



Лекция 13. Тема: “Методы создания устойчивых к болезням сортов зерновых культур”.

Вопросы:

1. Применение маркированных признаков пшеницы для создания устойчивых сортов.
2. Технология QTL и ее применение в фитопатологии.
3. Создание устойчивых к болезням сортов. Международная классификация по определению устойчивости к болезням.

Молекулярные маркеры

Молекулярные маркеры – это генетические маркеры, анализируемые на уровне ДНК (синоним – ДНК-маркеры). ДНК-маркеры являются третьим поколением генетических маркеров.

ДНК-маркерам предшествовали **белковые маркеры**, а еще ранее – **классические генетические маркеры**.

Классический **генетический маркер** соответствует **гену**, аллели которого имеют четко выраженные отличия на уровне фенотипа.

Белковый маркер соответствует **гену**, аллели которого имеют отличия (разную молекулярную массу) на уровне белкового продукта.

Молекулярно-генетические маркеры (МГМ)

Молекулярно-генетические маркеры - полиморфный признак, выявляемый методами молекулярной биологии на уровне нуклеотидной последовательности ДНК для определенного гена или для любого другого участка хромосомы при сравнении генотипов различных особей, пород, сортов, линий.

Молекулярно-генетический маркер представляет собой систему из двух факторов.

Первый фактор - это уникальная последовательность нуклеотидов, позволяющая точно маркировать определенный участок хромосомы.

Второй фактор - это наличие вблизи от заданного участка хромосомы какого-либо элемента внутривидового (или межвидового) полиморфизма. Это могут быть однонуклеотидные полиморфные замены (SNP - Single-Nucleotide Polymorphism), **короткие tandemные повторы** (STR - Short Tandem Repeats) или полиморфные инсерции ретроэлементов (RIP - Retrotransposon Insertion Polymorphisms).

В популяционно-генетическом анализе используются только генетические маркеры, являющиеся полиморфными. Различные МГМ находят широкое применение в генетике человека и животных. При выборе молекулярно-генетических маркеров для исследований должен приниматься во внимание как уровень сложности процесса генотипирования, так и их информативность, включая геномную локализацию, эволюционную нейтральность изучаемых мутаций и количество аллельных вариантов.

Роль молекулярных маркеров в современной генетике

Молекулярные маркеры дают возможность составить подробные молекулярные карты десятков видов растений и животных. Картированы гены, определяющие рост и развитие организмов, морфологические признаки, устойчивость к заболеваниям и другие свойства.

Молекулярные маркеры широко используются в популяционной генетике, сравнительной генетике и геномике, в филогенетических исследованиях.

Молекулярные маркеры расширили возможности молекулярной, медицинской диагностики, способствовали развитию методов паспортизации сортов растений и пород животных. Молекулярные маркеры значительно ускоряют процесс селекции.

Молекулярные маркеры

В настоящее время насчитывается несколько десятков типов молекулярных маркеров. ДНК-маркеры разделяют на три группы, согласно основному методу анализа:

Маркеры, исследуемые с помощью:

- блот-гибридизации;
- ПЦР;
- ДНК-чипов.

Основные классы молекулярных маркеров

AFLP (amplified fragment length polymorphism) – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов.

CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) – расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности.

DArT (diversity array technology) – ДНКчип технология для изучения разнообразия.

IRAP (interretrotransposon amplified polymorphism) – полиморфизм амплифицированных последовательностей между ретротранспозонами.

ISSR (inter simple sequence repeats) – межмикросателлитные последовательности.

RAPD (random amplified polymorphic DNA) – случайно амплифицированная полиморфная ДНК

Схематическая классификация молекулярных маркеров

В настоящее время насчитывается несколько десятков типов молекулярных маркеров. **Маркеры разделяют на три группы**, согласно основному методу анализа:

Метод исследования	Моноклусные	Мультилокусные
Блот-гибридизация	RFLP, 1980	Минисателлиты, 1985
Полимеразная цепная реакция, ПЦР	SSR, 1989 SSCP, 1989 CAPS, 1993 SCAR, 1993	RAPD, 1990 ISSR, 1994 AFLP, 1995 SSAP, 1997 IRAP, 2006
ДНКчипы	SNP	DArT, 2001

Молекулярные маркеры

RFLP (restriction fragment length polymorphism) – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов.

SCAR (sequence characterized amplified region) – амплифицированная область, охарактеризованная нуклеотидной последовательностью.

SNP (singlenucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм.

SSAP (sequencespecific amplification polymorphism) – полиморфизм сиквенспецифичной амплификации.

SSCP (single strand conformation polymorphism) – полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК.

SSR (simple sequence repeats) – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты).

STS (sequence tagged site) – сайт/локус, маркированный нуклеотидной последовательностью.

Технология QTL

Метод QTL - картирования локусов количественных признаков. QTL изучает генетическую изменчивость.

QTL является локусом, который коррелирует с вариацией количественного признака в фенотипе популяции.

QTL картируют при помощи молекулярных маркеров - AFLP и SNP.

QTL обнаруживают на разных хромосомах. QTL указывает на то, какие признаки контролируются многими генами небольшого действия или несколькими генами большого действия. Один фенотипический признак, как правило, обычно определяется многими генами, поэтому многие QTL связаны с одним признаком. QTL используют при идентификации генов-кандидатов, лежащих в основе признака. Участок ДНК идентифицированный как вносящий вклад в фенотип секвенируют. Последовательность ДНК любых генов в этой области сравнивают с базой данных ДНК для генов, функция которых уже известна.

Картирование QTL, дает возможность определить хозяйственно ценные признаки, для их эффективного использования в маркер-вспомогательной селекции и его применяют для улучшения

Построение молекулярных карт отдельных хромосом и геномов, картирование на них генов, локусов количественных признаков (QTL) стало возможно в разработал первые монолокусные генетические маркеры на основе анализа полиморфизма ДНК, ПДРФ именно полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. Это с их помощью можно проводить построение генетических карт.

Картирование гена – определение группы сцепления и положения картируемого гена относительно других генов и маркеров данной хромосомы.

QTL (quantitative trait locus) – локус, связанный с определением количественного признака.

Методы селекции, основанные на использовании ДНК-маркеров

Методы разделяют на две основные группы:

ОПМ и геномная селекция.

ОПМ – отбор с помощью маркеров (синонимы: МАС - маркер-ассоциированная селекция и МОС - маркеропосредованная селекция).

Эти подход в селекции растений и животных, позволяют проводить отбор по генотипу при использовании ДНК-маркеров, сцепленных с селективируемым геном.

Геномная селекция. Метод современной селекции растений и животных, позволяющий проводить отбор по генотипу в отсутствие данных о генах, влияющих на признак с помощью равномерно распределенных по геному ДНКмаркеров.

МЕТОДЫ УЧЕТА УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

Устойчивость сортов определяют по трем основным показателям:

- внешним признакам проявления реакции растения на заражение патогеном;
- интенсивности проявления;
- потерям урожая от болезни.

В качестве контроля используют восприимчивые растения. По проявлению на них признакам судят о состоянии патологического процесса.

При выявлении иммунных форм растений применяется только один качественный показатель — наличие или отсутствие поражений (или повреждений).

Иммунность может проявляться в отношении отдельных рас патогена. Устойчивость характеризуется количественными показателями. Ее степень выявляют разными методами.

Методы учета устойчивости растений

1. Методы учета пораженности растений по типу реакции.
2. Методы учета степени поражения (или повреждения).
3. Методы учета степени вредоносности.
4. Методы учета устойчивости растений по физиолого-биохимическим изменениям в их тканях.

Косвенные методы оценки устойчивости.

При отборе устойчивых родительских и гибридных форм учитывают реакцию на заражение, которую определяют специальными диагностическими методами:

серологический, метод включений, электронная, люминисцентная и световая микроскопия, индикаторный метод и др.

Ведут учет косвенных показателей, находящихся в коррелятивной зависимости с признаком устойчивости. Так, отбор гибридных семей яровой пшеницы, устойчивых к головне, проводят по косвенному коррелятивному признаку — высокой всхожести.

Этот показатель используют при выделении устойчивых растений сахарной свеклы и др. культур.

Основные направления в селекции на устойчивость

Три традиционных подхода:

- селекцию на полную устойчивость (вертикальную);
- селекцию на средний уровень долговременной устойчивости (горизонтальную);
- селекцию на толерантность (выносливость к болезни).

Селекция на полную устойчивость заключается в создании **моногенных, конвергентных, многолинейных сортов** и возделывании мозаики сортов.

Моногенные сорта - защищены единичными сильными генами, характеризуются кратковременной устойчивостью. Она эффективна примерно на протяжении 5 лет.

Конвергентные сорта, имеют несколько генов вертикальной устойчивости, сохраняют длительное время, т.к. несколько генов устойчивости патогену преодолеть труднее.

Многолинейный (мультилинейный) сорт – это популяция из нескольких линий, однородных по агрономическим свойствам, но имеющих разные гены устойчивости. Многолинейный сорт получают, смешивая семена нескольких составляющих его изогенных линий.

Основные направления в селекции на устойчивость

Конвергентные сорта, имеющие несколько генов вертикальной устойчивости, сохраняют ее более длительное время, т.к. несколько генов устойчивости патогену преодолеть труднее.

Вначале выводят чистые линии, устойчивость которых определяется разными факторами. Затем, путем скрещивания линий друг с другом, комбинируют гены устойчивости. Считается: чем больше генов устойчивости содержит сорт, тем менее вероятно возникновение расы, способной поразить его.

Беккроссная селекция

Беккроссная селекция на основе ОПМ (отбор с помощью маркеров) – метод селекции, в процессе последовательных возвратных скрещиваний: передаются 1-2 целевых гена от сорта донора сорту реципиенту и происходит восстановление генотипа сорта реципиента в оставшейся части генома; при этом отбор растений для каждого последующего скрещивания осуществляется с помощью ДНКмаркеров

Линейная селекция на основе ОПМ

Линейная селекция на основе ОПМ с однократным генотипированием – метод селекции, отличающийся от традиционного метода линейной селекции (или метода педигри) тем, что в одном из ранних поколений с помощью маркеров проводится отбор растений для дальнейшей селекции, что позволяет сразу исключить нежелательные генотипы по некоторым признакам и тем самым существенно сократить объем последующих работ.

Например, в случае одного основного гена, по которому ведется отбор, можно в поколении F₂ исключить из дальнейшего анализа 75 % (3/4) нежелательных генотипов, в случае 2 генов – 94 % (15/16) нежелательных генотипов, в случае 3 генов – 98 % (63/64).

Создание пирамид генов

Создание пирамид генов – метод селекции, при котором при помощи ДНКмаркеров отбор ведут одновременно по нескольким генам, определяющим схожие признаки: отбор по нескольким генам, определяющим устойчивость к разным расам одного и того же патогена или устойчивость к разным патогенам, поражающим один и тот же орган (как правило, отбор по фенотипу затруднен)

Молекулярное исследование флоровских генов устойчивости — несравненно более трудная задача, чем исследование генов авирулентности паразитов. Продукты генов устойчивости, — гипотетические рецепторы, не известны и не могут служить молекулярными зондами, подобно белку — специфическому элиситору *Cladosporium fulvum*. Огромный размер генома высших растений делает невозможным выделение гена устойчивости такими методами, как тотальная проверка клонов из библиотеки генов. Поскольку не известно, увеличивается ли экспрессия R-генов при заражении, к их изучению неприменимы методы, связанные с выделением фазоспецифических фракций мРНК. Поэтому к клонированию R-генов и изучению структуры их продуктов ученые шли более сорока лет, и появившиеся к середине 90-х гг. прошлого столетия первые сообщения на эту тему вызвали большой интерес.

Молекулярные методы, использующиеся для исследования взаимоотношений растений и их паразитов

Для изоляции генов устойчивости из разных растений применяются следующие методы и их сочетания:

1. Использование видов растений, имеющих небольшой размер генома, таких как лен и, особенно, арабидопсис (размер генома *Arabidopsis* составляет 1×10^8 пар нуклеотидов, льна — 7×10^8 пар, пшеницы — $1,7 \times 10^{10}$ пар).

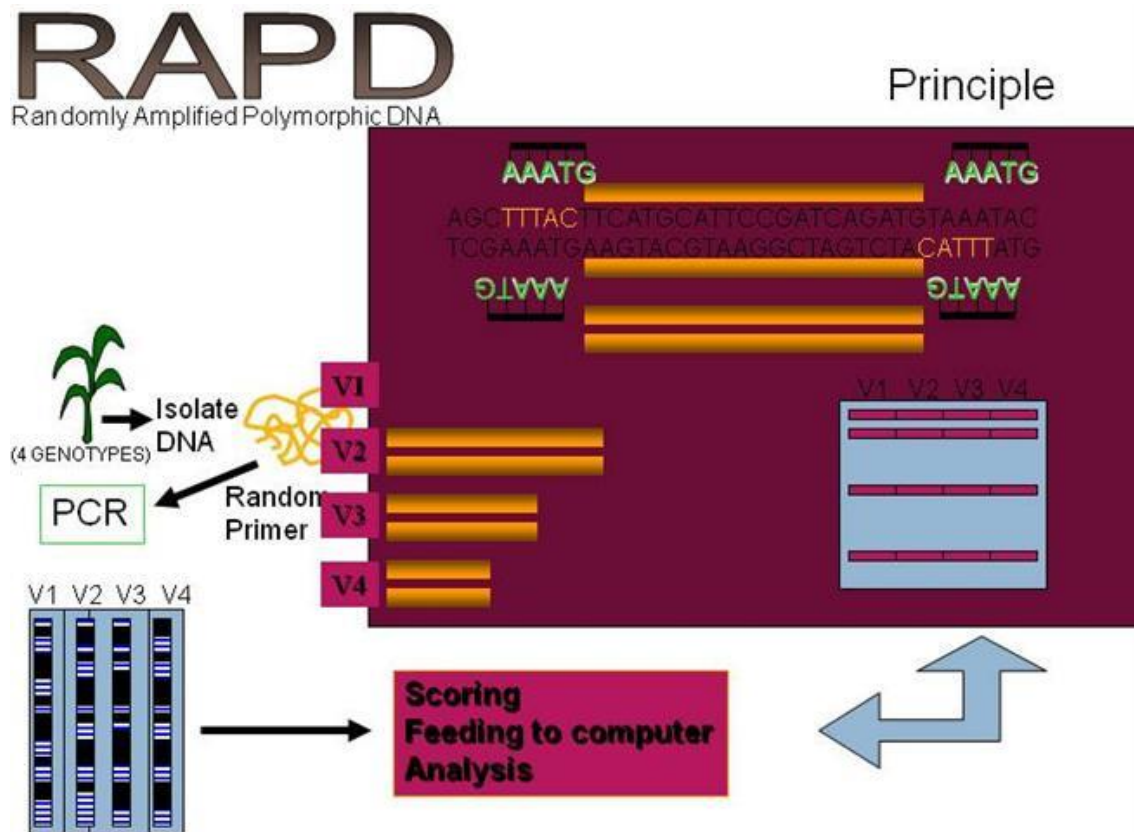
2. Маркирование генов устойчивости перекрывающимися сегментами разрезанной рестрикционными ферментами (рестриктазами) ДНК (RFLP-локусами) в расщепляющемся потомстве F₂.

3. Маркирование локусов устойчивости транспозоновым мутагенезом.

4. Использование радиоактивно меченного специфического элиситора в качестве зонда для выделения рецептора и реконструкция кодирующего гена по структуре его продукта.

Исследователи перед началом эксперимента должны определить, какой тип маркеров использовать исходя из следующих критериев: вариабельность и количество требуемых маркеров, необходимость в их кодоминантности, соответствующие требования к растительному материалу и выделяемой ДНК, размер генома и пloidность таксона; практические – эффективность анализа, стоимость и соответствующее техническое обеспечение. Более того, тенденцией современных исследований с привлечением молекулярных маркеров является использование двух и более типов маркеров (описание типов см. ниже), что приводит к более однозначным, достоверным результатам. Так, для

понимания механизмов устойчивости *V. amurensis* к *Agrobacterium* с помощью **RAPD** маркеров в картирующей популяции винограда был выявлен локус устойчивости, на основе которого были разработаны сопряженные с устойчивостью **SCAR** маркеры. Однако, точную локализацию этих маркеров удалось выяснить с помощью **SSR** маркеров с использованием референсной карты.

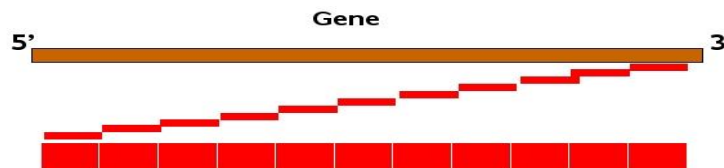


Эволюция молекулярных маркеров идет в направлении повышения разрешающей способности, быстроты, простоты и, по возможности, снижения стоимости анализа. Исследователями сформулированы требования к ДНК маркерам, согласно которым идеальный молекулярный маркер должен отвечать комплексу характеристик: быть высоко полиморфным для выявления генетического разнообразия; иметь кодоминантное наследование, позволяя определять гомозиготное и гетерозиготное состояния диплоидных организмов; маркер должен случайно и часто быть распределен по геному; его проявление должно быть нейтральным (поскольку ДНК последовательности любого организма нейтральны к внешним условиям и осуществляемым процедурам); метод должен быть прост и дешев в использовании; высоко воспроизводим; должен позволять обмен результатами между лабораториями. Наличие нескольких типов маркеров объясняется тем, что ни один из них с высокой степенью не соответствует всей сумме перечисленных критериев. При этом очевидно, что особенности той или иной разновидности молекулярных маркеров обуславливают их более успешное применение для решения тех или иных задач.

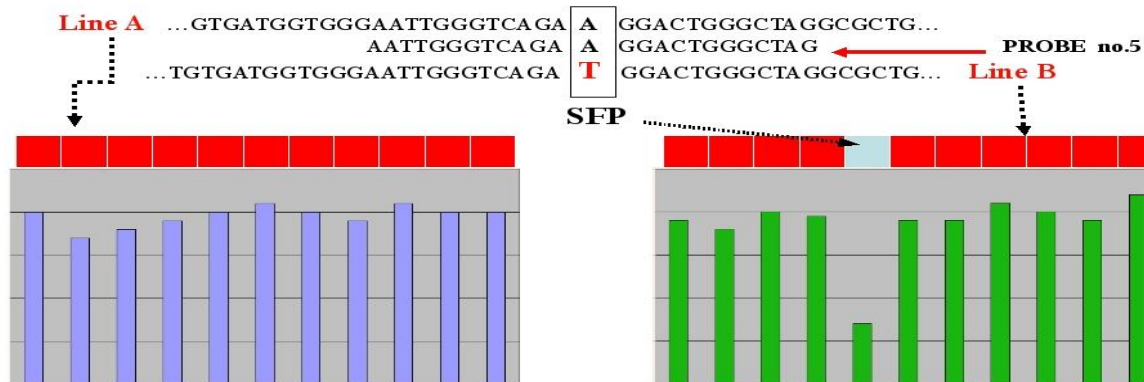
В последние десятилетия разработаны типы молекулярных маркеров, в основу которых положена реакция гибридизации, таких как RFLP, и несколько типов, включающих этап ПЦР (RAPD, AFLP, SSR, SNP, CAPS, SCAR, маркеры на основе ретротранспозонов и др.). В обзоре приведен список наиболее часто используемых молекулярных маркеров, приложения их использования, преимущества и недостатки, а также сравнительная оценка, основанная на ряде признаков. В их числе: требования к количеству и качеству ДНК, количество анализируемых полиморфных локусов, простота использования, возможность автоматизации процесса, воспроизводимость и стоимость.

SFP discovery principle

- 11 probe-features for each gene
- each probe 25 nucleotides long
- thousands of genes (probesets)



Reduced hybridization signal due to polymorphism – sequence variation



RAPD (random amplified polymorphic DNA; амплифицируемые ДНК фрагменты) – метод амплификации ДНК сегментов с использованием случайных праймеров (примерно 10 нуклеотидов) не требует предварительного знания последовательности ДНК, однако вследствие стохастической природы ДНК амплификации важна оптимизация и поддержание соответствующих условий для получения воспроизводимых результатов. Метод используется, например, для изучения близкородственных видов и молекулярной идентичности растений, размножаемых *in vitro*. Недостатками метода являются: доминантность, не очень хорошая воспроизводимость и необходимость высокоочищенной неконтаминированной ДНК, поскольку использование коротких случайных праймеров может приводить к амплификации фрагментов различных организмов; локус-неспецифичность маркеров и негомологичность фрагментов одинакового размера (homoplasy). Вследствие недостаточной воспроизводимости RAPDs сложно использовать в межлабораторных исследованиях. Вследствие вышеупомянутого значимость получаемых результатов и их интерпретация могут подвергаться сомнению.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

В отличие от большинства традиционных ПЦР маркеров, RAPD не требует знания специфических последовательностей генетических локусов. В связи с этим метод, в основном, используется для изучения полиморфизма у тех организмов, где гены не секвенированы, и последовательности ДНК неизвестны. Метод является довольно-таки простым и быстрым.

RAPD основан на использовании набора из нескольких коротких неспецифических праймеров (8-12 нуклеотидов) и амплификации случайных полиморфных фрагментов ДНК, т. е. выявляет полиморфизм случайных ампликонов (ПЦР-продуктов), различающихся по длине последовательностей. Эти маркеры — практически все доминантные, и поэтому с их помощью невозможно отличить гомозиготы и гетерозиготы. Редко встречаются информативные для генетического анализа кодоминантные маркеры.

Для RAPD важна высокая концентрация и хорошее качество исходной геномной ДНК: метод требует длинных фрагментов ДНК в качестве матрицы и не может использоваться в тех случаях, когда ДНК подвергалась деградации. Метод характеризуется невысокой воспроизводимостью, и результаты опытов трудно интерпретировать. Разные наборы RAPD праймеров отличаются по степени специфичности, а полученные с их помощью данные могут интерпретироваться по-разному.

RAPD (Random Amplified Polymorphic Markers)

DNA İzolasyonu



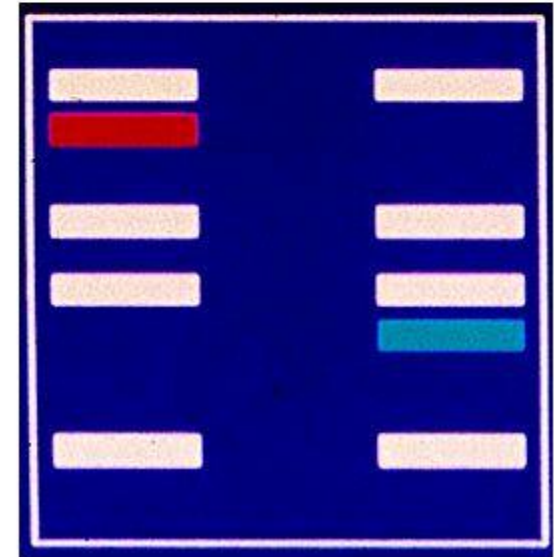
10 bp'lık primerlerle PCR



Agarose gelde ayırım



UV transilluminator ile görüntüleme



SCAR (Sequence Characterised Amplified Region)

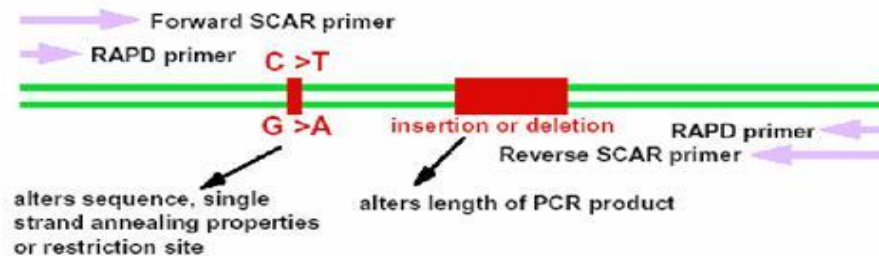
SCAR — это маркеры, разработанные на основе расшифровки последовательностей RAPD маркеров. Для получения этих маркеров полиморфный ПЦР фрагмент, амплифицированный с помощью набора коротких неспецифических RAPD праймеров, выделяют из геля, клонируют и секвенируют. Расшифрованные ДНК последовательности используют для создания новых ПЦР праймеров — более длинных и специфических для данного локуса. С помощью этих праймеров амплифицируется один специфический локус.

SCARs - sequence characterized amplified regions

Development steps

- find a useful RAPD marker, i.e. from genome map or BSA
- clone the RAPD fragment and sequence ends
- design, synthesize & evaluate PCR primer pairs

Type of polymorphism - length or single nucleotide.
Mainly codominant phenotype.



На основе полученных с использованием случайных праймеров RAPD бэндов, их разделения, экстрагирования, клонирования и секвенирования и дизайна специфических праймеров разработан тип маркеров **SCAR** (sequence characterized amplified region, характерная последовательность амплифицируемого участка), развитие и использование которых экспоненциально растет с начала 1990-х годов. Так, разрабатываются специфические SCAR маркеры, позволяющие дискриминировать определенные молекулярные фенотипы различных видов одного рода, используемые в таксономии дискриминирование экотипов, выявление уникальных соматоклональных вариантов и молекулярных событий, сопряженных с вариабельностью соматоклонов. Подобный тип маркеров обладает потенциалом, в селекции позволяет различать определенные патогенные штаммы микроорганизмов и др.

Для длительного сохранения устойчивости сортов применяют:

- создание многолинейных сортов путем скрещивания хозяйственно ценных форм с сортами, несущими разные гены устойчивости, благодаря чему у полученных гибридов не могут накопиться в достаточном количестве новые расы патогенов;
- сочетание в одном сорте R-генов с генами полевой устойчивости;
- периодическая смена сортового состава в хозяйстве, что приводит к повышению устойчивости.

Методы селекции растений

Отбор

Гибридизация

Мутагенез



Внутривидовая
гибридизация

Отдаленная
гибридизация

Беккросс

Массовый
отбор

Индивидуальный
отбор

Гибридизация - процесс получения гибридов.

- Внутривидовая гибридизация - скрещивание о собей одного вида, его подвидов, сортов, поро д или линий.*
- Отдаленная гибридизация - скрещивание особ ей из различных видов или родов.*



Внутривидовая гибридизация

Внутривидовая
гибридизация (между
растениями одного вида)
при создании
устойчивых к болезням
сортов или гибридов в
ряде случаев является
малоперспективным

Отдаленная гибридизация

Устойчивость приобретает
отдаленная гибридная
(между растениями из разных
ботанических таксонов). Ведь
наиболее выраженным
иммунитетом характеризуются
растения дикорастущих и
примитивных видов. Геномы
дикорастущих сородичей
культурных растений были и
остаются основным природным
источником генов устойчивости,

Гибридизация осуществляется с помощью

- метода Педигри
- метода возвратных скрещиваний и т.д.

Необходимо

- один из родителей (или оба) характеризовался полигенным иммунитетом
- информация о закономерностях наследования признаков иммунитета.
- проведение многократного отбора наиболее ценных форм.

Для увеличения устойчивости сортов - методы **насыщающих, или возвратных, скрещиваний** (беккроссов) гибридной популяции с донором – носителем генов иммунитета.

Примеры: гибридизация озимой пшеницы для выведения сортов, иммунных к гессенской мухе, в частности, гибридных сортов “Ponka”, “Omaha”, “Pawnee”, “Warrior” и др. с донором иммунности – сортом “Kawvalle”.

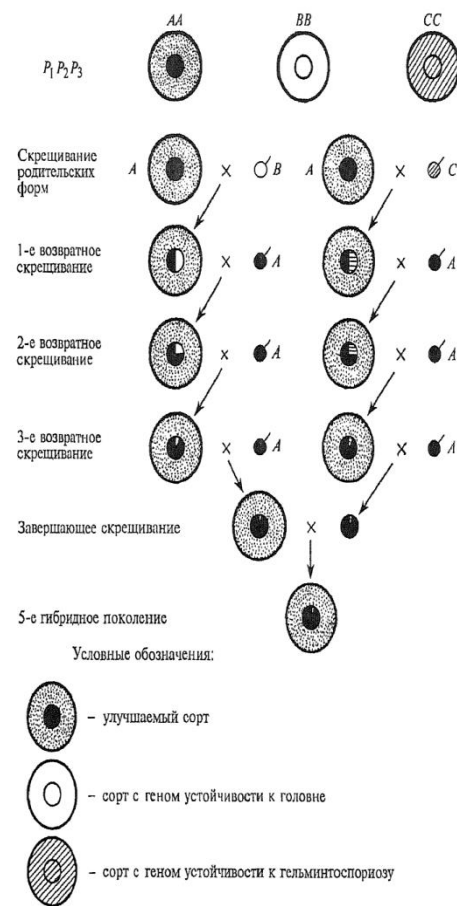


Рис. 40. Схема конвергентных скрещиваний (на примере выведения ячменя с комплексной устойчивостью к пыльной головне и полосатой пятнистости)

Повышение эффективности селекции растений на иммунитет к патогенам может быть достигнуто при использовании предварительно созданных синтетиков иммунитета (известных, например, для кукурузы).

Синтетики создаются на основе скрещивания 8-10 иммунных линий, характеризующихся различной экологической пластичностью и составом факторов иммунитета. Многие из синтетиков – хороший источник для иммунных линий при последующем выведении простых и двойных межлинейных гибридов.

Отбор холодоустойчивых форм

В качестве критерия жизнеспособности растительных клеток использовали состояние их митохондрий, оцениваемое по восстановлению ТТХ. Из каллусов первого пассажа, выдержанных в течение 24 ч при оптимальной (25 °С) и пониженной (3 °С) температуре, экстрагировали продукт восстановления ТТХ - формазан. Поскольку различные органы теплолюбивых растений обладают неодинаковой холодовой чувствительностью, предполагали, что и каллусные линии, полученные из этих органов и сохраняющие эпигенетические особенности, различаются по чувствительности к охлаждению.