## *ГЕНЕТИКА*

УДК 575.11.113:854.78

А. Є. СОЛОДЕНКО, к. б. н., пров. наук. співроб.,
В. І. ФАЙТ, д. б. н., чл.- кор., зав. від.,
К. М. ХРИСТОДОРОВА, асп.,
Б. Ф. ВАРЕНИК, к. с.- г. н., ст. наук. співроб., зав. від.
СГІ–НЦНС, Одеса
e-mail: angelika_solo@yahoo.com

# ДОБІР ЗА ДНК МАРКЕРАМИ НОСІЇВ ГЕНА *PL*$_{ARG}$ СОНЯШНИКУ (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) ДЛЯ СТВОРЕННЯ ІНБРЕДНИХ ЛІНІЙ, СТІЙКИХ ДО НЕСПРАВЖНЬОЇ БОРОШНИСТОЇ РОСИ

*Проведено молекулярно-генетичне та імунологічне дослідження вихідного матеріалу, який залучено до програми створення інбредних ліній соняшнику, стійких до несправжньої борошнистої роси. Здійснено маркерний добір гібридних рослин від схрещувань лінії — носія гена Pl*$_{ARG}$ *RHA 419 з лініями селекції СГІ–НЦНС ОС 1019В та ОС 1029В за алелями мікросателітних локусів ORS610 та ORS1039. З популяцій* $F_2$ *відібрані рослини, які за генотипом відповідають батьківській лінії RHA 419. Імунологічним тестуванням підтверджена стійкість дібраних зразків до місцевої популяції Plasmopara halstedii.*

Ключові слова: *Helianthus annuus* L., *Plasmopara halstedii,* ДНК маркери, ген *Pl*$_{ARG}$, стійкість, несправжня борошниста роса.

**Вступ**. Основною олійною культурою в Україні є соняшник. Внаслідок порушення науково обґрунтованих рекомендацій щодо площ його посіву і значного перевантаження сівозмін цією культурою поширилася і дуже зросла інтенсивність розвитку хвороб та шкідників і, як наслідок, зменшилася врожайність [1].

Серед патогенів соняшнику одним з найбільш небезпечних є збудник несправжньої борошнистої роси (НБР) — гриб класу ооміцетів *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & de Toni. Гриб розвивається в усіх частинах рослини, переважно в молодих тканинах, залишаючи клітини без достатнього забезпечення асимілятами та водою. *P. halstedii* зустрічається у всіх основних районах вирощування соняшнику. Щорічно відзначаються епіфітотії, за яких рівень ураженості може сягати 60 %, а втрати врожаю — до 50 % [2]. На теперішній час налічують понад 30 рас НБР, серед яких найбільш шкодочинними є 330, 700, 703, 710, 730 та 770 раси [3]. У популяції *P. halstedii,* що поширена на Півдні України, виявлені 730 і 732 раси та не виключається присутність 330, 700 і 710 рас [4; 5].

© Солоденко А. Є., Файт В. І., Христодорова К. М., Вареник Б. Ф., 2017

Екологічно безпечним та економічно вигідним заходом захисту культури від несправжньої борошнистої роси є вирощування гібридів, яким властива генетична стійкість, тому однією з пріоритетних задач селекції соняшнику є створення самозапилених ліній-носіїв домінантних генів *Pl* стійкості до НБР.

Пошук джерел стійкості до НБР ведеться серед зразків світового генофонду соняшнику. Використовуючи різноманіття генетичних ресурсів, селекціонер створює вихідний матеріал, який характеризується максимальним проявом ознаки і відноситься вже до категорії донорів стійкості [6]. Зменшенню обсягів опрацьованого селекційного матеріалу, скороченню терміну, необхідного для створення ліній чи гібридів, а також добору бажаних генотипів у практичній селекції сприяє застосування ДНК маркерів. Маркери, зчеплені з генами, які відповідають за прояв господарсько цінних ознак, дозволяють провести добір на рівні окремої рослини безпосередньо за генотипом, а не за фенотипом, що модифікується дією різноманітних факторів навколишнього середовища [7].

Для використання в селекційних програмах найбільша увага повинна приділятися джерелам генів *Pl8* та $Pl_{ARG}$ [8], що зумовлюють стійкість проти всіх відомих на даний час рас *P. halstedii.* Гени *Pl8* та $Pl_{ARG}$ локалізовані відповідно в 13 та 1 групах зчеплення генетичної карти геному соняшнику [9]. Можливість застосування ДНК маркерів, які дозволяють ідентифікувати ген $Pl_{ARG}$ [10] і значно підвищити ефективність добору зразків з генетично детермінованою стійкістю, надає першочергового значення при створенні сучасних ліній та гібридів соняшнику носіям зазначеного гена. Відома низка ліній-донорів гена $Pl_{ARG}$: ARG1575–2, 79ARGMTP, RHA 419, RHA 420, RHA 443 [11]. Зазначені лінії отримані шляхом добору з південноамериканських популяцій дикорослого соняшнику *Helianthus annuus* L. або у результаті інтрогресивної гібридизації культурного соняшнику з дикорослим видом *Helianthus argophyllus* L. та широко використовуються селекціонерами різних країн для створення стійких ліній і гібридів, адаптованих до умов вирощування певних регіонів.

**Мета** нашої роботи — провести добір вихідного матеріалу за використання маркерів гена $Pl_{ARG}$ в генетико-селекційній програмі відділу селекції та насінництва гібридного соняшнику СГІ–НЦНС, яка спрямована на створення нових інбредних ліній зі стійкістю до несправжньої борошнистої роси.

**Методика.** Матеріалом дослідження слугували самозапилені лінії-відновники фертильності пилку соняшнику селекції СГІ–НЦНС: ОС 1019В та ОС 1029В та лінія RHA 419, яка залучена в селекційну програму зі створення стійких до несправжньої борошнистої роси нових інбредних ліній, адаптованих до вирощування в Україні; зразки $F_1$ і сегреганти популяцій $F_2$ та $F_3$ від комбінацій схрещування RHA 419 х ОС 1029В та RHA 419 х ОС 1019В. Лінія RHA 419 є носієм гена стійкості $Pl_{ARG}$. Лінії ОС 1019В та ОС 1029В не ідентифіковані за наявністю певних генів *Pl.*

Імунологічне дослідження проводили за експрес-методом лабораторної оцінки соняшнику на стійкість до НБР [12] із використанням ізолятів збудника несправжньої борошнистої роси, зібраних на полях ДП «Експериментальна база «Дачна» (Одеська область). Насіння пророщували в термостаті при 25 °С протягом 2–3 діб, після чого знімали лушпиння та витримували проростки в суспензії зооспор несправжньої борошнистої роси в термостаті при 13–15 °С протягом 20–24 год. Після інокуляції проростки (по 20–25 шт.) розміщували на смужках фільтрувального паперу, які закручували в рулони. Подальший розвиток інокульованих проростків відбувався в кліматичних камерах при 25 °С. Через 7 діб створювали умови вологої камери при 13–15 °С на 12–15 год, після чого з появою спороношення гриба на проростках ідентифікували стійкі та уражені зразки.

Для молекулярно-генетичного дослідження використовували листя та насіння рослин. ДНК виділяли цетавлоновим методом. Ампліфікацію здійснювали на приладі «Терцик» (ДНК–технологія, РФ). 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, 1 х трис-боратний буфер) з наступною візуалізацією азотнокислим сріблом. Документували отримані електрофореграми цифровою відеокамерою. Молекулярний розмір фрагментів ДНК визначали за програмою «GelAnalyzer 2010» відносно маркерів довжини фрагментів ДНК: GeneRuler 50 b. p., pUC 19 / MspI. Інформацію щодо нуклеотидних послідовностей праймерів для аналізу мікросателітних локусів отримали з бази даних [13].

**Результати досліджень та обговорення.** У відділі селекції та насінництва гібридного соняшнику СГІ–НЦНС виконується науково-дослідна робота зі створення генотипів, стійких до найбільш агресивних на сьогоднішній день рас несправжньої борошнистої роси. Донором стійкості обрана лінія RHA 419, в генотипі якої присутній ген $Pl_{ARG}$. Ця лінія має походження від ARG1575–2 (cmsHA89 x *H. argophyllus*) [14]. Рекурентні генотипи в програмі гібридизації з донором гена $Pl_{ARG}$ — кращі за комплексом господарсько цінних ознак інбредні лінії-відновники фертильності пилку селекції СГІ–НЦНС ОС 1019В та ОС 1029В.

Раніше за дослідження 16 мікросателітів 1-ї групи зчеплення генетичної карти соняшнику нами була виявлена низка маркерних щодо гена $Pl_{ARG}$ локусів та показано, що детекція певних алелів за цими локусами дозволяє ідентифікувати генотипи — носії гена $Pl_{ARG}$: зразки *H. argophyllus* або лінії RHA 419, RHA 420, RHA 443 [8; 10]. ПЛР-аналізом за маркерними мікросателітними локусами *ORS610, ORS509, ORS1182, ORS1039,*

*ORS605* розрізнили лінії RHA 419, OC1019B, OC 1029B (рис. 1), а використання маркерів *ORS610* та *ORS1039*, що фланкують ген $Pl_{ARG}$, дозволило ідентифікувати гетерозиготні $F_1$ та гетерозиготні і гомозиготні $F_2$ рослини від схрещувань RHA 419 x OC 1029B та RHA 419 x OC 1019B [15].

1 2 3 4 5 6

Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК ліній RHA 419 (2, 6), OC 1019B (1, 4), OC 1029B (3, 5) за мікросателітними локусами *ORS1039* (1–3) та *ORS610* (4–6)

За лабораторного імунологічного тестування батьківські лінії розрізнялися за стійкістю до місцевої популяції несправжньої борошнистої роси. Лінії RHA 419 і OC 1029B проявили повну стійкість, лінія OC 1019B показала 100 % ураження (табл.). Тобто в генотипах ліній RHA 419 та OC 1029B наявні ефективні гени, які забезпечують стійкість до всіх рас місцевої популяції патогена, а лінія OC 1019B є носієм тільки рецесивних генів або подоланих генів стійкості. Для імунологічного дослідження $F_2$ використали частку насіння з кожної рослини $F_1$ з підтвердженим гетерозиготним генотипом за маркерними щодо гена $Pl_{ARG}$ локусами.

За лабораторної оцінки $F_2$ від схрещування RHA 419 x OC 1019B виявлено розчеплення за стійкістю. Взагалі визначено 96 стійких та 18 уражених рослин $F_2$. Таке розчеплення за стійкістю не відповідає теоретично очікуваному при моногенному контролі ознаки співвідношенню 3:1, за якого повинна була б спостерігатися дещо більша кількість нестійких рослин ($\chi^2_{3:1}$ дорівнює 5,15, що суттєво більше $\chi^2$=3,84 для df=1 при P=0,05). Невідповідність розчеплення за певними ознаками зумовлюється, як правило, впливом на прояв ознаки генів-модифікаторів, недотриманням методичних вимог при проведенні оцінки ознаки, використанням генетично неоднорідного вихідного матеріалу або недостатніх вибірок, наявністю чужорідних транслокацій у вихідному матеріалі, а також випадковими причинами.

У популяції $F_2$ від схрещування RHA 419 x OC 1029B виявили 95 стійких зразків та шість з ознаками ураження. Таке розчеплення за стійкістю відповідає співвідношенню 15:1, яке спостерігається при дигенному контролі ознаки (критерій $\chi^2_{15:1}$ дорівнює 0,015, що значно менше $\chi^2$=3,84 для df=1 при P=0,05). За наявності одного домінантного алеля будь-якого з двох генів стійкості зразок $F_2$ від схрещування RHA 419 x OC 1029B є стійким до місцевої популяції НБР. За отриманими даними можливо стверджувати, що в генотипі лінії OC 1029B є ген *Pl,* який контролює стійкість

Таблиця

Розчеплення на рослини, що стійкі або уражені збудником НБР, батьківських ліній ($P_1$, $P_2$) і гібридів $F_2$ комбінацій схрещування RHA 419 x ОС 1019В та RHA 419 x ОС 1029В

| Гібридна комбінація | $P_1$ | $P_2$ | $F_2$ | $\chi^2$ | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 3:1 | 15:1 |
| RHA 419 x ОС 1019В | 18:0 | 0:20 | 96:18 | 5,15 | – |
| RHA 419 x ОС 1029В | 18:0 | 20:0 | 95:6 | – | 0,015 |

до рас НБР, присутніх у місцевій популяції патогена. Дослідження [4; 5] свідчать про поширення в південно-східній Україні 330, 700, 710, 730 та 732-ї рас НБР, серед яких останні дві є найагресивнішими. Гени, що надають стійкості до цієї раси: *Pl5*, *Pl6*, *Pl8.* Найбільш імовірною є наявність у генотипі ОС 1029В гена *Pl6,* що був перенесений свого часу в культурний соняшник з екотипів *H. annuus. Pl6* контролює стійкість до 700, 703, 710 та 730-ї рас НБР, але дія цього гена подолана новими расами [16]. За даними відділу селекції та насінництва гібридного соняшнику лінія ОС 1029В показує стабільну стійкість до місцевої популяції НБР протягом тривалого часу. Натомість, як показано у дослідженні Б. Ф. Вареника із співавторами [17], кращі лінії одеської та харківської селекції, які зовсім не мали ознак ураження НБР навіть у сприятливий для розвитку патогена рік, при підвищенні інфекційного навантаження на провокаційному фоні збудника виявилися ураженими. Тому необхідність введення ефективного проти всіх відомих патотипів НБР гена $Pl_{ARG}$ в генофонд ліній укранської селекції, в тому числі тих, стійкість яких досі не подолана расами місцевої популяції патогена, не викликає сумнівів.

Молекулярно-генетичний аналіз ДНК, яку виділяли з листя індивідуальних рослин $F_2$ популяцій RHA 419 x ОС 1019В та RHA 419 x ОС 1029В, дозволив поділити їх за наявністю або відсутністю алелів маркерних локусів *ORS610* та *ORS1039* на три класи. Перший клас складали рослини, в генотипі яких присутні алелі лінії RHA 419. До другого класу віднесені рослини, що є носіями алелів, характерних для лінії ОС 1019В або ОС 1029В. Третій клас — гетерозиготні рослини, для яких характерні алелі обох батьків. За результатами маркерного аналізу популяцій $F_2$ RHA 419 x ОС 1029В та RHA 419 x ОС 1019В для подальшої селекційної роботи рекомендовані гомозиготні сегреганти, генотип яких відповідає генотипу батьківської лінії-донора гена $Pl_{ARG}$ RHA 419 (рис. 2: доріжки 1; 2; 4).

З вивчених двох популяцій $F_2$ загальною кількістю 60 рослин відібрано п’ять, які за генотипом відповідають лінії-донору гена $Pl_{ARG}$ RHA 419, тобто мають алелі 130 п. н. за локусом *ORS610* та 190 п. н. за локусом *ORS1039*. За лабораторною оцінкою стійкості зразків $F_3$, які є нащадками вищезазначених п’яти рослин $F_2$, показана відсутність розчеплення: всі рослини виявилися стійкими. Отже, використання імунологічної оцінки стійкості дозволило верифікувати дані маркерного добору.

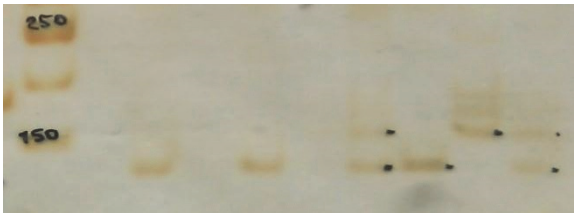


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК рослин $F_2$ RHA 419 х ОС 1029В за мікросателітним локусом *ORS610* (3, 6 — гетерозиготні зразки; 1, 2, 4 — гомозиготні зразки з алелем 130 п. н.; 5 — гомозиготний зразок з алелем 147 п. н.). М — маркер довжини фрагментів GeneRuler 50 b. p.

Рослини $F_2$ — носії гена стійкості $Pl_{ARG}$ в гомозиготному стані в подальшому будуть задіяні для створення інбредних ліній з генетично зумовленою стійкістю проти всіх відомих рас НБР.

**Висновки.** Проведено молекулярно-генетичне дослідження вихідного матеріалу, що залучений до програми створення інбредних ліній соняшнику, стійких до несправжньої борошнистої роси, за мікросателітними локусами, які щільно зчеплені з геном стійкості $Pl_{ARG}$. Маркерним аналізом визначені генотипи сегрегантів $F_2$, які отримані в результаті схрещування лінії RHA 419 (носій гена стійкості $Pl_{ARG}$) з інбредними лініями селекції СГІ–НЦНС ОС 1019В та ОС 1029В. Поєднання даних маркерного та імунологічного аналізів дозволило ідентифікувати зразки $F_2$ — носії гена стійкості $Pl_{ARG}$ в гомозиготному стані для подальшого використання в селекції на стійкість до НБР.

СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ

1. Пузік В. К., Петров В. М., Бабарика Я. В. Стан і перспективи вирощування та формування ринку соняшнику в Україні. Агрономіка соняшника. Наук.-практ. збірник. 2014. Т. 2. С. 46–50.
2. Кириченко В. В. Селекция и семеноводство подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). Харьков: МАГДА LTD, 2005. 385 с.
3. Mulpuri S., Liu Z., Femg J. 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.
4. Солоденко А. Є., Вареник Б. Ф., Александрова О. Є., Сиволап Ю. М. Расовий склад несправжньої борошнистої роси та стійкість ліній соняшнику. Зб. наук. праць СГІ–НЦНС. 2013. Вип. 22 (62). С. 117–123.
5. Боровська І. Ю. Методологічні основи стійкості соняшнику до основних хвороб та їх практичне використання: Автореф. дис. … д. с.- г. н.: спец. 06.01.05 «Селекція і насінництво». Харків, 2017. 51 с.
6. Петренкова В. П. Стан і перспективи селекції соняшнику на стійкість до хвороб. Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. «Стійкість соняшнику до біо- та абіотичних чинників» (24–25 червня 2014, Харків). Харків, 2014. С. 16–20.

7. Литвиненко М. А., Топал М. М., Шестопал О. Л., Замбріборщ І. С., Галаєв О. В. Удосконалена технологія селекційного процесу пшениці м'якої озимої з використанням біотехнологічних і молекулярно-генетичних методів. Науково-методичний посібник. Одеса, 2015. 42 с.
8. Солоденко А. Є., Файт В. І. Ідентифікація джерел стійкості соняшника до несправжньої борошнистої роси та вовчка за ДНК-маркерами. Вісник Харківського нац. аграр. ун-ту. Серія Біологія. 2016. Вип. 3 (39). С. 57–63.
9. 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.
10. Солоденко А. Є., Бурлов В. В., Сиволап Ю. М. Маркери гена стійкості соняшника до несправжньої борошнистої роси. Вісник Харківського нац. аграр. ун-ту. Серія Біологія. 2014. Випуск 3 (33). С. 59–65.
11. Wieckhorst S., Bachlava E., Duble C., Tang S., Gao W.,et al. 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.
12. Долгова Е. М., Аладьина З. К., Михайлова В. Н. Экспресс-метод оценки подсолнечника на устойчивость к ложной мучнистой росе. Селекция и семеноводство. 1990. Вып. 68. С. 50–55.
13. 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.
14. Miller J., Gulya T., Seiler G. Registration of five fertility restorer sunflower germplasms. Crop Csi. 2002. V. 42. P. 989–991.
15. Солоденко А. Є., Файт В. І. Ідентифікація генотипів соняшника гібридного походження за маркерами гена $Pl_{ARG}$ стійкості до несправжньої борошнистої роси. Физиология растений и генетика. 2017. Т. 47. № 6. С. 506–512.
16. Delmotte F., Giresse X., Richard-Cervera S., M'Baya J., Vear F. et al. Single nucleotide polymorphism reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. Infect. Genet. Evol. 2008. V. 8. P. 534–540.
17. Вареник Б. Ф., Боровська І. Ю., Дарморис К. М. Стійкість до захворювань самозапилених ліній та гібридів соняшнику (*Helianthus annuus* L.) вітчизняної селекції. Зб. наук. праць СГІ–НЦНС. 2016. Випуск 28 (68). С. 44–55.

Надійшла 04.04.2017

UDC 575.11.113:854.78

**Solodenko A. Ye., Fayt V. I., Christodorova K. M., Varenyk B. F.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations
e-mail: angelika_solo@yahoo.com

## USING OF DNA MARKERS OF GENE *PL*$_{ARG}$ WHILE CREATING OF RESISTANT TO DOWNY MILDEW SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) INBRED LINES

Molecular-genetic and immunological studies of the initial material which is used in the program of creating of resistant to downy mildew inbred sunflower lines were carried out. Hybrid plants from the crossing of the line-carrier of *Pl*$_{ARG}$ gene RHA 419 with the lines of PBGI breeding OS 1019B and OS 1029B were received. Hybrid plants were genotyped by alleles of microsatellite loci *ORS610* and *ORS1039*. Marker assisted selection was used to detect $F_2$ plants with genotype corresponding to parent line RHA 419. Immunological testing confirmed the resistance of the selected segregants to the local population of *Plasmopara halstedii*.

УДК 575.11.113:854.78

**Солоденко А. Е., Файт В. И., Христодорова Е. М., Вареник Б. Ф.** СГИ–НЦСС, Одесса
e-mail: angelika_solo@yahoo.com

## ОТБОР ПО ДНК МАРКЕРАМ НОСИТЕЛЕЙ ГЕНА *PL*$_{ARG}$ ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К ЛОЖНОЙ МУЧНИСТОЙ РОСЕ

Провели молекулярно-генетическое и иммунологическое исследование исходного материала, который используется в программе создания инбредных линий подсолнечника, устойчивых к ложной мучнистой росе. Осуществили маркерный отбор гибридных растений от скрещивания линии — носителя гена *Pl*$_{ARG}$ RHA 419 с линиями селекции СГИ–НЦСС ОС 1019В и ОС 1029В по аллелям микросателлитных локусов ORS610 и ORS1039. Из популяции $F_2$ отобраны растения, которые по генотипу соответствуют родительской линии RHA 419. Иммунологическим тестированием подтверждена устойчивость отобранных образцов к местной популяции *Plasmopara halstedii.*