb1* (Champouret et al., 2009).

# КО-ЭКСПРЕССИЯ R-ГЕНОВ И ГЕНОВ ЭФФЕКТОРОВ *P. INFESTANS* как метод функционального анализа генов устойчивости



Специфичность узнавания эффекторов *R3b* и *R3a* в опытах с листьями *Nicotiana benthamiana*. Листья ко-агроинфильтровали различными Avr эффекторами и генами *R3b* (A) и *R3a* (B). 1 – отрицательный контроль (пустая плазмида); 4 – положительный контроль *R3a* + Avr3aKI (Li et al., 2011).

# **AVR-BLB1 (IPIO) ГЕНЫ В РАСАХ *P. INFESTANS***



## **Аллели *IpiO* *P. infestans* в расах 3 и 4**

Помимо ожидаемых генов *Avr3* и *Avr4*, мы находим в расах 3 и 4 аллели *ipiO* классов I и II (синие линии), которые распознаются *Rpi-blb1*. *ipiO* класса III не распознаются и вызывают поражение растений (Pankin et al., 2012).

# НОВЫЙ МОНОГЕННЫЙ НАБОР ГМ-ДИФФЕРЕНЦИАТОРОВ

| Name       | Genotype  | <i>R</i> gene     | <i>R</i> gene donor | Donor species           | Matching effector |
|------------|-----------|-------------------|---------------------|-------------------------|-------------------|
| DSD-R1     | A(10-2-4) | <i>R1</i>         | MaR1                | <i>S. demissum</i>      | <i>Avr1</i>       |
| DSD-blb3   | A03-142   | <i>Rpi-blb3</i>   | blb99-256-3         | <i>S. bulbocastanum</i> | <i>Avr2</i>       |
| DSD-R3a    | A04-33    | <i>R3a</i>        | SW8540-025          | <i>S. demissum</i>      | <i>Avr3a</i>      |
| DSD-R3b    | A25-11    | <i>R3b</i>        | SW8540-325          | <i>S. demissum</i>      | <i>Avr3b</i>      |
| DSD-sto1   | A09-277   | <i>Rpi-sto1</i>   | sto389-4            | <i>S. stoloniferum</i>  | <i>Avr-blb1</i>   |
| DSD-blb1   | A01-20    | <i>Rpi-blb1</i>   | blb8005             | <i>S. bulbocastanum</i> | <i>Avr-blb1</i>   |
| DSD-pta1   | A23-43    | <i>Rpi-pta1</i>   | Pta767-1            | <i>S. papita</i>        | <i>Avr-blb1</i>   |
| DSD-blb2   | A02-33    | <i>Rpi-blb2</i>   | blb2002             | <i>S. bulbocastanum</i> | <i>Avr-blb2</i>   |
| DSD-vnt1.1 | A13-13    | <i>Rpi-vnt1.1</i> | vnt367-1            | <i>S. venturii</i>      | <i>Avr-vnt1</i>   |
| DSD-chc1   | A17-27    | <i>Rpi-chc1</i>   | chc543-5            | <i>S. chacoense</i>     | <i>Avr-chc1</i>   |

DSD: differential set Desiree

(Zhu et al., 2013)



**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!**