

УДК 575.11.113:854.78

## МАРКЕРИ ГЕНА *AHAS1* ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ В СЕЛЕКЦІЇ СОНЯШНИКУ НА СТІЙКІСТЬ ДО ГЕРБІЦИДІВ

© 2015 р. А. Є. Солоденко, В. І. Файт

Селекційно-генетичний інститут –

Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення

Національної академії аграрних наук України

(Одеса, Україна)

Досліджені лінії соняшнику різноманітного походження, які використовуються в селекційних програмах створення стійких до гербіцидів генотипів. В межах послідовності мутантного гена *AHAS1*, асоційованого зі стійкістю до гербіцидів, які інгібують ключовий фермент синтезу амінокислотних ланцюгів, виявлені маркерні алелі мікросателітних локусів. Диференційовані лінії-донори стійкості до імідазолінонових та сульфонілсечовинних гербіцидів за маркерними мікросателітними алелями. Запропоновано застосування виявлених ДНК-маркерів під час добору зразків з гібридних популяцій, в яких як донори стійкості будуть використані лінії Sumo-1, Sumo-2, IMISUN-4 та SURES-1.

**Ключові слова:** *Helianthus annuus L.*, гербіциди, стійкість, ДНК-маркери, ген *AHAS1*

Реалізація потенційної продуктивності вітчизняних гібридів соняшнику можлива лише за умов, коли гібриди поєднують її з генетично зумовленою стійкістю до високоефективних гербіцидів (Бурлов, 2014). Стійкість до гербіцидів селекційним формам надають шляхом генно-інженерного введення генів чи використання в схрещуваннях зразків з природними або штучними мутаціями, які зумовлюють резистентність до певної групи гербіцидів.

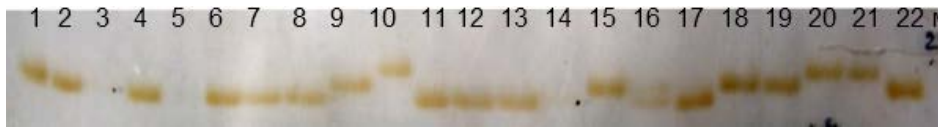
Найбільш вживані гербіциди, що належать до імідазолінонової та сульфонілсечовинової груп, інгібують фермент синтезу амінокислотних ланцюгів – синтазу ацетогідроксикислоти (acetohydroxyacid synthase, AHAS), що призводить до фатального порушення метаболізму у чутливих до дії гербіцидів рослин (Duggleby et al., 2000). Стійкість до гербіцидів, які інгібують AHAS, виникає у рослин в результаті точкових мутацій в генах, що кодують синтез даного ферменту. У більш ніж 80 видів рослин ідентифіковані природні біотики, стійкі до AHAS-інгібуючих гербіцидів (Heap, 2007). У соняшнику мутантні гени *AHAS* інтрогресовані зі зразків дикорослих популяцій (ANN-PUR та

ANN-KAN) в елітні інбредні лінії з метою створення стійких сортів та гібридів (Al-Khatib, 2000; Miller, 2004). Досліджена молекулярна структура генів *AHAS1*, *AHAS2*, *AHAS3* (Sala et al., 2008). В нуклеотидних послідовностях цих генів у мутантних ліній ідентифікована варіабельність різних типів: інсерції-делеції (INDEL), заміни одного нуклеотиду (single nucleotide polymorphisms, SNPs) та конформаційний поліморфізм (single-strand conformational polymorphism, SSCP), що дозволило розробити низку ДНК-маркерів для диференціації *AHAS* алелів. Аналіз послідовності гена *AHAS1* у 23 інбредних ліній соняшника дозволив виявити 48 SNPs та варіацію за кількістю [ACC]<sub>n</sub> повторів (Kolkman et al., 2004).

Підвищення ефективності добору в програмах селекції сільськогосподарських культур можливе за умов використання маркерних технологій. Маркерна селекція (marker assisted selection, MAS) базується на виявленні маркерів генів господарсько-цінних ознак і подальшому їх застосуванні на певних етапах селекції. Передумова маркерної селекції – пошук функціонально значущих генів і ДНК-маркерів, які є частиною цих генів чи перебувають з ними у тісному генетичному зчепленні. За допомогою виявлених маркерів в подальшому здійснюють тестування вихідного селекційного матеріалу з метою пошуку донорів цільових генів, беккпро-

---

Адреса для кореспонденції: Солоденко Анжела Євгенівна, Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення НААН України, Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна; e-mail: angelika\_solo@yahoo.com



**Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК за локусом *rAHAS 16-17*:** 1, 2 – НА 425; 3, 4 – RHA 426; 5, 6 – RHA 427; 7, 8 – НА 442; 9 – Sumo-2; 10, 21 – SURES-1; 11 – RHA 443; 12 – IMISUN-1; 13 – IMISUN-2; 14, 22 – IMISUN-3; 15 – IMISUN-4; 16 – OC1011; 17 – OC1013; 18 – Sumo-1; 19 – Sumo-2; М – маркер молекулярної маси ДНК ladder 100 (фрагмент 200 п.н.).



**Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК за локусом *rAHAS 18-19*:** 1, 2 – НА 425; 3, 4 – RHA 426; 5, 6 – RHA 427; 7, 8 – НА 442; 9, 19, 22 – SURES-1; 10, 20 – Sumo-2; 11 – RHA 443; 12 – IMISUN-1; 13 – IMISUN-2; 14, 21 – IMISUN-3; 15 – IMISUN-4; 16 – OC1011; 17 – OC1013; 18 – Sumo-1; М – маркер молекулярної маси ДНК ladder 100 (фрагмент 300 п.н.).

сування з добром за ДНК-маркерами, добір гомозигот у потомстві.

Мета нашої роботи – ідентифікація маркерних алелів гену *AHAS1* у генотипів соняшнику, які використовуються в селекції на стійкість до гербіцидів імідазолінової та сульфонілсечовинної груп.

## МЕТОДИКА

Матеріалом для досліджень слугували лінії соняшнику (*Helianthus annuus* L.), отримані з National Germplasm Resources Laboratory (North Central Regional PI Station, North Dakota, USA) для використання в селекційних програмах Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннезнавства та сортовивчення (СГІ-НЦНС) зі створення батьківських ліній та гібридів: SURES-1, НА 425, RHA 426, RHA 427, НА 442, RHA 443, IMISUN-1, IMISUN-2, IMISUN-3, IMISUN-4. Лінія SURES-1 має походження з популяції дикорослого соняшнику *H. annuus* L. ANN-KAN (Канзас, США) та характеризується стійкістю до гербіциду сульфонілсечовинної групи – трибенурону. Лінії НА 425, RHA 426, RHA 427, НА 442, RHA 443, IMISUN-1, IMISUN-2, IMISUN-3, IMISUN-4 походять з популяції дикорослого соняшнику ANN-PUR (Канзас, США) та є стійкими до імідазолінових гербіцидів. Досліджували також лінії Sumo-1 і Sumo-2, при створенні яких використані стійкі до гербіцидів групи трибенурон-метіл (Гранстар) гібриди сербської селекції та нестійкі до гербіцидів лінії селекції СГІ-НЦНС OC1011 та OC1013, які за-

лучаються до програми створення гербіцидостійких гібридів соняшнику, адаптованих до вирощування в Україні. Матеріал для дослідження люб'язно наданий завідувачем відділу селекції та насінництва гібридного соняшника СГІ-НЦНС к.с.-г.н. Вареником Б.Ф.

ДНК виділяли з проростків цетавлоновим методом. Ампліфікацію проводили на приладі «Терцик» («ДНК-технология», Росія). Склад реакційної суміші: буфер для DreamTaq полімерази, 1 одиниця активності DreamTaq полімерази (Fermentas, Литва), 0,2 мкМ кожного праймера, 0,2 мМ кожного dNTP, 20 нг ДНК. Умови ампліфікації: початкова денатурація 2 хв при 94°С; 30 циклів – 20 с при 60°С, 30 с при 72°С, 20 с при 92°С; фінальна елонгація 5 хв. Електрофоретичне розподілення продуктів ампліфікації проводили в поліакриламідному гелі (10 % акриламід, TRIS-боратний буфер). Фарбували гелі азотнокислим сріблом (Солоденко та ін., 2005). Молекулярний розмір фрагментів ДНК визначали за допомогою програми «GelAnalyzer 2010» відносно маркера молекулярної маси ДНК ladder 100. Інформацію про нуклеотидні послідовності праймерів для аналізу послідовностей гену *AHAS1* отримали з роботи Kolkman et al. (2004).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Враховуючи обмеження у використанні методу SNP-аналізу, пов'язані з його високою вартістю, дослідили можливість ідентифікації стійких до гербіцидів ліній різного походження

## МАРКЕРИ ГЕНА *AHAS1*

### Генотипи досліджених ліній за алелями (п.н.) локусів *pAHAS 16-17* та *pAHAS 18-19*

Лінії	<i>pAHAS 16-17</i>	<i>pAHAS 18-19</i>
HA 425, RHA 426, RHA 427, HA 442, RHA 443, IMISUN-1, IMISUN-2, IMISUN-3, OC1011, OC1013	176	313
Sumo-1, Sumo-2, IMISUN-4	184	320
SURES-1	191	328

за поліморфізмом мікросателітної послідовності, яка міститься в межах гена *AHAS1*. Ампліфікація фрагмента гена, що вміщує мікросателітний повтор, дозволила виявити низку поліморфних алелів та диференціювати досліджені лінії (рис. 1, 2).

З використанням пари праймерів *pAHAS 16-17* ідентифікували алель 176 п.н. у ліній HA 425, RHA 426, RHA 427, HA 442, RHA 443, IMISUN-1, IMISUN-2, IMISUN-3 та у ліній української селекції OC1011 і OC1013; алель 184 п.н. – у ліній Sumo-1, Sumo-2, IMISUN-4; алель 191 п.н. – у лінії SURES-1. За алелями локусу *pAHAS 18-19* досліджені лінії розподілені на такі ж самі три групи (таблиця).

Лінія SURES-1 відрізняється за походженням від усіх інших досліджених нами генотипів, чим напевно пояснюється її чітка відокремленість за виявленими мікросателітними алелями. Північноамериканська популяція дикорослого соняшника ANN-PUR була джерелом вихідних форм для створення стійких до імідазолінонових гербіцидів ліній HA 425, RHA 426, RHA 427, HA 442, RHA 443, IMISUN-1, IMISUN-2, IMISUN-3, IMISUN-4. В той же час вказані лінії відрізняються за педігрі. Так, наприклад, в родоводі HA 425 та IMISUN-1 окрім зразка ANN-PUR *H. annuus* присутня лінія HA 89\*3, для створення ліній IMISUN-2 та IMISUN-3 залучались RHA 409/RHA 376\*2 та HA 292\*3, відповідно. Педігрі лінії IMISUN-4: RHA 324/RHA 280\*2/ANN-PUR *H. annuus*. Цікавим є той факт, що нестійкі до гербіцидів інбредні лінії одеської селекції OC1011 і OC1013 не відрізняються за дослідженими мікросателітними алелями від групи ліній HA 425, RHA 426, RHA 427, HA 442, RHA 443, IMISUN-1, IMISUN-2, IMISUN-3. В той же час при спільному походженні з вище переліченими стійкими до імідазолінонових гербіцидів лініями, IMISUN-4 відрізняється від них за алелями локусу *AHAS1*.

Ідентифікація певних мікросателітних алелів для груп ліній, які активно залучаються

селекціонерами СГІ-НЦНС до створення нових генотипів соняшнику зі стійкістю до страхових гербіцидів, дозволить проводити маркерний добір зразків з гібридних та беккросних популяцій. Так, перспективним, на наш погляд, буде добір за виявленими маркерними алелями зразків з гібридних популяцій, в яких донорами стійкості слугуватимуть лінії Sumo-1, Sumo-2, IMISUN-4 та SURES-1.

Стійкість до сульфонілсечовинних гербіцидів у лінії SURES-1 пов'язана з точковою мутацією в кодоні 197 послідовності гена *AHAS1*, яка призводить до заміни проліну на лейцин в молекулі синтази ацетогідроксикислоти. Заміна одного нуклеотиду в кодоні 205 призводить до появи валіну замість аланіну у вище згаданого ферменту і стікості до імідазолінонових гербіцидів у ліній IMISUN-1, IMISUN-2, HA 425 (Kolkman et al., 2004). Саме амінокислотні заміни Pro<sub>197</sub> і Ala<sub>205</sub> зумовлюють стійкість до *AHAS*-інгібуючих гербіцидів у представників інших родин рослин (Tranel, 2002). За SNP-маркерами у соняшнику виявлено п'ять гаплотипів гена *AHAS1*, два з яких асоційовані зі стійкістю до різних груп гербіцидів. У нашому дослідженні показано наявність трьох гаплотипів за поліморфними мікросателітними маркерами. Поліморфізм мікросателітної ДНК є найбільш оптимальним джерелом маркерів для MAS-селекції у зв'язку з методичною доступністю способів його виявлення, надійністю і відтворюваністю результатів, кодомінантним типом успадкування. Додатковим аргументом на користь застосування в селекційних програмах виявлених поліморфних мікросателітних алелів є те, що дані маркери локалізовані в межах послідовності самого гена *AHAS1*, і таким чином, маркерні алелі не будуть «зникати» під впливом рекомбінаційних подій.

## ЛІТЕРАТУРА

Бурлов В.В. Конкурентоспроможність гібридів соняшнику вітчизняної селекції // Агрономіка со-

## СОЛОДЕНКО, ФАЙТ

- няшника. Науково-практичний збірник. – 2014. – Т. 2. – С. 112-114.
- Солоденко А.Е., Саналатий А.В., Толмачев В.В. Маркирование гена устойчивости к заразице *Or 3* у подсолнечника // Цитология и генетика. – 2005. – Т. 39. – № 5. – С. 9-12.
- Al-Khatib K., Miller J.F. Registration of four genetic stocks of sunflower resistant to imidasolinone herbicides // Crop. Sci. – 2000. – V. 40. – P. 869-870.
- Duggleby R.G., Pang S.S. Acetohydroxyacid synthase // J. Biochem. Mol. Biol. – 2000. – V. 33. – P. 1-36.
- Heap I. The International survey of herbicide resistance weeds. – 2007. – Available online <<http://www.weedscience.org>>.
- Kolkman J., Slabaugh M., Bruniard J., Berry S., Bushman B., Olungu C., Maes N., Abratti G., Zambel-  
li A., Miller J., Leon A., Knapp S. Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidasolinone or sulfonyleurea herbicides in sunflower // Theor. Appl. Genet. – 2004. – V.109. – P. 1147-1159.
- Miller J.F., Al-Khatib K. Two express resistant sunflower genetic stocks // Crop. Sci. – 2004. – V. 44. – P. 1037.
- Sala C., Bulos M., Echarte M. Genetic analysis of an induced mutation conferring imidasolinone resistance in sunflower // Theor. Appl. Genet. – 2008. – V.118. – P. 105-112.
- Tranel P.J., Wright T.R. Resistance of weeds to ALS inhibiting herbicides: what have we learned? // Weed Science. – 2002. – V. 50. – P. 700-712.

Надійшла до редакції  
22.05.2015 р.

## MARKERS OF *AHAS1* GENE FOR USE IN SUNFLOWER BREEDING FOR RESISTANCE TO HERBICIDES

A. E. Solodenko, V. I. Fayt

*Breeding and Genetics Institute –  
National Center of Seed and Cultivar Investigation  
National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine  
(Odesa, Ukraine)  
e-mail: angelika\_solo@yahoo.com*

Different origin sunflower lines that are used in breeding programs aimed on creating of herbicide-resistant genotypes were investigated. Microsatellite marker alleles from *AHAS1* mutant gene that associated with resistance to *AHAS*-inhibiting herbicides were identified. Microsatellite markers allow differing imidasolinone- and sulfonyleurea-resistant lines. Markers are proposed for selecting of samples from hybrid populations in that Sumo-1, Sumo-2, IMISUN-4 та SURES-1 would be used as resistance donor lines.

**Key words:** *Helianthus annuus L., herbicides, resistance, DNA markers, AHAS1 gene*

## МАРКЕРЫ ГЕНА *AHAS1* ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СЕЛЕКЦИИ ПОДСОЛНЕЧНИКА НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ГЕРБИЦИДАМ

А. Е. Солоденко, В. И. Файт

*Селекционно-генетический институт –  
Национальный центр семеноведения и сортоизучения  
Национальной академии аграрных наук Украины  
(Одесса, Украина),  
e-mail: angelika\_solo@yahoo.com*

Исследованы линии подсолнечника разнообразного происхождения, которые используются в селекционных программах по созданию устойчивых к гербицидам генотипов. В пределах му-

### **МАРКЕРИ ГЕНА AHAS1**

тантного гена *AHAS1*, ассоциированного с устойчивостью к гербицидам, которые ингибируют ключевой фермент синтеза аминокислотных последовательностей, выявлены маркерные аллели микросателлитных локусов. Микросателлитные маркеры позволили дифференцировать линии-доноры устойчивости к имидазолиновым и сульфонилмочевинным гербицидам. Предложено применение выявленных ДНК-маркеров в процессе отбора образцов из гибридных популяций, в которых в качестве доноров устойчивости будут использованы линии Sumo-1, Sumo-2, IMISUN-4 та SURES-1.

**Ключевые слова:** *Helianthus annuus L.*, гербициды, устойчивость, ДНК-маркеры, ген *AHAS1*