

УДК 575.11.113:854.78

А. Є. Солоденко¹, канд. біол. наук, провід. наук. співроб.,О. Є. Александрова¹, аспірант,В. В. Бурлов², аспірант,В. В. Бурлов², д-р біол. наук, голов. наук. співроб.,Ю. М. Сиволап¹, д-р біол. наук, академік НААН України¹ Південний біотехнологічний центр в рослинництві НААН України,

Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна,

e-mail: genome2006@mail.ru

² Селекційно-генетичний інститут — Національний центр насінництва
та сортовивчення НААН України,

Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна

ПЛР-МАРКЕР СТІЙКОСТІ СОНЯШНИКА ДО НЕСПРАВЖНЬОЇ БОРОШНИСТОЇ РОСИ

Оцінено здатність ДНК-маркерів ОРА-02, ОРВ-08, ОРС-20, які зчеплені з геном соняшника *Pl2*, слугувати показниками стійкості соняшника до несправжньої борошнистої роси (НБР), носієм якої є лінія RHA-419. Виявлено ПЛР-маркер ОРА-02_348, що дозволяє ідентифікувати стійкі генотипи соняшника. Проведено гібридологічний аналіз та встановлено генетичну відстань між геном стійкості та маркерним фрагментом ДНК, яка дорівнює 4 сМ.

Ключові слова: соняшник, несправжня борошниста роса, стійкість, ПЛР-маркери.

Соняшник є однією з найважливіших олійних культур в Україні. Під його вирощування виділяється близько половини площ, зайнятих технічними культурами [1]. У 2010 році відведено під посів близько 4,5 млн га [2].

Найбільше зниження врожайності соняшника викликають такі патогенні гриби: несправжня борошниста роса (НБР), альтернарія, септорія, склеротинія та фомосис. НБР — захворювання соняшника, яке спричиняється ооміцетами *Plasmopara halstedii* (Farl.). Створення ліній і гібридів соняшника з генетичною стійкістю до НБР є одним із пріоритетних напрямів селекційних програм [3]. Вирішення такого завдання можливе при використанні досягнень генетики стійкості та створення методів оцінки, відбраковування і добору рослин з певним генотипом. Відомо понад 12 генів стійкості соняшника до різних рас НБР, деякі з котрих знайдені в окремих селекційних лініях, інші — у дикорослих видів *Helianthus* [4]. Домінантні гени, що позначені *Pl*, обумовлюють стійкість до однієї чи декількох рас патогена. Так, наприклад, ген *Pl1* контролює стійкість до раси 100, ген *Pl2* — до рас 100 і 300. Кожен з генів *Pl6*, *Pl7* та *Pl8*, що були виявлені у різних *Helianthus sp.*, забезпечують стійкість проти чотирьох рас НБР (100, 300, 700 та 730) [5]. Ген *Pl_{Arg}*, інтрогресований з *H. argophyllus*, та ген *Pl₁₃*, наявний в генотипі лінії аргентинської селекції HA-R5, надають стійкість до 300, 700, 710, 730 та 770 рас патогена. Нараховується 10 вірулентних патотипів (рас) НБР. Переважними (pre-dominant) расами НБР в країнах Європи та в США є 700, 703, 710, 730 та 770 [6].

Складною проблемою є ідентифікація окремих генів *Pl*. Традиційні методи оцінки, що використовуються в селекційних програмах, не в змозі розрізнити генотипи, які несуть різні доміантні алелі (один чи більше) різних генів *Pl*.

Існує стандартний набір ліній-диференціаторів, які є стійкими проти певної раси (рас) НБР: RHA-265, RHA-274, PM13, PM17, 803-1, HAR-4, HAR-5, QHP-1, HA-335, RHA-419. Ці лінії є носіями доміантних алелів різних генів *Pl* та активно залучаються до інтродукції цих генів в геном культурного соняшника [7].

Завданням селекції соняшника на стійкість до НБР є створення ліній та гібридів, що поєднують у своїх генотипах різні гени *Pl*. Проведення цієї роботи може бути прискорено завдяки використанню сучасних MAS (marker assisted selection) технологій. Запропонована низка ДНК-маркерів, зчеплених з генами *Pl1*, *Pl2* та *Pl6*, які отримані завдяки аналізу поліморфізму рестрикційних фрагментів та поліморфізму довільно ампліфікованої ДНК [8, 9]. Методами молекулярно-генетичного картування доведена належність генів *Pl* до трьох великих, не зчеплених між собою локусів [10]. Для гена *Pl2*, що входить до кластеру *Pl1-Pl2-Pl6-Pl7* і контролює стійкість соняшника до раси 300 НБР, відомо декілька маркерів, тісно зчеплених з ним: маркер OPC-20_831 знаходиться на відстані 2 сМ, маркери OPA-02_630 та OPB-08_730 розташовані на відстані до 10 сМ [11].

Метою даної роботи було оцінити здатність ДНК-маркерів OPA-02, OPB-08, OPC-20 діагностувати стійкість генотипів соняшника до НБР, носієм якої є лінія RHA-419.

Матеріали та методи досліджень

В якості матеріалу для досліджень використано популяцію F₂ (5403/1) від схрещування контрастних за стійкістю до НБР інбредних ліній соняшника, яка створена у відділі селекції олійних культур Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення НААНУ. Материнська форма — інбредна лінія, нестійка до НБР (носій генів *pl* в рецесивному стані) — Н14А. Батьківська форма — інбредна лінія RHA-419, яка є стійкою до усіх pre-dominant рас НБР. Інформація щодо ідентифікації в генотипі батьківської лінії певних генів *Pl* відсутня.

Тестування стійкості до НБР провадили наступним чином: насіння пророщували протягом 2 тижнів. Сім'янки поміщали на смужки фільтрувального паперу по 20—25 сім'янок в кожну. Смужки закручували в циліндри і поміщали у воду, насичену спорами НБР. Після закінчення двотижневого терміну паростки поміщали в умови вологої камери на 12 годин. У цей період на листі з'являлися спорангії в тих випадках, коли рослина виявлялася нестійкою до НБР. Нестійкі рослини визначали завдяки наявності білої поволоки на листі. Виділення рослинної ДНК, ПЛР-аналіз, електрофоретичне розподілення продуктів ампліфікації та документування результатів провадили згідно [11]. Для ампліфікації ДНК використовували праймери, синтезовані у відділі молекулярної генетики Південного біотехнологічного центру. Аналіз зчеплення провадили згідно [12].

Результати досліджень та їх обговорення

Для селекції ліній соняшника, стійких до найбільш розповсюджених рас НБР, необхідно контролювати наявність в їх генотипах доміантних алелів *Pl*, що забезпечують стійкість. Такими генами, за даними літератури, є гени *Pl6*, *Pl7*, *Pl8*, *Pl13*, *Pl_{Arg}*.

Враховуючи, що *Pl6*, *Pl7* та *Pl2* є складовими одного кластеру генів, вважали доцільним оцінити придатність ДНК-маркерів до *Pl2*, розроблених із використанням ліній соняшника французької селекції, діагностувати стійкість до НБР, що забезпечується геном *Pl* генотипу лінії RHA-419.

Для оцінки використали 55 рослин популяції 5403/1. Двотижневі паростки піддавали зараженню в штучних умовах збудниками несправжньої борошнистої роси (культура являє собою суміш pre-dominant патотипів). За даними візуальної оцінки рослини розділили на дві категорії: чутливі (зі спорангіями у вигляді білої поволоки на листях) та стійкі (без спорангіїв). Виявлено 42 (76 %) стійкі рослини та 13 (24 %) чутливих рослин.

За моногенного контролю стійкості очікуване розщеплення в F_2 за фенотипом становитиме 3:1. Фактично отримані дані, що узгоджуються з цим припущенням ($\chi^2 = 0,056$, $P > 0,01$).

Для виділення ДНК використовували частину стебла. Перед початком виділення зразки додатково промивали дистильованою водою. Для проведення ПЛР використовували ДНК рослин популяції 5403/1 та одноланцюгові праймери ОРА-02, ОРВ-08 та ОРС-20 [11].

Ампліфікація ДНК рослин популяції 5403/1 з праймерами ОРВ-08 та ОРС-20 не виявила специфічних фрагментів, що надавали б можливість диференціювати рослини з контрастним проявом стійкості до НБР. Детектовані «мажорні» (чіткі та відтворювані) фрагменти ампліфікованої ДНК були типовими для рослин даної гібридної популяції: як стійких, так і сприйнятливих до НБР.

В спектрах ампліфікації ДНК з праймером ОРА02 детектували фрагмент розміром 348 п. н., що був характерним для генотипів стійких рослин (рис. 1). В спектрах ампліфікації 4 % стійких рослин такого специфічного маркерного фрагмента не знайдено.

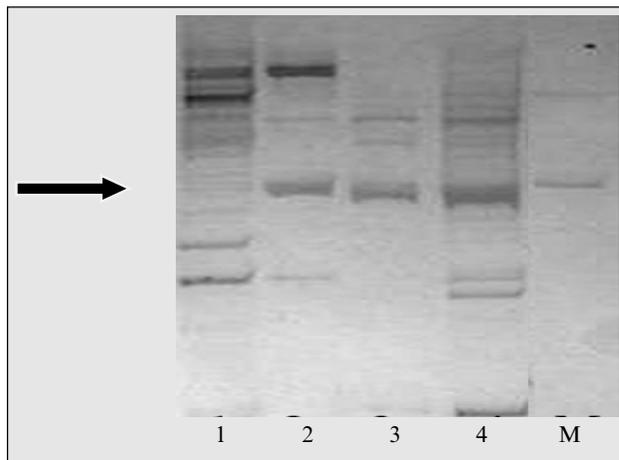


Рис. 1. Спектри ампліфікації ДНК рослин популяції 5403/1:

1 — нестійка рослина, 2—4 — стійкі рослини, М — маркер pGEM (фрагменти 369, 350 п. н.)

На підставі отриманих даних встановлена генетична відстань між геном та маркерним фрагментом, яка дорівнює 4 сМ ($\chi^2 = 0,150$, $P > 0,01$). Така генетична відстань свідчить про тісний зв'язок між геном стійкості *Pl* та ДНК-маркером ОРА02_348, що робить останній придатним для подальшого використання в селекції нових стійких до НБР генотипів соняшника із використанням лінії RNA-419 як джерела стійкості до pre-dominant рас.

Враховуючи, що отриманий в дослідженні [11] маркерний фрагмент ОР-А02_630 зчеплений з геном *Pl2*, який входить до кластеру генів

Pl1/Pl2/Pl6/Pl7, можна припустити, що батьківська рослина RHA419 є носієм цього кластеру домінантних алелів.

Висновки

Отримано ДНК-маркер ОРА-02_348, за допомогою якого можна ідентифікувати генотипи соняшника, для яких джерелом стійкості до несправжньої борошнистої роси слугувала лінія RHA-419. Встановлено генетичну відстань (4 сМ) між локусом *Pl* та маркерним фрагментом ДНК.

Література

1. *Никитчин Д. И.* Подсолнечник, биохимия, селекция, возделывание. — Пологи: Пологівська друкарня, 2002. — 492 с.
2. www.proagro.com.ua/art/4024693.html
3. *Skoric D.* Achievements and future directions of sunflower breeding // *Field Crops Res.* — 1992. — V. 30. — P. 231—270.
4. *Miller J. F.* Update on inheritance of sunflower characteristics // In: *Proc. Int. Sunflower Conf.* (Pisa, Italy, 7—11 Sept., 1992). — 1992. — P. 905—945.
5. *Miller J., Gulya T.* Inheritance of resistance to race 4 of downy mildew derived from interspecific crosses in sunflower // *Crop. Sci.* — 1991. — V. 31. — P. 40—43.
6. *Mulpuri S., Liu Z., Feng J., Gulya T., Jan C.* Inheritance and molecular mapping of a downy mildew resistance gene, *Pl13* in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Theor. Appl. Genet.* — 2009. — V. 119. — P. 795—803.
7. *Jocic S., Cvejic S., Hladni N., Miladinovic D., Miklic V.* Development of sunflower genotypes resistant to downy mildew // *Proc. Int. Sym. «Sunflower Breeding on Resistance to Diseases»* (Krasnodar, Russia, 23—24 June, 2010). — 2010. — P. 93—97.
8. *Mouzeyar S., Roedel-Drevet P., Gentzbittel L., Philippon J., Tourvieille de Labrouhe D., Vear F., Nicolas P.* RFLP and RAPD mapping of the sunflower *Pl1* locus for resistance to *Plasmopara halstedii* race 1 // *Theor. Appl. Genet.* — 1995. — V. 91. — P. 733—737.
9. *Vear F., Gentzbittel L., Philippon J., Mouzeyar S., Mestrie E., Roedel-Drevet P., Tourvieille de Labrouhe D., Nicolas P.* The genetics of resistance to five races of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Theor. Appl. Genet.* — 1997. — V. 95. — P. 584—589.
10. *Roedel-Drevet P., Gagne G., Mouzeyar S., Gentzbittel L., Philippon J., Nicolas P., Tourvieille de Labrouhe D., Vear F.* Colocation of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) resistance genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Euphytica.* — 1996. — V. 91. — P. 225—228.
11. *Brahm L., Rocher T., Friedt W.* PCR-Based Markers Facilitating Marker Assisted Selection in Sunflower for Resistance to Downy Mildew // *Crop Sci.* — 2000. — V. 40. — P. 676—682.
12. *Солоденко А. Е., Саналатий А. В., Толмачев В. В., Ведмедева К. В., Сиволап Ю. М.* Маркирование гена устойчивости к заразице *Or 3* у подсолнечника // *Цитология и генетика.* — 2005. — Т. 39. — № 5. — С. 9—12.
11. *Тихомирова М. М.* Генетический анализ // Ленинград: Изд-во Ленинградского университета, 1990. — 280 с.

А. Є. Солоденко¹, О. Є. Александрова¹, В. В. Бурлов², В. В. Бурлов²,
Ю. М. Сиволап¹

¹ Южный биотехнологический центр в растениеводстве НААН Украины
Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина,
e-mail: genome2006@mail.ru

² Селекционно-генетический институт — Национальный центр семеноведения
и сортоизучения НААН Украины,
Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина

ПЛР-МАРКЕР СТІЙКОСТІ СОНЯШНИКА ДО НЕСПРАВЖНЬОЇ БОРОШНИСТОЇ РОСИ

Резюме

Определена пригодность ДНК-маркеров ОРА-02, ОРВ-08, ОРС-20, которые сцеплены с геном подсолнечника *Pl2*, для диагностики устойчивости подсолнечника к ложной мучнистой росе, носителем которой является линия RHA-419. Проведен гибридологический анализ и определено генетическое расстояние между геном устойчивости и маркерным фрагментом ДНК, которое составляет 4 сМ.

Ключевые слова: подсолнечник, ложная мучнистая роса, устойчивость, ПЦР-маркеры.

A. Solodenko¹, E. Alexandrova¹, V. Burlov², V. Burlov², Yu. Sivolap¹

¹ South Plant Biotechnology Center NAAS of Ukraine,
Ovidiopol'ska str., 3, Odesa, Ukraine,
e-mail: genome2006@mail.ru

² Plant Breeding and Genetics Institute NAAS of Ukraine,
Ovidiopol'ska str., 3, Odesa, Ukraine

PCR MARKER OF SUNFLOWER RESISTANCE TO POWDERY MILDEW

Summary

DNA markers OPA-02, OPB-08, OPC-20 that linked with *Pl2* gene of sunflower were used to test the resistance to powdery mildew. The source of this resistance was differentiator line RHA-419. PCR marker OPA-02_348 was discovered. An linkage between marker ORS1036 and locus *Pl* is defined.

Key words: sunflower, powdery mildew, resistance, polymerase chain reaction, marker.