

ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 575.11.113:854.78

МАРКЕРИ ГЕНА СТІЙКОСТІ СОНЯШНИКУ ДО НЕСПРАВЖНЬОЇ БОРОШНИСТОЇ РОСИ

© 2014 р. А. Є. Солоденко, В. В. Бурлов, Ю. М. Сиволап

Селекційно-генетичний інститут –

Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення

Національної академії аграрних наук України

(Одеса, Україна)

Лінії-диференціатори з міжнародного стандартного набору для ідентифікації патотипів збудника несправжньої борошнистої роси та оцінки стійкості соняшнику, а також зразки дикорослого виду *Helianthus argophyllus* L. досліджено за мікросателітними локусами, які локалізовані на першій групі зчеплення генетичної карти геному соняшнику в межах 10 сМ навколо гена стійкості Pl_{ARG} . Виявлені маркерні алелі, які дозволяють відрізнити від усіх інших досліджених генотипів лінію RHA-419 та колекційні зразки *H. argophyllus*, в генотипах яких присутній ген Pl_{ARG} . Запропоновано використання отриманих ДНК-маркерів в селекційних програмах із створення форм соняшнику, стійкість яких до несправжньої борошнистої роси обумовлюється геном Pl_{ARG} .

Ключові слова: *Helianthus argophyllus* L., мікросателіти, маркери, стійкість, несправжня борошниста роса

Несправжня борошниста роса (НБР) – одна з найбільш шкочинних хвороб соняшнику, збудником якої є нижчий гриб ооміцет *Plasmopara helianthi* Novot. Патоген зустрічається в усіх основних районах вирощування соняшнику. Щорічно відзначаються епіфітотії, за яких рівень ураженості може сягати 60%, а втрати урожаю – до 50% (Кириченко, 2005). Гриб розвивається в усіх частинах рослини, переважно в молодих тканинах, залишаючи клітини без достатнього забезпечення асимілятами та водою. Нині налічують понад 30 рас НБР, серед яких найбільш шкочинними є 330, 700, 703, 710, 730 та 770 (Mulpuri et al., 2009).

Одним з пріоритетних завдань селекції соняшнику є створення гібридів, які є носіями доміантних генів стійкості до НБР – Pl . Дослідження генетики стійкості дозволили стверджувати про моногенний контроль цієї ознаки. Визначена низка генів Pl , кожен з яких надає стійкості проти певних рас патогена. Гени $Pl1$

та $Pl2$ упродовж значного часу давали можливість контролювати захист соняшнику проти 100 та 300 рас НБР, які були доміантними в Європі та Америці відповідно. Останнім десятиріччям еволюція патогена призвела до появи низки патотипів, які «подолали» дію генів $Pl1$ та $Pl2$, що зумовило пошуки нових джерел стійкості. Рослини з ефективними генами Pl було знайдено серед дикорослих популяцій видів роду *Helianthus* L. Так, $Pl6$ та $Pl13$ інтродуковані в культурний соняшник з екотипів *H. annuus*, $Pl5$ – з *H. tuberosus*, $Pl7$ – з *H. praecox*, $Pl8$ та Pl_{ARG} – з *H. argophyllus*. Показано кластерну організацію генів Pl та їх локалізацію в межах трьох груп зчеплення генетичної карти геному соняшнику, насиченої мікросателітними маркерами (Josic et al., 2012).

Найбільшої уваги у подальшій селекції соняшнику на стійкість до НБР потребують джерела гена Pl_{ARG} , який нині зумовлює універсальну стійкість проти всіх відомих рас *Plasmopara helianthi* (Josic et al., 2010). Pl_{ARG} локалізовано в теломерному регіоні I групи зчеплення генетичної карти геному соняшнику (Duble et al., 2004). Клоновані послідовності ДНК регіону геному соняшнику, який вміщує локус Pl_{ARG} ,

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

для подальшого виділення та секвенування гена (Wieckhorst et al., 2010).

Низка ліній, отриманих шляхом інтрогресивної гібридизації культурного соняшнику з *H. argophyllus*, на даний час використовуються селекціонерами різних країн як донори гена Pl_{ARG} для створення стійких ліній і гібридів, адаптованих для вирощування в певних регіонах.

У сучасних селекційних програмах ефективно застосовуються молекулярні маркери, які дозволяють полегшити детекцію певних генів та прискорити селекційний процес (Josic et al., 2012). Маркери, щільно зчеплені з генами Pl , дають змогу ідентифікації стійких ліній, зменшуючи кількість зразків, для яких необхідно проводити імунологічне тестування стійкості (Mulpurı et al., 2009).

Мета нашої роботи – ідентифікація мікросателітних маркерних алелів, характерних для генотипів-донорів гена стійкості Pl_{ARG} , які дозволять шляхом маркерної селекції прискорити цільовий добір зразків у процесі створення нових ліній і гібридів соняшнику.

МЕТОДИКА

Як матеріал для досліджень використані лінії-диференціатори: НА-288 (нестійка до НБР), QHP-I (в генотипі лінії присутні гени стійкості Pl_8 , Pl_{13}), FT-226 (аналог лінії QHP-I), НА-335 (Pl_1 , Pl_2 , Pl_6), RHA-419 (Pl_{ARG}), які входять до міжнародного стандарту для ідентифікації патотипів збудника НБР та оцінки стійкості соняшнику до різних рас НБР (Tourvieille de Labrouhe et al., 2000); зразки *Helianthus argophyllus* L. з колекцій Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннезнавства та сортовивчення (СГІ-НЦНС) та Інституту олійних культур НААН України (зразки 1 і 2, відповідно); нестійкі лінії Од 108А, Од 9А та лінія селекції відділу олійних культур СГІ-НЦНС ОС 1029В, стійка до всіх поширених в Україні рас НБР (Солоденко та ін., 2013). Матеріал для дослідження надано д.б.н. В.В. Бурловим та науковим співробітником В.А. Палясним (СГІ-НЦНС).

ДНК виділяли з проростків цетавлоновим методом. Ампліфікацію проводили на приладі «Терцик» («ДНК-технологія», Росія). Склад реакційної суміші: буфер для Dream Taq полімерази, 1 одиниця активності Dream Taq полімерази (Fermentas, Літва), 0,2 мкМ кожного праймера, 0,2 мМ кожного dNTP, 20 нг ДНК. Умови ампліфікації: початкова денатурація 2 хв при 94°C; 30 циклів – 20 с при 60°C, 30 с при

72°C, 20 с при 92°C; фінальна елонгація 5 хв. Електрофоретичне розподілення продуктів ампліфікації проводили в поліакриламідному гелі (10% акриламід, 1 М тріс-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 плазмиди pUC 19 / Msp I. Інформацію о нуклеотидних послідовностях праймерів для аналізу мікросателітних локусів отримали з бази даних (Tang, Knapp, 2003).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

16 мікросателітів, які картовані на I групі зчеплення генетичної карти соняшнику (Tang et al., 2002; Yu et al., 2003), досліджені нами з метою ідентифікації маркерів гена Pl_{ARG} . Локуси добирали за умови їх локалізації в межах 10 см навколо гена.

За локусами $ORS371$, $ORS718$, $ORS728$, $ORS837$, $ORS1128$ отримані продукти ампліфікації, за якими досліджені зразки не відрізняються. За локусами $ORS543$, $ORS606$, $ORS710$, $ORS716$, $ORS959$ виявлені поліморфні спектри ампліфікації, в яких неможливо виділити алелі, характерні саме для генотипів-носів гена Pl_{ARG} . Так, алель 260 п.н. мікросателіта $ORS543$ визначено у лінії-диференціатора RHA-419 (Pl_{ARG}) та у нестійкої лінії Од 108 А (рис. 1). У локусі $ORS716$ виявлено три алелі: 300 п.н., 315 п.н. та 335 п.н. За алелем 300 п.н. (позначено стрілкою на рис. 2) лінія RHA-419 відрізняється від інших диференціаторів крім НА-288.

Маркерні алелі, які дозволяють відрізнити лінію RHA-419 та колекційні зразки дикорослого виду *Helianthus argophyllus* від усіх інших досліджених генотипів, виявлені за локусами $ORS509$, $ORS605$, $ORS610$, $ORS675$, $ORS1039$, $ORS1182$. RHA-419 та зразки *H. argophyllus* мають однакові алелі мікросателітів $ORS509$ і $ORS1182$: 207 п.н. і 165 п.н., відповідно (позначені стрілками на рис. 3, 4). В локусах $ORS605$ та $ORS1039$ виявлено по три алелі, один алель з кожної трійки є характерним для *H. argophyllus*, другий – для лінії RHA-419, третій алель – для всіх інших досліджених ліній (рис. 5, 6). За локусом $ORS610$ отримали «нуль-алелі» у зразків *H. argophyllus* і маркерний алель 130 п.н., який відрізняє лінію RHA-419 від інших генотипів (рис. 7). В спектрах ампліфікації мікросателітного локуса $ORS675$ в усіх досліджених ліній виявлено алель 240 п.н.

МАРКЕРИ ГЕНА СТІЙКОСТІ СОНЯШНИКУ

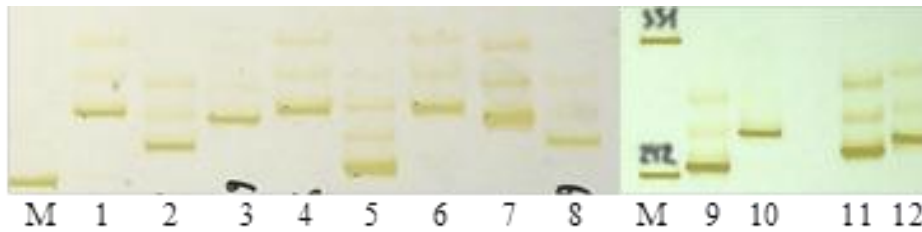


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК за локусом *ORS543*: 1 – QHP-1; 2 – HA-335; 3, 10 – RHA-419; 4 – FT-226; 5, 9 – HA-228; 6 – Од 9 А; 7 – Од 108 А; 8 – ОС 1029 В; 11 – *H. argophyllus* (зразок 1); 12 – *H. argophyllus* (зразок 2); М – маркер молекулярної маси ДНК рUC 19/Msp I (фрагменти 242 та 331 п.н.).

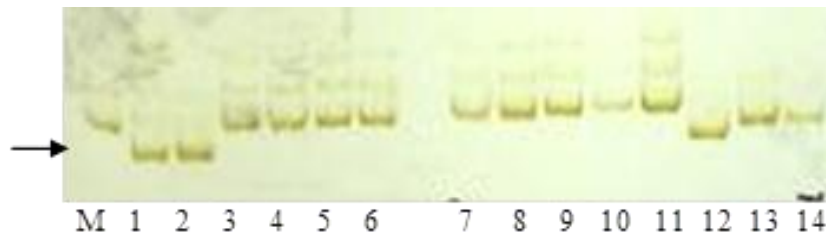


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК за локусом *ORS716*: 1, 12 – RHA-419; 2 – HA-228; 3 – QHP-1; 4 – HA-335; 5 – FT-226; 6, 7 – Од 9 А; 8, 9 – Од 108 А; 10, 11 – ОС 1029 В; 13 – *H. argophyllus* (зразок 1); 14 – *H. argophyllus* (зразок 2); М – маркер молекулярної маси ДНК рUC 19/Msp I (фрагмент 331 п.н.).

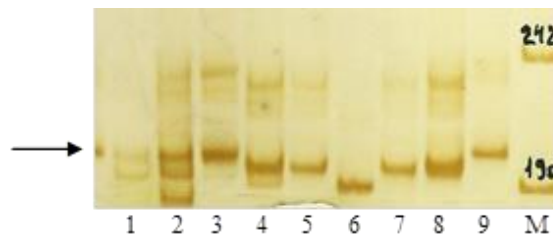


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК за локусом *ORS509*: 1 – *H. argophyllus* (зразок 1); 2 – *H. argophyllus* (зразок 2); 3, 9 – RHA-419; 4 – HA-228; 5 – QHP-1; 6 – HA-335; 7 – Од 9 А; 8 – Од 108 А; М – маркер молекулярної маси ДНК рUC 19/Msp I (фрагменти 190 та 242 п.н.).

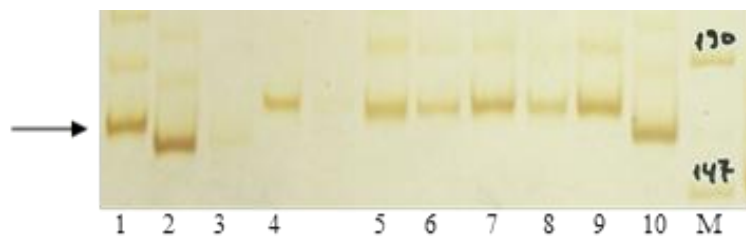


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК за локусом *ORS1182*: 1, 9 – HA-228; 2 – *H. argophyllus* (зразок 1); 3 – *H. argophyllus* (зразок 2); 4 – QHP-1; 5 – HA-335; 6 – Од 9 А; 7 – Од 108 А; 8 – ОС 1029 В; 10 – RHA-419; М – маркер молекулярної маси ДНК рUC 19/Msp I (фрагменти 147 та 190 п.н.).

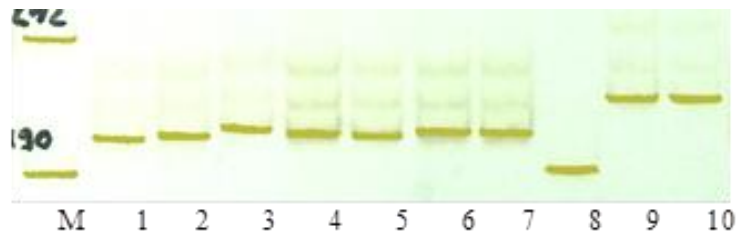


Рис. 5. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК за локусом *ORS1039*: 1 – НА-228; 2 – QHP-1; 3 – FT-226; 4 – НА-335; 5 – Од 9 А; 6 – Од 108 А; 7 – ОС 1029 В; 8 – RNA-419; 9 – *H. argophyllus* (зразок 1); 10 – *H. argophyllus* (зразок 2); М – маркер молекулярної маси ДНК рUC 19/Msp I (фрагменти 190 та 242 п.н.).

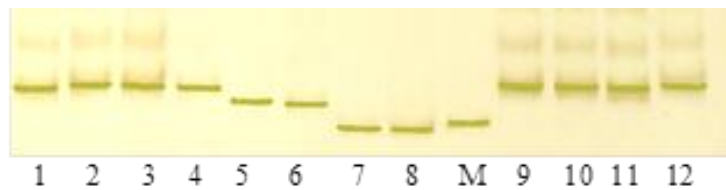


Рис. 6. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК за локусом *ORS605*: 1, 12 – НА-228; 2 – QHP-1; 3 – FT-226; 4 – НА-335; 5, 6 – RNA-419; 7 – *H. argophyllus* (зразок 1); 8 – *H. argophyllus* (зразок 2); 9 – Од 9 А; 10 – Од 108 А; 11 – ОС 1029 В; М – маркер молекулярної маси ДНК рUC 19/Msp I (фрагмент 190 п.н.).

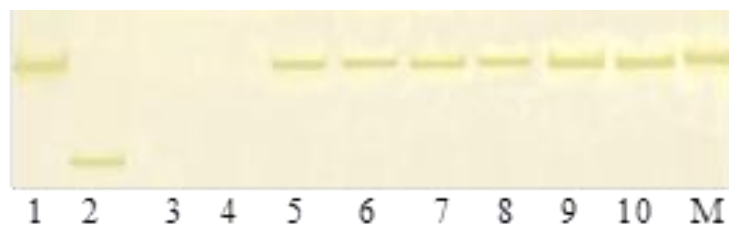


Рис. 7. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК за локусом *ORS610*: 1 – НА-228; 2 – RNA-419; 3 – *H. argophyllus* (зразок 1); 4 – *H. argophyllus* (зразок 2); 5 – QHP-1; 6 – FT-226; 7 – НА-335; 8 – Од 9 А; 9 – Од 108 А; 10 – ОС 1029 В; М – маркер молекулярної маси ДНК рUC 19/Msp I (фрагмент 147 п.н.).

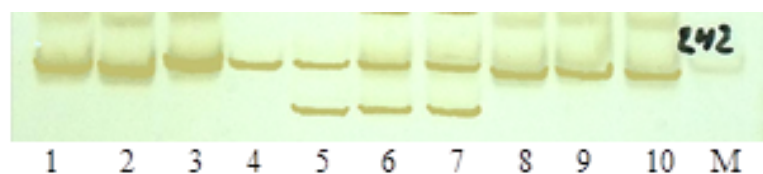


Рис. 8. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК за локусом *ORS675*: 1 – НА-228; 2 – QHP-1; 3 – FT-226; 4 – НА-335; 5 – RNA-419; 6 – *H. argophyllus* (зразок 1); 7 – *H. argophyllus* (зразок 2); 8 – Од 9 А; 9 – Од 108 А; 10 – ОС 1029 В; М – маркер молекулярної маси ДНК рUC 19/Msp I (фрагмент 242 п.н.).

Особливістю спектрів RNA-419 та *H. argophyllus* є наявність двох алелів: 240 п.н. і 220 п.н. (рис. 8), що можна пояснити мультилокусною природою мікросателіта *ORS675*. Дуплікація мікросателітних локусів є однією з особливостей геному соняшнику (Paniego et al., 2002).

Ген *Pl_{ARG}* надає універсальної стійкості проти всіх відомих на даний час рас НБР. Даний ген інтродуковано в геном культурного соняшнику в результаті віддаленої гібридизації. Схрещування зразка *H. argophyllus* північно-американського походження з лінією smsNA89

МАРКЕРИ ГЕНА СТІЙКОСТІ СОНЯШНИКУ

Генотипи досліджених ліній та зразків *H. argophyllus* за алелями (п.н.) мікросателітних локусів першої групи зчеплення

	<i>ORS509</i>	<i>ORS605</i>	<i>ORS610</i>	<i>ORS675</i>	<i>ORS1039</i>	<i>ORS1182</i>	<i>ORS716</i>	<i>ORS543</i>
HA-288	200	202	147	240	205	170	300	244
QHP-I	200	202	147	240	205	170	335	263
FT-226	200	202	147	240	205	170	335	263
HA-335	190	202	147	240	205	170	335	250
RHA-419	207**	197	130	220,240	190	165	300	260
Од 108А	200	202	147	240	205	170	335	260
Од 9А	200	202	147	240	205	170	335	263
<i>H. argophyllus</i> (зразок 1)	207	190	X*	220,240	220	165	315	250
<i>H. argophyllus</i> (зразок 2)	207	190	X	220,240	220	165	315	250

Примітки. *X – «нуль-алель»; **жирним шрифтом виділені маркерні алелі.

з наступними циклами беккросування та самозапилення призвело до отримання гомозиготної стійкої до всіх відомих рас НБР лінії ARG1575-2 (Seiler et al., 1991). Досліджена в нашій роботі лінія RHA-419 має походження від ARG1575-2 і є однією з ліній-носіїв гена стійкості Pl_{ARG} (Miller et al., 2002).

Ген Pl_{ARG} картовано на 1-й групі зчеплення генетичної карти соняшнику, показано щільне зчеплення гена з мікросателітами *ORS716*, *ORS509*, *ORS1182*, *ORS543* (Wieckhorst et al., 2010). Картування гена проводили, використовуючи популяції, що розщеплюються, в яких батьківською формою-носієм гена стійкості була інтрогресивна лінія ARG1575-2. За нашими даними, низку мікросателітних маркерів Pl_{ARG} , характерних для генотипу ARG1575-2, неможливо використовувати як маркери гена Pl_{ARG} в генофоні лінії RHA-419. Так, за алелями мікросателітів *ORS716*, *ORS543* лінія RHA-419 не відрізняється від деяких інших досліджених зразків (таблиця), локус *ORS1182* виявився неполіморфним у досліджених генотипів.

Дикорослі споріднені види зазвичай використовуються в селекційних програмах як донори генів стійкості до різноманітних абіотичних стресів та несприятливих біотичних чинників. *H. argophyllus* і лінія RHA-419 активно залучаються в селекцію з метою створення нових стійких генотипів соняшнику. Детекція певних ДНК маркерів у зразків з гібридних популяцій та беккросів, які отримані із викорис-

танням як батьківської форми *H. argophyllus* або лінії RHA-419, дозволить ідентифікувати ті, що несуть генетичний матеріал, характерний саме для донора гена Pl_{ARG} . У нашому дослідженні виявлені маркерні алелі, характерні для *H. argophyllus*: 190 п.н. (локус *ORS605*), 220 п.н. (*ORS1039*), 315 п.н. (*ORS716*), а також для лінії RHA-419: 197 п.н. (*ORS605*), 130 п.н. (*ORS610*), 190 п.н. (*ORS1039*). Алелі 207 п.н. (локус *ORS509*), 165 п.н. (*ORS1182*) і 220 п.н. (*ORS675*) дозволяють ідентифікувати фрагмент першої групи зчеплення, який має походження від *H. argophyllus* або лінії RHA-419.

Використання виявлених маркерів в процесі створення стійких ліній і гібридів соняшнику сприятиме цільовому добору зразків, які несуть донорний генетичний матеріал, що вміщує ген стійкості Pl_{ARG} .

ЛІТЕРАТУРА

- Кириченко В.В. Селекція и семеноводство подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). – Харьков : Магда LTD, 2005. – 385 с.
- Солоденко А.Е., Вареник Б.Ф., Александрова О.С., Сиволап Ю.М. Визначення расового складу несправжньої борошністої роси та стійкості ліній соняшнику // Збірник наукових праць СГП-НЦНС. – 2013. – Вип. 22 (62). – С. 57-65.
- Солоденко А.Е., Саналатий А.В., Толмачев В.В. Маркирование гена устойчивости к заражению *Or 3* у подсолнечника // Цитология и генетика. – 2005. – Т. 39, № 5. – С. 9-12.

- Duble C., Hahn V., Knapp S., Bauer E.* Pl_{ARG} from *H. argophyllus* is unlinked to other known downy mildew resistance genes in sunflower // *Theor. Appl. Genet.* – 2004. – V. 109. – P. 1083-1086.
- Jocic S., Cvejic S., Hladni N., Miladinovic D., Miklic V.* Development of sunflower genotypes resistant to downy mildew // *Helia.* – 2010. – V. 33, № 53. – P. 173-180.
- Jocic S., Miladinovic D., Imerovski I., Dimitrijevic A., Cvejic S., Nagl N., Kondic-Spika A.* Towards sustainable downy mildew resistance in sunflower // *Helia.* – 2012. – V. 35, №56. – P. 61-72.
- Labrouhe D., Pilorge E., Nicolas P., Vear F.* Les méthodes d'analyse du mildiou / D. Labrouhe, E., F. Vear // *Le mildiou du tournesol.* – CETIOM-INRA, Versailles, France, 2000. – P. 53-66.
- Miller J., Gulya T., Seiler G.* Registration of five fertility restorer sunflower germplasm // *Crop. Sci.* – 2002. – V. 42. – P. 989-991.
- Mulpuri S., Liu Z., Feng J., Gulya T., Jan C.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.
- Paniego N., Eschaide M., Munoz M.* Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Genome.* – 2002. – № 45. – P. 34-43.
- Seiler G., Christie B., Choo T.* Registration of 13 downy mildew tolerant interspecific sunflower germplasm lines derived from wild annual species // *Crop. Sci.* – 1991. – V. 31. – P. 1714-1716.
- Tang S., Yu J., Slabaugh M., Heesacker A., Cole G., Berry S., Leon A., Knapp S.* Simple sequence repeat map of the sunflower genome // *Theor. Appl. Genet.* – 2002. – V. 105. – P. 1124-1136.
- Tang S., Knapp S.* Microsatellites uncover extraordinary diversity in native American land races and wild population of cultivated sunflower // *Theor. Appl. Genet.* – 2003. – V. 106. – P. 990-1003.
- Wieckhorst S., Bachlava E., Duble C., Tang S., Gao W., Saski C., Knapp S., Schon C.C., Hahn V., Bauer E.* Fine mapping of the sunflower resistance locus Pl_{ARG} introduced from the wild species *Helianthus argophyllus* // *Theor. Appl. Genet.* – 2010. – V. 121. – P. 1633-1644.
- Yu J.K., Tang S., Slabaugh M.B., Heesacker A., Cole G., Herring M., Soper J., Han F., Chu W.-C., Webb D., Tompson L., Edwards K., Berry S., Leon A., Gron-dona M., Olungu C., Maes N., Knapp S.* Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower // *Crop. Sci.* – 2003. – V. 43. – P. 367-387.

Надійшла до редакції
07.07.2014 р.

MARKERS OF GENE OF SUNFLOWER RESISTANCE TO DOWNY MILDEW

A. Ye. Solodenko, V. V. Burlov, Yu. M. Sivolap

*Plant 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*

Wild species *Helianthus argophyllus* L. and sunflower tester lines for resistance to downy mildew were genotyped with SSR markers corresponding to linkage group 1 and covering a genetic distance of 10 cM to gene Pl_{ARG} . It were identified some marker alleles useful to definite line RHA-419 and collection samples of *Helianthus argophyllus* that carry Pl_{ARG} . Markers may be used for facilitating of marker-assisted selection program aimed at creation of downy mildew resistant sunflower varieties.

Key words: *Helianthus argophyllus* L., microsatellites, markers, resistance, downy mildew

**МАРКЕРЫ ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ ПОДСОЛНЕЧНИКА
К ЛОЖНОЙ МУЧНИСТОЙ РОСЕ**

А. Е. Солоденко, В. В. Бурлов, Ю. М. Сиволап

*Селекционно-генетический институт –
Национальный центр семеноведения и сортоизучения
Национальной академии наук Украины
e-mail: angelika_solo@yahoo.com*

Линии-дифференциаторы из международного стандартного набора для идентификации патотипов возбудителя ложной мучнистой росы и оценки устойчивости подсолнечника, а также образцы дикорастущего вида *Helianthus argophyllus* L. исследованы по микросателлитным локусам, которые локализованы на первой группе сцепления генетической карты генома подсолнечника в пределах 10 сМ около гена устойчивости Pl_{ARG} . Выявлены маркерные аллели, которые позволяют отличить от всех других исследованных генотипов линию RHA-419 и коллекционные образцы *H. argophyllus*, в генотипах которых присутствует ген Pl_{ARG} . Предложено использование полученных ДНК-маркеров в селекционных программах создания форм подсолнечника, устойчивость которых к ложной мучнистой росе обусловлена геном Pl_{ARG} .

Ключевые слова: *Helianthus argophyllus* L., микросателлиты, маркеры, устойчивость, ложная мучнистая роса