

ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 575.11.113:854.78

ОЦІНКА СТІЙКОСТІ СОНЯШНИКУ ДО ВОВЧКА РАСИ С ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ

© 2011 р. А. Є. Солоденко

Південний біотехнологічний центр в рослинництві
Національної академії аграрних наук України
(Одеса, Україна)

Гібриди та інбредні лінії соняшнику різного походження з контрастним проявом стійкості до вовчка раси С досліджено за мікросателітними локусами *ORS1036*, *ORS1040*, *ORS1112*, *ORS683*, *ORS1130*, *ORS820*, що локалізовані на третій групі зчеплення генетичної карти геному соняшнику. Аналіз поліморфізму дозволив отримати маркери стійкості соняшнику до вовчка раси С: алелі 242 п.н. та 252 п.н. локусу *ORS1036*. Проведено оцінку ефективності використання отриманих ДНК-маркерів для тестування стійкості соняшнику до вовчка.

Ключові слова: *Helianthus annuus*, *Orobanche crotolaria*, мікросателіти, маркери, стійкість

Ефективність селекції соняшнику значною мірою залежить від попередньої допосівної діагностики генетично детермінованої стійкості до найбільш розповсюджених патогенів. Гібриди соняшнику обов'язково повинні мати стійкість до рослини-паразита – вовчка (*Orobanche crotolaria* Wallr.). Створення інбредних ліній з генетичною стійкістю до вовчка є основною запорукою захисту від поширення паразита та ураження гібридів. Вовчок є рослиною з високим рівнем генетичної мінливості, з чим пов'язана постійна поява нових більш патогенних рас паразита. На даний час в Україні вовчок представлений в основному расою С. В Європі ідентифіковані раси D, E, F, стійкість до яких детермінована окремими генами *Or* (Velasco et al., 2007). Більшістю досліджень підтверджено моногенно-домінантне успадкування стійкості до рас А – Е. Дослідження з генетики стійкості дозволяють вважати, що гени *Or* формують кластер (Fernandes-Martinez et al., 2000).

Сучасна селекція майже неможлива без ефективного використання MAS-технологій (marker assisted selection). За останні роки створено значну кількість ДНК-маркерів для використання у генетико-селекційних програмах (Сиволап, 2008; Созинов, 2008). ДНК-маркери повинні відповідати щонайменше трьом таким вимогам: 1) незначні вартість та трудомісткість, 2) кодомінантний тип успадкування, 3) локалізація на генетичних картах з високою щільністю розміщення маркерів. Саме мікросателітні (simple sequences repeat – SSR) послідовності геномів рослин є найбільш привабливими з точки зору їх застосування в MAS-технологіях. Стійкість соняшнику до вовчка являє собою майже «ідеальну модель» для молекулярної селекції. Підтвердженням тому є низка розроблених RFLP, RAPD та SCAR маркерів (Gentzbittel et al., 1999; Lu et al., 1999; Lu et al., 2000). Аналіз поліморфізму довільно ампліфікованої ДНК рослин популяції F₂ дозволив ідентифікувати п'ять охарактеризованих за своєю послідовністю SCAR-маркерів гена стійкості до вовчка раси Е (*Or5*), що зчеплені з ним на відстані від 5,6 до 22,5 сМ (Lu et al., 2000). Розробка молекулярно-генетичної карти геному соняшнику, що вміщує більш ніж тисячу мікросателітних локусів (Tang et al., 2002; Yu et al., 2003), дозволила спрямувати дослідження з ефективного

Адреса для кореспонденції: Солоденко Анжела Євгенівна, Південний біотехнологічний центр в рослинництві НААН України, Овідіопольська дорога, 3, м. Одеса, 65036, Україна;
e-mail: angelika_solo@yahoo.com

ДНК-маркування генів стійкості *Or* у напрямі використання SSR маркерів. Маркерний до *Or5* фрагмент ампліфікації UBC120_660, отриманий за допомогою довільно праймованої полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та картований на третій групі зчеплення (LG 3) генетичної карти соняшнику (Lu et al., 2000), сконцентрував увагу дослідників на мікросателітних послідовностях з LG 3. За алелями чотирьох мікросателітних локусів, що картовані на LG 3, розрізнили контрастні за станом гена *Or5* рекомбінантні інбредні лінії, отримані від схрещування двох комерційних генотипів соняшнику, що належать Pioneer Hi-Bred International (Tang et al., 2003).

Враховуючи кластеризацію генів *Or*, підтверджену у наших попередніх дослідженнях (Солоденко и др., 2005), вважали доцільною перевірку маркуючої здатності мікросателітних локусів третьої групи зчеплення щодо *Or3*. Метою роботи була ідентифікація мікросателітних маркерів гена *Or3*, що визначає стійкість соняшнику до вовчка раси С.

МЕТОДИКА

Матеріалом для досліджень були 13 інбредних ліній (Оранж, Одол 1, Одеська 391, Одеська 973, Одеська 1318, Одеська 1295, материнські та батьківські форми гібридів Сівер, Ковчег, Ной, Етюд, Дарій) та 29 гібридів, занесених до Реєстру сортів рослин України 2008 р.: Одор, Олівер, Сапфір (селекції Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннезнавства та сортовивчення НААНУ, Одеса); Карат, Сівер, Ясон, Всесвіт, Дарій, Етюд, Ковчег, Ной, Оскіл, Псьол (Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААНУ, Харків); Оберіг, Славутич (Незалежна аграрна індустрія, Запоріжжя); Лакомка, Мастер, Роднік, Флагман (Агро-Інтер, Київ); Онікс, Час (НАУ, Суми); Златибор, Сержан (Нові Сад, Югославія); Іберіко, Латіно (Лімагрейн, Франція); ПР 64 Г 91 (Піонер Холдінг, Австрія); Тайфун (ДНУ, Росія); Макао (Маісадур, Франція); КВС Гелія 06 (КВС, Німеччина); а також лінії селекції Інституту олійних культур НААНУ (ІОК, Запоріжжя) ВА 1 та К 811, контрастні за стійкістю до вовчка (раса С), та популяція F₂ (ВА 1 x К 811).

Для тестування стійкості батьківських форм, а також окремих рослин F₂ і F₃ до вовчка раси С використовували метод (Панченко, 1975). Рослини соняшнику заражували вовчком у ящиках (6×40×15 см) з ґрунтово-пісчаною сумішшю. Оцінку проводили на 25-й день після сходів за інфекційного навантаження 0,2 г на-

сіння вовчка на 1 кг субстрату. Рослини вирощували в умовах 16-годинного світлового дня за температури 24–28°C протягом дня та 18–23°C вночі. За результатами тестування вибірок насіння кожної родини F₃ відносили вихідні стійкі рослини F₂ до гомо- та гетерозиготних за локусом *Or3*.

Виділення рослинної ДНК, ПЛР-аналіз із використанням праймерів, що фланкують мікросателітні послідовності, електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації та документування результатів проводили згідно з (Саналатий и др., 2006). Інформацію про нуклеотидні послідовності праймерів для аналізу мікросателітних локусів, які локалізовані на третій групі зчеплення генетичної карти геному соняшнику, отримали з бази даних (Tang, Кнарр, 2003). Для ампліфікації ДНК використовували праймери, синтезовані у відділі молекулярної генетики Південного біотехнологічного центру.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження гібридів та інбредних ліній соняшнику різного походження з контрастним проявом стійкості до вовчка раси С проводили за SSR локусами *ORS1036*, *ORS1040*, *ORS1112*, *ORS683*, *ORS1130*, *ORS820*, які, за даними Tang et al. (2003), картовані на LG3 на відстані не більш ніж 20,1 сМ від *Or5*. Проаналізовані генотипи не розрізнялися за алелями мікросателітних локусів *ORS1040*, *ORS1130* та *ORS1112*.

У контрастних за стійкістю генотипів соняшнику виявлено поліморфізм за локусами *ORS820*, *ORS683* та *ORS1036* (табл. 1, 2). За локусом *ORS820* у батьківської форми гібридів Етюд, Сівер, Ковчег, Ной виявлено фрагмент 219 п.н., в інших досліджених 14 ліній – фрагмент 237 п.н. (рис. 1). Серед досліджених простих гібридів соняшнику гетерозиготними за даним локусом виявилися Етюд, Сівер, Ковчег, Ной, Оскіл, Оберіг (алелі 219 та 237 п.н.).

У досліджених ліній та гібридів соняшнику за локусом *ORS683* показано наявність двох алелів: у лінії К 811 – алель 357 п.н., у всіх інших генотипів – алель 350 п.н.

За локусом *ORS1036* виявлено поліморфізм у досліджених генотипів соняшнику, зокрема у інбредних ліній ВА 1 та К 811 (рис. 2, 3). Ампліфікація ДНК батьківських ліній ВА 1 та К 811, контрастних за стійкістю до вовчка раси С, за мікросателітним локусом *ORS1036* дозволила отримати алелі 242 п.н. та 252 п.н., відповідно. Серед 50 рослин популяції F₂ у восьми з

ОЦІНКА СТІЙКОСТІ СОНЯШНИКУ

**Таблиця 1. Алелі, що виявлені у досліджених інбредних ліній,
за мікросателітними локусами, п.н.**

Генотип	Локус		
	ORS820	ORS683	ORS1036
Оранж	237	350	252
Одол 1	237	350	252
Одеська 391	237	350	252
Одеська 973	237	350	252
Одеська 1318	237	350	252
Одеська 1295	237	350	252
Материнська форма гібрида Сівер	237	350	242
Материнська форма гібрида Ковчег	237	350	242
Материнська форма гібрида Ной	237	350	242
Материнська форма гібрида Етюд	237	350	242
Материнська форма гібрида Дарій	237	350	242
Батьківська форма гібридів Етюд, Сівер, Ковчег, Ной	219	350	252
Батьківська форма гібрида Дарій	237	350	252
ВА 1	237	350	242
К 811	237	357	252

**Таблиця 2. Алелі, що виявлені у досліджених гібридів,
за мікросателітними локусами, п.н.**

Генотип	Локус		
	ORS820	ORS683	ORS1036
Час	237	350	242-252
Славутич	237	350	242-252
Карат	237	350	242-252
Латіно	237	350	242-242
Онікс	237	350	242-252
Іберіка	237	350	242-252
Оберіг	219-237	350	242-252
Сапфір	237	350	242-252
Ясон	237	350	242-252
Всесвіт	237	350	242-252
Сержан	237	350	242-252
Оскіл	219-237	350	242-252
Псьол	237	350	242-252
Роднік	237	350	242-252
Олівер	237	350	242-252
ПР64Г	237	350	242-252
Златибор	237	350	242-252
Тайфун	237	350	242-252
КВС Гелія	237	350	242-252
Лакомка	237	350	242-252
Мастер	237	350	242-252
Флагман	237	350	242-252
Одор	237	350	242-252
Дарій	237	350	242-252
Етюд	219-237	350	242-252
Сівер	219-237	350	242-252
Ковчег	219-237	350	242-252
Ной	219-237	350	242-252
Макао	237	350	242-252

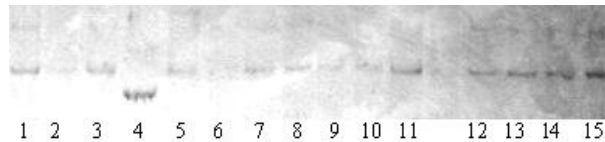


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК ліній соняшнику за локусом *ORS820*.

1 – Оранж; 2 – Одол 1; 3 – Одеська 391; 4 – батьківська форма гібридів Етюд, Сівер, Ковчег, Ной; 5 – батьківська форма гібрида Дарій; 6 – материнська форма гібрида Сівер; 7 – материнська форма гібрида Ной; 8 – материнська форма гібрида Етюд; 9 – материнська форма гібрида Ковчег; 10 – материнська форма гібрида Дарій; 11 – Одеська 973; 12 – Одеська 1318; 13 – Одеська 1295; 14 – ВА 1; 15 – К 811.

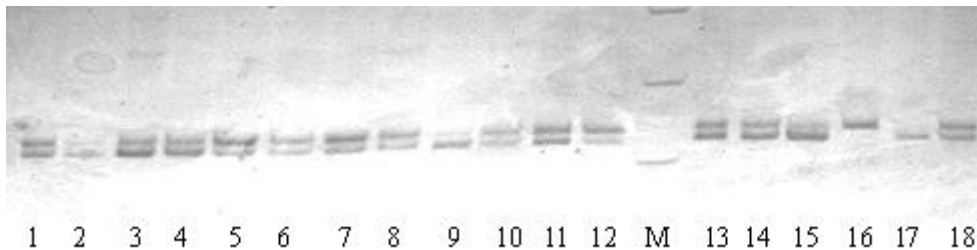


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК ліній та гібридів соняшнику за локусом *ORS1036*.

1 – Одор; 2 – Латіно; 3 – Олівер; 4 – Сапфір; 5 – Дарій; 6 – Етюд; 7 – Ковчег; 8 – Лакомка; 9 – материнська форма гібрида Ковчег; 10 – Сержан; 11 – Тайфун; 12 – Макао; 13 – Іберіко; 14 – Ной; 15 – материнська форма гібриду Ной; 16 – К 811; 17 – ВА 1; 18 – КВС Гелія 06; М – маркери молекулярної маси.

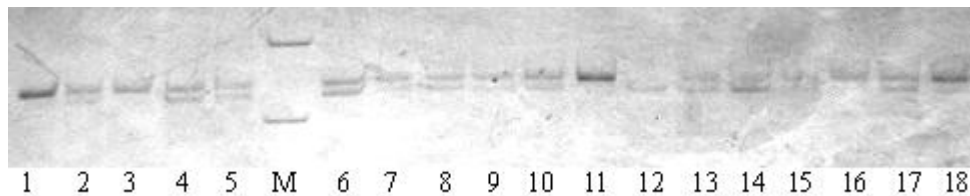


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК лінії ВА 1 (доріжка 12), лінії К 811 (доріжка 11) та окремих рослин популяції F_2 (ВА 1 x К 811) (доріжки 1-5, 6-10, 13-18) за локусом *ORS1036*. М – маркери молекулярної маси.

десяти стійких гомозиготних рослин ідентифіковано алель 242 п.н., який є характерним для стійкої батьківської лінії ВА 1; у 19 з 21 нестійкої гомозиготної рослини – алель 252 п.н., характерний для нестійкої батьківської лінії К 811. Виявлено чотири рекомбінантних рослини F_2 . Стійкі до вовчка рослини F_2 розподілені на гомо- (*Or3Or3*) та гетерозиготні (*Or3or3*) за результатами тестування стійкості рослин з відповідних родин F_3 . Для всіх рослин F_2 з генотипом *Or3or3* за мікросателітним локусом *ORS 1036* показано наявність двох алелів: 242 п.н. та 252 п.н. Обмежена кількість рослин популяції не дозволила виявити всі фенотипні класи рекомбінантів та провести гібридологіч-

ний аналіз. Проте, дані генотипування за локусом *ORS 1036* та фенотипового прояву стійкості до вовчка раси С, отримані для рослин популяції F_2 , дозволяють вважати певні алелі мікросателітного локусу *ORS 1036* асоційованими з проявом стійкості до вовчка раси С.

Маркуючу здатність мікросателітного локусу *ORS1036* перевірено на 13 інбредних лініях та 29 гібридах. Встановлено алельний склад досліджених генотипів за локусом *ORS1036*. За винятком гібрида Латіно, усі інші виявилися гетерозиготними (алелі 242 та 252 п.н.), що відповідає очікуваному, оскільки селекція вихідних форм для створення гібридів ведеться таким чином, що якнайменше одна

ОЦІНКА СТІЙКОСТІ СОНЯШНИКУ

похідна форма гібрида повинна бути стійкою до вовчка.

Для всіх батьківських ліній показано гомозиготний стан локусу *ORS1036* (алель 252 п.н., що є маркерним щодо алеля *or3*). Материнські лінії гібридів Одол 1, Одеська 391, Одеська 973 виявили наявність алеля 252 п.н. за локусом *ORS1036*. Для інших материнських форм гібридів показано наявність в гомозиготному стані алеля 242 п.н., що є маркером до алеля *Or3*. Таке сполучення маркерного алеля та алеля гена, що контролює стійкість до вовчка, є цілком очікуваним, оскільки при селекційному створенні материнських форм гібридів соняшнику обов'язковим є наявність в генотипі материнської лінії гена стійкості *Or3* в гомозиготному стані.

У 90,7 % проведених тестувань мікросателітний маркер *ORS1036* виявився ефективним, оскільки для 39 генотипів з 42 не виявлено невідповідностей у сполученні маркер – ознака.

В селекції та насінництві соняшнику матеріал попереднього та конкурсного сортопробування обов'язково оцінюється на стійкість до вовчка. Польовий метод, який використовується у даному разі, є дуже трудомістким, при цьому результати оцінки отримують лише наприкінці вегетаційного періоду, тобто із запізненням від строків основного відбраковування селекційного матеріалу (Никитчин, 2002). Розроблено та широко використовується метод оцінки соняшнику на стійкість до вовчка в лабораторно-вегетаційних та тепличних умовах (Панченко, 1975). За цим методом встановлюють стійкість рослин соняшнику на 23-25 день після появи сходів та вирощування в умовах освітлення за 6-8 тис. лк. Недоліками наведених методів є негативність оцінки, за результатами якої фенотипово неуражені рослини відносять до генотипово стійких. Проте, деякі з цих рослин можуть бути неураженими з різних причин, наприклад, за недостатнього розвитку бульбочок вовчка. Покращити точність оцінки стійкості і таким чином збільшити ефективність селекції на стійкість можливо за використання методів, що дозволять виявляти наявність в генотипі рослин соняшнику генетичних детермінант стійкості. Методи молекулярної генетики, зокрема використання ПЛР-маркерів генів стійкості, дозволять скоротити терміни тестування стійкості генотипів соняшнику, а також проводити його на будь-якій стадії розвитку рослини.

Таким чином, мікросателітний аналіз за локусами *ORS1036*, *ORS683*, *ORS820*, локалізованими на третій групі зчеплення генетичної карти геному соняшнику, дозволив виявити поліморфізм у ліній та гібридів соняшнику, контрастних за стійкістю до вовчка раси С. Показано ефективність використання мікросателітного маркера *ORS1036* для оцінки стійкості генотипів соняшнику української та закордонної селекції.

ЛІТЕРАТУРА

- Никитчин Д.И. Подсолнечник: биохимия, селекция, возделывание. – Пологи, 2002. – 494 с.
- Панченко А.Я. Ранняя диагностика заразиоустойчивости при селекции и улучшающем семеноводстве подсолнечника // Вестник с.-х. науки. – 1975. – № 2. – С. 107-115.
- Саналатий А., Солоденко А., Сиволап Ю. Идентификация генотипов подсолнечника украинской селекции с помощью SSRP-маркеров // Цитология и генетика. – 2006. – Т. 40, № 4. – С. 37-43.
- Сиволап Ю.М. Геном рослин і молекулярні маркери // Геном рослин. Збірник наукових статей. – Одеса, 2008. – С. 6-9.
- Созинов А.А. Геномика в создании сортов растений нового поколения // Геном рослин. Збірник наукових статей. – Одеса, 2008. – С. 10-14.
- Солоденко А.Е., Саналатий А.В., Толмачев В.В. и др. Маркирование гена устойчивости к заразихе *Or 3* у подсолнечника // Цитология и генетика. – 2005. – Т. 39, №5. – С. 9-12.
- Fernandes-Martinez J.M., Melero-Vara J.M., Munoz-Ruz J. et al. Selection of wild and cultivated sunflower for resistance to a new broomrape race that overcomes resistance of the *Or 5* gene // Crop. Sci. – 2000. – V. 40. – P. 550-555.
- Gentzbittel L., Mestries S., Mouseyar F. et al. A composite map of expressed sequences and phenotypic traits of the sunflower (*Helianthus annuus* L.) genome // Theor. Appl. Genet. – 1999. – V. 99. – P. 218-234.
- Lu Y.H., Gagne B., Grezes-Besset B., Blanchard P. Integration of a molecular linkage group containing broomrape resistance gene *Or5* into an RFLP in sunflower // Genome. – 1999. – V. 42. – P. 453-456.
- Lu Y.H., Melero-Vara J.M., Garcia-Tejada J.A., Blanchard P. Development of SCAR markers linked to the gene *Or 5* conferring resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower // Theor. Appl. Genet. – 2000. – V. 100. – P. 625-632.
- Tang S., Knapp S. J. Microsatellites uncover extraordinary diversity in native American land races and

СОЛОДЕНКО

- wild population of cultivated sunflower // *Theor. Appl. Genet.* – 2003. – V. 106. – P. 990-1003.
- Tang S., Yu J.K., Slabaugh M.B. et al.* Simple sequence repeat map of the sunflower genome // *Theor. Appl. Genet.* – 2002. – V. 105. – P. 1124-1136.
- Tang S., Heesacker A., Kishore V.K. et al.* Genetic mapping of the *Or 5* gene for resistance to *Orobanche* race E in sunflower // *Crop. Sci.* – 2003. – V. 43. – P. 1021-1028.
- Velasco L., Perez-Vich B., Jan C.C., Fernandez-Martinez J.M.* Inheritance of resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) race F in a sunflower line derived from wild sunflower species // *Plant Breeding.* – 2007. – V. 126. – P. 67-71.
- Yu J.K., Tang S., Slabaugh M.B. et al.* Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower // *Crop. Sci.* – 2003. – V. 43. – P. 367-387.

Надійшла до редакції
06.06.2011 р.

ESTIMATION OF SUNFLOWER RESISTANCE TO BROOMRAPE RACE C WITH USING OF MOLECULAR MARKERS

A. Ye. Solodenko

*South Plant Biotechnology Center
of National Academy Agrarian Sciences of Ukraine
(Odesa, Ukraine)*

The amplification of microsatellite loci from LG3 (*ORS1036*, *ORS1040*, *ORS1112*, *ORS683*, *ORS1130*, *ORS820*) were used for searching of DNA-markers to sunflower resistance to broomrape race C. Different origin sunflower hybrids and inbred lines were investigated. Polymorphic amplified fragments were discovered. Effectiveness of obtained markers: alleles 242 b.p. and 252 b.p. from *ORS1036* locus, was estimated.

Key words: *Helianthus annuus*, *Orobanche cumana*, microsatellites, markers, resistance

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ ПОДСОЛНЕЧНИКА К ЗАРАЗИХЕ РАСЫ С С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

А. Е. Солоденко

*Южный биотехнологический центр в растениеводстве
Национальной академии аграрных наук Украины
(Одесса, Украина)*

Гибриды и инбредные линии подсолнечника разного происхождения с контрастным проявлением устойчивости к заразихе расы С исследованы по микросателлитным локусам *ORS1036*, *ORS1040*, *ORS1112*, *ORS683*, *ORS1130*, *ORS820*, которые локализованы на третьей группе сцепления генетической карты генома подсолнечника. Анализ полиморфизма позволил получить маркеры устойчивости подсолнечника к заразихе расы С: аллели 242 п.н. и 252 п.н. локуса *ORS1036*. Проведена оценка эффективности использования полученных ДНК-маркеров для тестирования устойчивости подсолнечника к заразихе.

Ключевые слова: *Helianthus annuus*, *Orobanche cumana*, микросателлиты, маркеры, устойчивость