

3. Цілюща Хортиця. Монографія / Ю.І. Корнієвський, М.С. Фурса, В.Г. Корнієвська та ін. – Запоріжжя : ЗДМУ, 2009. – 552 с.
4. Лакин Ф.Ф. Биометрия: учеб. пособ. для биол. специальностей вузов / Ф.Ф. Лакин. – М. : Высшая школа, 1990. – 352 с.
5. Полевой В.В. Физиология растений / В.В. Полевой. – М.: Высшая школа, 1984. – 464 с.

УДК 575.11.113:854.78

СИСТЕМА ДНК-МАРКЕРОВ ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ ПОДСОЛНЕЧНИКА К РАСТЕНИЮ-ПАРАЗИТУ ЗАРАЗИХЕ

Солоденко А.Е., к.б.н., ведущий научный сотрудник,
Трояновская А.В., научный сотрудник, Сиволап Ю.М., д.б.н., профессор, академик НААНУ,
*Ведмедева К.В., к.б.н., зав.лаб. генетических ресурсов,
селекции высокоолеинового и кондитерского подсолнечника

*Южный биотехнологический центр в растениеводстве НААНУ
Институт масличных культур НААНУ

Для поиска ДНК-маркера гена Or 3, контролирующего устойчивость подсолнечника к “молдавской” расе заразихи (раса С), использован анализ расщепляющихся смесей ДНК (метод BSA) и ПЦР-анализ по локусам RTS 338_A, RTS 338_C, RTS 338_D. Выявлены полиморфные фрагменты амплификации, дифференцирующие контрастные по устойчивости родительские формы и растения F₃. Установлено сцепление кодоминантных маркеров и локуса Or 3.

Ключевые слова: устойчивость подсолнечника, ген, ДНК-маркер, ПЦР-анализ

Солоденко А.Э., Троянівська А.В., Сиволап Ю.М., *Ведмедева К.В. СИСТЕМА ДНК-МАРКЕРІВ ГЕНА СТІЙКОСТІ СОНЯШНИКА ПРОТИ РОСЛИНИ-ПАРАЗИТА ВОВЧКА / Південний біотехнологічний центр в рослинництві НААНУ, *Інститут олійних культур НААНУ, Україна

Для пошуку ДНК-маркера гена Or 3, що контролює стійкість соняшника до “молдавської” раси вовчка (раса С), використано аналіз сумішей ДНК, що розщеплюються (метод BSA), та ПЛР-аналіз за локусами RTS 338_A, RTS 338_C, RTS 338_D. Виявлено поліморфні фрагменти ампліфікації, що диференціюють контрастні за стійкістю батьківські форми і рослини F₃. Встановлено зчеплення кодомінантних маркерів та локуса Or 3.

Ключові слова: стійкість соняшнику, ген, ДНК-маркер, ПЦР-аналіз

Solodenko A.E., Trojanovskaja A.V., Sivolap Y.M., *Vedmedeva K.V. SYSTEM OF DNA MARKERS GENE STABILITY OF SUNFLOWER PLANTS TO PARASITE BROOMRAPE / Southern plant biotechnology center NAANU, Institute of oilseeds NAANU, Ukraine

Bulked segregant analysis and amplification of RTS 338_A, RTS 338_C, RTS 338_D loci were used for searching of DNA-markers to Or 3 gene that control a sunflower resistance to broomrape. Polymorphic amplified fragments were discovered. Those fragments are differentiating a resistant and susceptible parent lines and F₃ plants. An linkage between codominant markers and locus Or 3 is defined.

Key words: sunflower resistance, gen, DNA-markers, polymorphic amplified fragments

Паразитные сорняки рода *Orobanch* (заразихи) - злостные вредители многих сельскохозяйственных культур. В отличие от других сорняков они лишены листьев и в питании полностью зависят от растения-хозяина. Поражение подсолнечника приводит не только к значительному снижению урожая, но и кухудшению его качества. Снижаются полевая всхожесть семян, масса и масличность семян, увеличивается их лузжистость, резко возрастает кислотное число масла и, следовательно, ограничивается его использование в пищевых целях [1].

Решение на современном этапе задачи идентификации устойчивых генотипов подсолнечника возможно при сочетании знаний генетики устойчивости и способов оценки, выбраковки и отбора растений с использованием метода искусственного заражения.

Для повышения эффективности гибридной селекции подсолнечника особый интерес представляет ранняя диагностика генетически детерминированной устойчивости к наиболее распространенным патогенам. В настоящее время на производственных посевах подсолнечника заразиха представлена в основном расой С (“молдавской”), устойчивость к которой связана со специфической защитной реакцией в сосудах корней и контролируется одним доминантным геном *Or3* [2].

Кодоминантный маркер гена устойчивости к заразице RTS 29(1) получен при использовании популяции F₂ от скрещивания линий подсолнечника ВА 1 (устойчива к заразице, генотип – *Or 3 Or 3*) и К 811 (не устойчива к заразице, генотип – *or 3 or 3*) и анализа расщепляющихся смесей ДНК (BSA – bulked segregant analysis) [3].

Анализ индивидуальных растений, из которых сформированы смеси ДНК, показал, что аллель 320 п.н. (характерный для устойчивой родительской линии ВА 1) выявляется у 5 из 10 устойчивых гомозиготных растений F₂, в то время как аллель 338 п.н. (характерный для неустойчивой родительской линии К 811) выявляется у 18 из 21 неустойчивого гомозиготного растения F₂. По локусу RTS 29(1) проанализирована тестируемая популяция, определен аллельный состав всех 50 растений F₂. 21 растение F₂ представляют собой рекомбинантные формы. Тест на независимое наследование подтвердил сцепление локусов RTS 29(1) и локуса, который отвечает за устойчивость к заразице «молдавской» расы (локус *Or 3*) ($\chi^2 = 11,26$, $P > 0,01$). Сцепление маркера с геном *Or 3* составило 20 сМ [3].

Маркерный фрагмент амплификации RTS 29(1)_338 был просеквенирован. На основании нуклеотидной последовательности созданы 8 пар направленных праймеров с целью повысить эффективность маркирования гена *Or 3*.

В данной работе охарактеризована система маркеров к гену *Or 3*, отвечающему за устойчивость подсолнечника к «молдавской» расе заразицы.

Материалы и методы. Материалом исследования служила популяция F₂ (50 растений), полученная от скрещивания линий подсолнечника ВА 1 (устойчива к заразице, генотип – *Or 3 Or 3*) и К 811 (не устойчива к заразице, генотип – *or 3 or 3*). Для тестирования устойчивости к «молдавской» расе заразицы родительских форм, индивидуальных растений F₂ и F₃ использовали метод ранней диагностики заразицустойчивости [4]. Растения подсолнечника подвергали заражению заразицей в ящиках (6х40х15 см), заполненных почвенно-песчаной смесью. Оценку осуществляли на 25-й день после всходов при инфекционной нагрузке 0,2 г семян заразицы на 1 кг почвенного субстрата. Растения подсолнечника выращивали в условиях 16 часового светового и 8-часового темного периодов. Температурный режим: в пределах 24-28°С днем и 18-23°С ночью. По результатам тестирования выборки семян каждой семьи F₃, дифференцировали исходные устойчивые растения F₂ на гомо- и гетерозиготные по локусу *Or 3*.

ДНК выделяли из этиолированных 5 дневных индивидуальных проростков цетавлоновым методом. Смеси ДНК формировали из ДНК, выделенной из 10 и 21 гомозиготного растения F₂ с генотипами *Or 3 Or 3* и *or 3 or 3*, соответственно.

Для амплификации ДНК использовали праймеры, синтезированные в НПФ «Литех» (Москва, Россия), а также прибор «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Состав реакционной смеси: 50 мМ KCl, 20 мМ трис-HCl (pH 8,4 при 25°С), 0,01% Tween-20, 2 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого праймера, 200 мМ каждого dNTP, 20-30 нг ДНК, 1 ед. Taq-полимеразы. Условия амплификации: начальная денатурация – 1 мин. 95°С, затем 30 циклов при следующих режимах – 30 сек. 95°С, 30 сек. 55°С, 30 сек. 72°С, финальная элонгация – 5 мин. 72°С. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 10%-ных денатурирующих полиакриламидных гелях. Результаты анализировали с помощью системы цифровой документации видеоизображения VDS («Amersham Pharmacia Biotech») и компьютерной программы «Image Master 1D Elite» относительно маркера молекулярной массы – ДНК плазмиды pUC 19, рестрицированной MspI. Секвенирование было любезно проведено Р.Н.Календарём в Биотехнологическом центре (Хельсинки, Финляндия).

Тест на независимое наследование и анализ сцепления проводили согласно [5].

Результаты исследований и их обсуждение. С помощью пары праймеров к локусу RTS 29(1) на предварительном этапе работы получены полиморфные фрагменты амплификации, позволяющие различать линии и контрастные по устойчивости к заразице расы С смеси ДНК: 338 п.н. (характерный для устойчивой линии ВА 1) и 320 п.н. (характерный для неустойчивой линии К 811).

Ампликоны по локусу RTS 29(1) секвенированы с целью дальнейшего усовершенствования маркера к локусу *Or 3*. На основании сиквенса разработаны восемь пар праймеров: RTS 338_A, RTS 338_B, RTS 338_C, RTS 338_D, RTS 338_E, RTS 338_F, RTS 338_G, RTS 338_H.

С помощью семи из перечисленных пар праймеров амплифицирована ДНК родительских линий ВА 1 и К 811, смесей ДНК гомозиготных растений и всех индивидуальных растений популяции F₃, которая получена от скрещивания ВА 1 и К 811. Определены генотипы всех протестированных образцов. Амплификацию по локусу RTS 338_B получить не удалось ни для одного исследованного генотипа. Семь локусов (RTS 338_A, RTS 338_C, RTS 338_D, RTS 338_E, RTS 338_F, RTS 338_G, RTS 338_H) можно считать маркерными относительно признака устойчивости подсолнечника к «молдавской» расе заразицы. Данные маркеры являются кодоминантными и воспроизводимыми.

Получены полиморфные фрагменты амплификации, которые отличают родительские линии и гомозиготные контрастные по устойчивости к заразице (*Orobanche cumana*) расы С смеси ДНК: RTS 338_A_175 п.н., RTS 338_C_177 п.н., RTS 338_D_178 п.н., RTS 338_E_228 п.н., RTS 338_F_226 п.н., RTS 338_G_234 п.н., RTS 338_H_220 п.н. (характерные для устойчивой к заразице линии ВА 1) и RTS 338_A_193 п.н., RTS 338_C_196 п.н., RTS 338_D_197 п.н., RTS 338_E_243 п.н., RTS 338_F_240 п.н., RTS 338_G_244 п.н., RTS 338_H_232 п.н. (характерные для неустойчивой линии К 811) (табл.1).

Таблица 1 – Генотипы линий ВА 1 и К 811 по исследованным локусам

Линия	Аллели по локусам (п.н.)						
	RTS 338_A	RTS 338_C	RTS 338_D	RTS 338_E	RTS 338_F	RTS 338_G	RTS 338_H
ВА 1	175-175	177- 177	178-178	228-228	226-226	234-234	220-220
К 811	193-193	196- 196	197-197	243-243	240-240	244-244	232-232

Использование для оценки устойчивости подсолнечника к заразице локусов RTS 338_A, RTS 338_C, RTS 338_D имеет некоторые преимущества по сравнению с первичным маркером RTS 29(1) в связи с тем, что они выявляют меньшее количество несоответствий в сочетании маркер-признак.

По локусам RTS 338_E, RTS 338_F, RTS 338_G, RTS 338_H для небольшого количества индивидуальных растений популяции F₃, получены ноль-аллели (отсутствие фрагмента амплификации), что, возможно, объясняется изменением в первичной структуре ДНК в сайтах праймирования.

Результаты проведенной работы позволяют считать, что разработанные пары праймеров RTS 338_A, RTS 338_C, и RTS 338_D дали возможность получить систему ДНК-маркеров относительно признака – устойчивость подсолнечника к заразице расы С, которые могут быть рекомендованы для широкого использования в генетико-селекционном процессе.

По результатам гибридологического анализа расстояние между локусами RTS 338_A, RTS 338_C, RTS 338_D и Or 3. составляет 18 сМ ($\chi^2 = 6,94$, $P > 0,009$).

По данным локусам протестирован ряд генотипов подсолнечника - линий и гибридов селекции Селекционно-генетического института – Национального центра семеноведения и сортоизучения, Института масличных культур и Института растениеводства им. В.Я.Юрьева (всего 40 генотипов). В 6 случаях обнаружено несоответствие между аллельным составом генотипа по локусам RTS 338_A, RTS 338_C, RTS 338_D и его фенотипом по признаку устойчивости к заразице. Все родительские формы по данному локусу – гомозиготы. Исходный маркер RTS 29(1) показывал большее количество несоответствий (14) при оценке инбредных линий и гибридов на устойчивость к заразице.

Выводы. Амплификация ДНК растений, расщепляющейся по признаку устойчивости к “молдавской” расе заразицы популяции F₃, позволила выявить фрагменты 175 п.н., 193 п.н. по локусу RTS 338_A; 177 п.н., 196 п.н. по локусу RTS 338_C; 178 п.н., 197 п.н. по локусу RTS 338_D. Данные маркеры дифференцируют родительские формы и пулы ДНК гомозиготных контрастных по устойчивости растений F₃. Определено сцепление данных локусов и Or 3. Протестирована маркирующая способность выявленных ампликонов на выборке генотипов подсолнечника украинской селекции. Разработанная система ДНК-маркеров может быть рекомендована для широкого использования в генетико-селекционном процессе для оценки устойчивости генотипов подсолнечника к растению-паразиту заразице.

ЛИТЕРАТУРА

1. Genetic mapping of the Or 5 gene for resistance to Orobanche race E in sunflower / [Tang S., Heesacker A., Kishore V.K., Fernandez A., Sadik E.S., Cole G., St.J. Knap.] // Crop. Sci. – 2003. – V.43. - P. 1021-1028.
2. Толмачев В.В. Идентификация рас заразицы и генов устойчивости подсолнечника к “молдавской” расе / Толмачев В.В. // Растениеводство, генетика и селекция технических культур. Сб. науч. тр. по прикл. бот., ген. и сел. – 1991. – №144. – С.92-101.
3. Маркирование гена устойчивости к заразице Or 3 у подсолнечника / Солоденко А.Е., Саналатий А.В., Толмачев В.В., Ведмедева К.В., Сиволап Ю.М. // Цитология и генетика. – 2005. – Т.39. - №5. – С. 9-12.
4. Панченко А.Я. Ранняя диагностика заразицоустойчивости при селекции и улучшающем семеноводстве подсолнечника/ Панченко А.Я. // Вестник с.-х. науки. – 1975. - №2. – С.107-115.
5. Тихомирова М.М. Генетический анализ / Тихомирова М.М. // Ленинград: издательство Ленинградского университета, 1990. - 280 с.