

УДК 575.11.113:854.78

А. Є. СОЛОДЕНКО, канд. біол. наук, пров. наук. співр.,
Б. Ф. ВАРЕНИК, канд. с.-г. наук, зав. від.,
О. Є. АЛЕКСАНДРОВА, аспірант,
Ю. М. СИВОЛАП, д-р біол. наук, акад. НААН, зав. відд.
СГІ–НЦНС, Одеса
e-mail: angelika_solo@yahoo.com

РАСОВИЙ СКЛАД ТА СТІЙКІСТЬ ЛІНІЙ СОНЯШНИКУ ДО НЕСПРАВЖНЬОЇ БОРОШНИСТОЇ РОСИ

*Застосуванням набору ліній-диференціаторів визначено расовий склад популяції несправжньої борошністої роси, поширеної на півдні України. Виявлені 330, 710 та 730 патотипи *Plasmopara helianthi* Novot. Найбільш стійкі до них самозапилені лінії Од 202 В та ОС 1029 В. Обговорюється можливість виявлення патогена ДНК-маркерами.*

Ключові слова: несправжня борошніста роса, *Plasmopara helianthi*, раси, соняшник, стійкість, ДНК-маркер.

Вступ. Соняшник — одна з найбільш рентабельних культур в Україні. Але висока економічна ефективність культури призвела до перенасичення нею сівозмін і, як наслідок, до формування нових вірулентних рас багатьох збудників інфекційних хвороб. З-поміж таких патогенів виділяється облигатний гриб ооміцет *Plasmopara helianthi* Novot. — збудник одного з найбільш шкодочинних захворювань соняшнику — несправжньої борошністої роси (НБР), яка може спричинювати значне зниження врожайності.

Екологічно безпечний та економічно вигідний шлях підвищення врожаю — це впровадження у виробництво стійких до хвороби гібридів, які є носіями домінантних генів стійкості до паразита — *Pl*. У популяції *Plasmopara helianthi* відбуваються постійні зміни вірулентності збудника хвороби, завдяки чому він долає стійкість рослини-хазяїна. Протягом значного періоду існували дві фізіологічні раси (патотипи) несправжньої борошністої роси: раса 100 — виключно в Європі, раса 300 — у Північній Америці. Ген *PI1* контролював стійкість проти 100-ї раси, ген *PI2* — проти 100-ї та 300-ї рас патогена. У 1998 р. до Франції з інфікованим насінням з Америки потрапили 710-та та 703-тя раси. Упродовж наступного десятиріччя кількість агресивних патотипів у Європі збільшилась до 17, а взагалі у світі ідентифіковано 35 рас *Plasmopara helianthi*, серед яких переважними за присутністю в популяції та агресивністю є раси 300, 330, 710, 730 та 770 [1, 2]. Поява нових патотипів є результатом еволюції патогена та міжрасової гібридизації. Поділ на раси зумовлений проявом стій-

кості певних ліній-диференціаторів [3]. Дослідження з їхньої генетики дозволили виявити расоспецифічність дії генів *PI*, їхню кластерну організацію в межах трьох груп зчеплення генетичної карти генома соняшнику. Найефективніші гени *PI* ідентифіковані та інтродуковані в культурний соняшник з дикорослих видів *Helianthus*: ген *PI6* — з *Helianthus annuus*, ген *PI5* — з *H. tuberosus*, ген *PI7* — з *H. praecox*, гени *PI8* та *PI_{Arg}* — з *H. argophyllus* [1]. Залежно від комбінації гена стійкості рослини-хазяїна та патотипу *Plasmopara* виявляються два типи стійкості: розвиток патогена обмежується базальною частиною гіпокотиле (I тип); більш масштабна інвазія патогена, який майже повністю осягає гіпокотиле та сім'ядольні листки (II тип). За обох типів стійкості спостерігається реакція надчутливості (hypersensitiverreaction) та припинення розвитку інфекції [4].

Останніми роками, коли в Україну потрапляє велика кількість насінневої продукції соняшнику іноземних фірм-виробників, зростає загроза появи нових рас патогена. Отже, постає проблема постійного контролю вірулентності збудника несправжньої борошнистої роси у зонах активного вирощування соняшнику. Моніторинг стану популяції *Plasmopara helianthi* дозволяє констатувати наявність певних рас, виявляти нові патотипи, прогнозувати ефективність генів *PI*, які присутні в селекційному генофонді, планувати селекційні програми з підвищення стійкості соняшнику до НБР.

Метою нашої роботи була оцінка стійкості рослин та расового складу популяції збудника несправжньої борошнистої роси соняшнику, поширеної на півдні України.

Матеріали та методи. Матеріалом дослідження слугували самозапилені лінії селекції СГІ–НЦНС та колекції зразків, ізоляти збудника несправжньої борошнистої роси, зібрані на полях Експериментальної бази «Дачна» (Одеська область) та в Інституті олійних культур НААНУ (ІОК, м. Запоріжжя). Расовий склад популяції *Plasmopara helianthi* визначали за реакцією стійкості загальновідомих ліній-диференціаторів: НА-288, РНА-265, РНА-274, ДМ-2, РМ-13, РМ-17, 803-І, QHP-І, НА-4, НА-Р5, НА-335, РНА-419, що є міжнародним стандартом для ідентифікації патотипів збудника НБР [5]. Дослідження проводили за експрес-методом лабораторної оцінки соняшнику на стійкість до НБР [6]. Насіння пророщували в термостаті при 25°C протягом 2–3 діб, після чого знімали лушпиння та витримували проростки в суспензії зооспор несправжньої борошнистої роси в термостаті при 13–15° протягом 20–24 год. Після інокуляції проростки розміщували на смужках фільтрувального паперу, які закручували в рулони. Подальший розвиток інокульованих проростків відбувався в кліматичних камерах при 25°. Через 7 діб створювали умови вологої камери при 13–15° на 12–15 год, після чого з появою спорношення гриба на проростках ідентифікували стійкі та уражені зразки.

Для виявлення патогена в тканинах проростків ліній-диференціаторів проводили *полімеразну ланцюгову реакцію з парєю праймерів*, які дозволяють *ампліфікувати* специфічну для *Plasmopara helianthi* послідов-

ність ділянки гена 28 S-PHK [7]. ДНК виділяли цетавлоновим методом. Ампліфікацію здійснювали на приладі «Терцик» (ДНК–технологія, Росія). Електрофорез продуктів ампліфікації проводили в 8 % неденатуруючих поліакриламідних гелях з наступною візуалізацією застосуванням азотнокислого срібла. Документували отримані електрофореграми цифровою відеокамерою.

Результати дослідження та обговорення. Самозапилені лінії селекції СГІ та лінії-диференціатори з міжнародного стандартизованого набору, які різняться своєю стійкістю до певних рас *Plasmopara helianthi* (табл. 1), у лабораторних умовах були інфіковані спорами збудника несправжньої борошнистої роси соняшнику. Популяцію (спори) патогена брали з уражених рослин, зібраних на експериментальних полях ІОК та СГІ.

Таблиця 1

Реакція ліній-диференціаторів на раси збудника несправжньої борошнистої роси соняшнику

Лінії	Раси <i>Plasmopara helianthi</i>																
	100	300	304	310	314	330	334	700	703	704	710	714	717	730	733	734	770
HA-288	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
RHA-265	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
RHA-274	R	R	R	–	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
DM-2	R	R	R	–	–	S	S	R	R	–	S	S	–	S	S	S	S
PM-13	R	R	R	–	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	–	–	–
PM-17	R	R	R	–	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
803-I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
HA-R4	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R
HA-R5	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S*/R**
QHP-I	R	R	R	–	R	R	–	R	S	R	R	R	R	R	R	–	–
HA-335	R	R	S	–	S	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R
RHA-419	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Примітки: S – сприйнятливість, R – стійкість, – – не визначено, * – за даними [1], ** – за даними [8].

Досліджували по 20–25 рослин кожної лінії. За візуальною оцінкою рослини розподіляли на стійкі та сприйнятливі, у останніх на сім'ядольних листках спостерігався білий наліт — спорношення гриба.

Лабораторним методом оцінили стійкість понад 2000 зразків самозапиленних ліній. Результати з найбільш використовуваних зразків подаються у таблиці 2.

У рослин ліній-диференціаторів HA-288, RHA-265, RHA-274 спостерігали відставання у розвитку, процеси загнивання, рясне спорношення на корінцях та сім'ядольних листках; частина проростків загинула ще до оцінювання стійкості. Зразки ліній-диференціаторів DM-2, PM-13 та PM-17 характеризувалися менш пригніченим розвитком, на

сім'ядольних листках більшості проростків кожної лінії з'явились помірне спороношення. Рослини ліній-диференціаторів 803-I, HA-R4, HA-R5, QHP-I, RHA-419 та HA-335 значно відрізнялися за розмірами та виглядом від вищезгаданих ліній: були майже удвоє більші, з добре розвинуеною першою парою справжніх листків, без жодних ознак захворювання.

Таблиця 2

Стійкість самозапилених ліній соняшнику до несправжньої борошнистої роси в лабораторних умовах

Лінія	Ураженість рослин, %			
	2010	2011	2012	2013
Од 1036 А ст.	55,3	60,2	51,4	70,4
Од 1318 В ст.	48,5	46,3	51,2	44,8
ОС 1029 В	0,0	0,0	0,0	0,0
Од 202 В	0,0	0,0	0,0	0,0
Од 1295 В	38,9	48,6	44,5	47,4
Од 2085 А	47,6	38,9	45,4	39,5
Од 1008 А	39,8	42,2	41,6	44,5
Лемпа В	68,7	71,2	66,4	58,7

Для отримання однозначного висновку про відсутність стійкості проростки ліній DM-2, PM-13 та PM-17 дорощували до появи першої пари справжніх листків і знову створювали їм умови вологої камери. Наступне оцінювання показало, що всі рослини виявились ураженими, тому зазначені лінії віднесені до сприйнятливих.

Враховуючи дані щодо вірулентності певних рас *Plasmopara helianthi* стосовно ліній-диференціаторів, виявили расовий склад популяції патогена, поширеної на полях Одеської та Запорізької областей. Результати оцінки дозволяють стверджувати, що на даний час в популяції *Plasmopara helianthi* відсутня раса 770. За даними [8], раса 770 входить до числа найпоширеніших та найагресивніших патотипів, так званих «predominantraces»: 300, 700, 730 та 770, які виявлені майже у всіх країнах, де вирощують соняшник.

Стійкість до несправжньої борошнистої роси ліній-диференціатора HA-335 зумовлена геном *PI6*, дія якого «подолана» расами, нещодавно ідентифікованими в США (714 і 734) та у Франції (304). Результати нашого дослідження виключають наявність рас 304, 314, 334, 704, 714, 717, 734 у місцевій популяції *Plasmopara helianthi*. Реакція ліній-диференціаторів DM-2, PM-13 та PM-17 свідчить про поширення 730-ї раси та не виключає присутність у популяції патогена рас 330, 700 та 710. Більш чітка ідентифікація потребує доповнення стандартного набору ліній-диференціаторів, що активно обговорюється дослідниками [9].

Раса 730 кілька років тому з'явилась у популяції несправжньої борошнистої роси в Україні [10], у регіоні Північного Кавказу [11], у країнах Східної Європи [1]. Гени, що надають стійкості до цієї раси, *PI5*, *PI6*, *PI8*

вже інтродуковані та вивчені щодо їхнього впливу на основні господарські ознаки [10]. З врахуванням поширення в інших країнах патотипів «хх4» та «хх7», а також «predominant-ності» раси 770, найбільшої уваги у подальшій селекції соняшнику на стійкість до НБР потребують джерела генів *PI13* та *PI_{Arg}*, які на теперішній час зумовлюють універсальну стійкість.

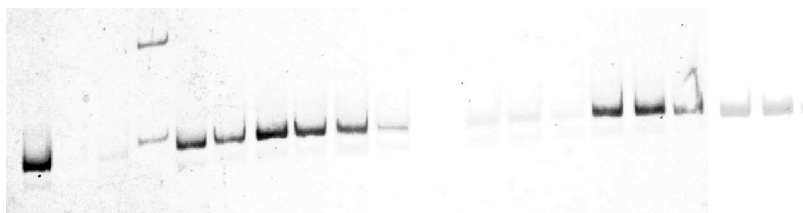
Лабораторна оцінка стійкості великої кількості селекційних зразків здійснюється експрес-методом щорічно у зимовий період. Для одержання належних результатів щодо стійкості необхідно дотримуватись певних умов проведення дослідження: визначений розмір проростків та сформованість сім'ядольних листків на етапі штучного зараження, оптимальне інфекційне навантаження, тобто концентрація зооспорангіїв гриба в інокулюмі, тривалість періоду інокуляції та температурний режим. У масових оцінках можливе певне недотримання методики з об'єктивних причин. Так, у нас рослини різнилися за темпом розвитку, тому неможливо було визначити стійкість усіх зразків одночасно. Крім того, поява спороношення гриба на сім'ядольних листках може свідчити про розвиток реакції стійкості за II типом, тому до формування в інфікованих проростках справжніх листків робити висновок про «сприйнятливність» зарано. Для унеможливлення хибних висновків в окремих випадках на завершальних етапах лабораторної оцінки стійкості має сенс використання ДНК-маркера генома *Plasmopara helianthi*, який є специфічний для цього виду ооміцетів. У нашому дослідженні для ДНК-аналізу брали рослини ліній-диференціаторів після лабораторного тестування стійкості. Матеріалом для виділення ДНК слугували фрагменти корінців, сім'ядольних та справжніх листків проростків, а також спорангії гриба, зняті з уражених зразків. Маркерний фрагмент ДНК розміром 310 пар нуклеотидів, характерний для ділянки гена 28 S-PHK *Plasmopara helianthi*, виявлено в спектрах ампліфікації, отриманих для всіх рослин сприйнятливих ліній-диференціаторів НА-288, РНА-265, РНА-274, ДМ-2, РМ-13 та РМ-17 (рис.). ДНК-маркер свідчив про наявність патогена в тканинах тих проростків ліній ДМ-2, РМ-13 та РМ-17, на сім'ядольних листках яких не з'явилось спороношення гриба (доріжки 9, 16, 18 на електрофореграмі).

У рослинах ліній-диференціаторів 803-І, НА-Р4, НА-Р5, QHP-1, РНА-419 та НА-335, які за результатами лабораторного тестування визначені стійкими до НБР, ДНК патогенного гриба *Plasmopara helianthi* не виявлена.

Моніторинг расового складу популяції збудника НБР, застосування ДНК-маркерів для діагностики патогена, а також удосконалення методів тестування стійкості мають сприяти інтеграції наших досліджень в міжнародну систему контролю над патогеном.

Висновки. У результаті проведеної лабораторної оцінки визначені найбільш стійкі самозапилені лінії Од 202 В та ОС 1029 В. У популяції *Plasmopara helianthi*, що поширена на півдні України, виявлена 730-та раса та не виключається присутність рас 330, 700 і 710. Для отримання об'єктивного висновку при проведенні лабораторної експрес-оцінки

стійкість селекційних форм необхідно оцінювати у проростків соняшнику на стадії сформованих справжніх листків. Для діагностики наявності патогена доцільно використовувати ДНК-аналіз.



1 2 3 M 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Рис. Електрофореграма спектрів ампліфікації ДНК, виділеної з спорангіїв *Plasmopara helianthi* (1, 14); з проростків ліній НА-R4 (2), НА-R5 (3), НА-288 (4), RHA-265 (5), RHA-274 (6), DM-2 (7–9), 803-I (10), QHP-1 (11), RHA-419 (12), НА-335 (13), PM-13 (15–16), PM-17 (17–18). М — маркер молекулярної маси (ДНК pUC 19/Msp I)

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Jocic S. Towards sustainable downy mildew resistance in sunflower / Jocic S., Miladinovic D., Imerovski I., Dimitrijevic A., Cvejic S., Nagl N., Kondic-Spirka A. // *Helia*. — 2012. — 35, N 56. — P. 61–72.
- Vitanyi F. Research progress in sunflower diseases and their management // 17th International Sunflower Conference. — Cordoba, Spain, 2008. — P. 1–12.
- Gulya T. Proposal for standardized nomenclature and identification of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) / Gulya T., Tourvielle de Labrouhe D., Masirevic S., Penaud A., Rashid K., Vitanyi F. // ISA Symposium III: Sunflower downy mildew, 13–14 January 1998. — Fargo, ND, USA, 1998. — P. 130–136.
- Radwan O. Molecular Characterization of Two Types of Resistance in Sunflower to *Plasmopara halstedii*, the Causal Agent of Downy Mildew / Radwan O., Bouzidi M., Mouzeyar S. // *Phytopathology*. — 2011. — 101. — P. 970–979.
- Tourvielle de Labrouhe D. A new race of *Plasmopara halstedii*, pathogen of sunflower downy mildew / Tourvielle de Labrouhe D., Lafon S., Walser P., Raulic I. // *Oleagineux*. — 2000. — V. 7. — P. 404–405.
- Долгова Е. М. Экспресс-метод оценки подсолнечника на устойчивость к ложной мучнистой росе / Долгова Е. М., Аладьина З. К., Михайлова В. Н. // *Селекция и семеноводство*. — 1990. — Вып. 68. — С. 50–55.
- Ioos R. Development of a PCR test to detect the downy mildew causal agent *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds / Ioos R., Laugustin L., Rose S., van Browsershaven I., Baayen R. // *Plant Pathology*. — 2007. — 56. — P. 209–218.
- A. de Romano. A new gene for resistance to downy mildew in sunflower / A. de Romano, Romano C., Bulos M., Altieri E., Sala C. // *Sunflower Breeding on Resistance to Diseases: International Symposium*, 10–14 oct. 2010. — Krasnodar, 2010. — P. 142–147.
- Рамазанова С. Внутривидовый полиморфизм возбудителя ложной мучнистой росы подсолнечника по SNP-локусам ДНК / Рамазанова С., Антоно-

- ва Т., Ивебор М., Стрельников Е. // Н.-т. бюллетень ВНИИМК. — 2012. — Вып. 1 (150). — С. 11–16.
10. Бурлов В. Вихідний матеріал для селекції соняшнику на стійкість до збудника несправжньої борошнистої роси *Plasmoparahalstedii* (Farl.) Berl. Et. DeTonl. / Бурлов В., Бабаянц Л. // Селекція і насінництво: Міжвід. темат. наук. зб. — 2006. — Вип. 92. — С. 16–23.
11. Антонова Т. Новые расы возбудителя ложной мучнистой росы подсолнечника на Северном Кавказе / Антонова Т., Арасланова Н., Ивебор М., Гутчель С., Челюстникова Т., Рамазанова С. // Н.-т. бюллетень ВНИИМК. — 2006. — Вып. 1 (134). — С. 18–23.

Надійшла 15.11.2013 р.

UDC 575.11.113:854.78

Solodenko A. Ye., Varenik B. F., Alexandrova O. Ye., Syvolap Yu. M.
Collected scientific articles of PBGI-NCSCI (in Ukrainian). 2013. Issue 22 (62).

DOWNY MILDEW RACE COMPOSITION AND DEFINITION OF RESISTANCE OF SUNFLOWER LINES

Sunflower Inbred lines Од 202 В and ОС 1029 В were revealed as the most resistant to downy mildew. Differential lines were used to estimate a races composition of downy mildew population that occurs in the South of Ukraine. It was shown 330, 710 and 730 pathotypes of *Plasmopara helianthi* Novot. are present. Using a DNA marker to detect a pathogen is discussed.

Tables — 2. Figures — 1. Bibliography — 11.

УДК 575.11.113:854.78

Солоденко А. Е., Вареник Б. Ф., Александрова А. Е., Сиволап Ю. М. Сборник научных трудов СГІ–НЦНС. 2013. Вип. 22 (62).

РАСОВЫЙ СОСТАВ И УСТОЙЧИВОСТЬ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА К ЛОЖНОЙ МУЧНИСТОЙ РОСЕ

Выявлены наиболее устойчивые к ложной мучнистой росе (ЛМР) самоопыленные линии Од 202 В и ОС 1029 В. С использованием набора линий-дифференциаторов определён расовый состав популяции ложной мучнистой росы, распространённой на юге Украины. Показано наличие 330-го, 710-го и 730-го патотипов *Plasmopara helianthi* Novot. Обсуждается возможность усовершенствования метода тестирования устойчивости за счёт использования ДНК-маркера патогена.

Таблицы — 2. Рисунок — 1. Библиография — 11.