

УДК 633.63:632.3.38:632.938.1

М.В. РОЇК, А.К. НУРМУХАММЕДОВ, Н.О. ВАСИЛЬЄВА, Л.В. ШАЮК,  
 Н.В. БІЛОУС, В.П. РАДЧЕНКО  
 Інститут цукрових буряків УААН  
 Е ПЕСЦОВА, К SCHNEIDER.  
 Max Planck Institute for Plant Breeding Research (MPIZ)

ПОШУК НОВИХ ДЖЕРЕЛ СТІЙКОСТІ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ ДО РИЗОМАНІЇ

Досліджено наявність гена стійкості до ризоманії Rr1 ("Холі" )в 10 стійких до хвороби селекційних матеріалах Інституту цукрових буряків УААН за допомогою двох маркерів - B40S і B2S. Встановлено відсутність гена Rr1a в цих матеріалах, а наявність алелів біля гена, можливо, пов'язана з генами - аналогами (RGAs) або ж з позиційним ефектом гена Rr1.

Вступ. Ризоманія є надзвичайно шкочинною карантинною хворобою цукрових буряків - зниження урожайності сягає 60-80 %, при цьому цукристість коренеплодів знижується з 16-18 % до 10% і нижче [3, 4]. Хворобу спричиняє вірус некротичного пожовтіння жилок буряків (ВНПЖБ), який переноситься ґрунтовим плазмодіофоровим грибом *Polymyxa betae* Keskin [6].

Одним із основних джерел стійкості до ризоманії є ген „Холі" (Rr1), розташований в 3-ій хромосомі цукрових буряків. У Європі площа посіву сортів з геном Rr1 сягає більше, ніж 680 тис. га. Відома також лінія *B. vulgaris subsp. maritima* WB 42, в якій виявлено другий доміантний ген стійкості до ризоманії (Rr2). Використовується і лінія KWS 8136, яка має подвійну стійкість (лінія „Холі" та *B. vulgaris subsp. maritima*) [5]. Крім того, фірмою Syngenta Seeds AG отримано стійкі до ризоманії трансгенні цукрові буряки на основі гена білка оболонки вірусу. Отже, пошук та впровадження нових джерел стійкості до ризоманії є актуальним напрямом селекції цукрових буряків.

У даній статті представлені результати роботи з пошуку нових джерел стійкості серед селекційних матеріалів Інституту цукрових буряків УААН.

Матеріали та методи. Матеріалами для досліджень були 10 вихідних селекційних матеріалів цукрових буряків (S<sub>2</sub>), відібрані протягом 1984-1988 рр. на природному інфекційному фоні ризоманії в Киргизстані. Повторну оцінку чутливості стійких ліній проводили у 2002-2003 рр. на природно інфікованій ВНПЖБ ділянці в Рівненській області. Визначення стійкості ліній до ВНПЖБ проводили методом імуноферментного аналізу (ІФА)[1] з використанням комерційної антисироватки фірми Boehringer Mannheim GmbH.

Для пошуку генотипів цукрових буряків з геном Rr1 застосовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). ДНК екстрагували з проростків за допомогою СТАБ-буферу. Визначення генотипів за локусу гена Rr1 здійснювали, застосовуючи стандартний метод ПЛР. Для детекції гена Rr1 використовували два маркери - B40S і B2S, які розташовані відокремлено з різних боків гена Rr1 на відстані 0,3 і 1,2 сМ відповідно. Продукти ампліфікації розділяли в 1,5 %-вому агарозному гелі і після фарбування бромистим етидієм візуалізували за допомогою УФ-транслюмінатора.

Результати досліджень та їх обговорення. Симптоми ризоманії цукрових буряків у колишньому Радянському Союзі були вперше відзначені в Киргизстані в 1979 р. і з того часу розпочалася селекційна робота зі створення стійких до хвороби матеріалів. Для доборів використовували стійкі до церкоспорозу та гнилей коренеплодів селекційні матеріали цукрових буряків. За результатами цих досліджень в ІЦБ УААН були відібрані селекційні матеріали, які мали відносно високу стійкість та врожайність порівняно зі стандартними сортами на інфекційному фоні ризоманії. Проте, із розпадом СРСР, роботи в такому напрямку були припинені і тільки з появою ризоманії в Україні було відновлено дослідження зі створення власних селекційних матеріалів, стійких до хвороби.

Оцінка селекційних матеріалів на інфекційному фоні ризоманії показала, що деякі з них за стійкістю до ризоманії не поступаються стійким іноземним матеріалам - сорту Rizor та стійкій лінії фірми KWS (рис. 1).

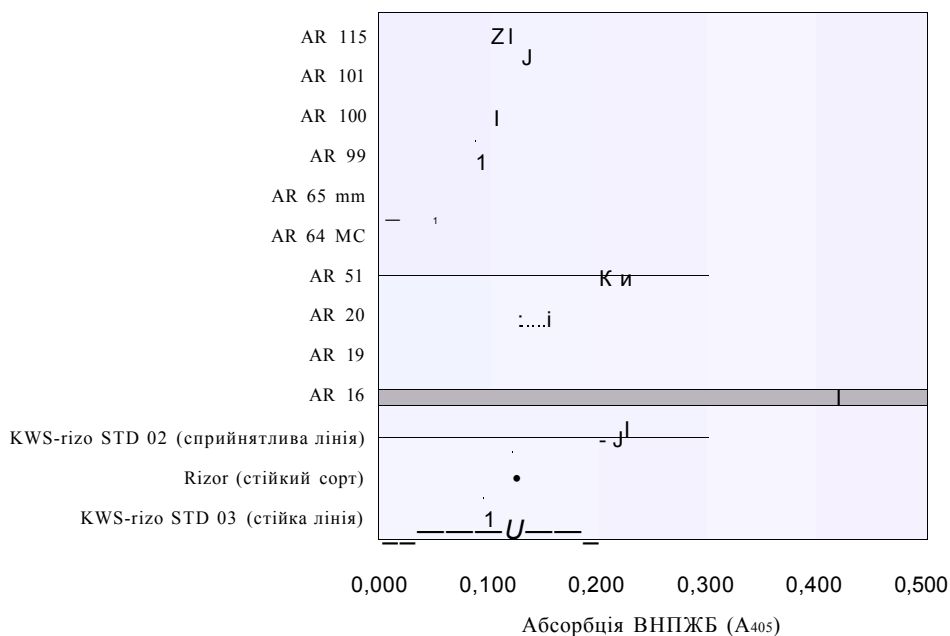


Рис.1. Ураженість ризоманією селекційних матеріалів цукрових буряків, відібраних в Киргизстані (Радивилівський р-н Рівненської області, 2002-2003 рр.)

Дослідження методом ІФА показало, що лінії AR-19, AR-64 MC, AR-99 мали високий рівень стійкості. Разом із тим слід зазначити, що всі досліджувані матеріали на інфекційному фоні ВНПЖБ за врожайністю поступалися стійким стандартам.

На нашу думку, стійкість селекційних матеріалів, відібраних в умовах Киргизстану, не пов'язана з відомими генами Rr1 і Rr2, тому що селекційний процес у колишньому СРСР був закритим. Для перевірки цієї гіпотези за допомогою STS маркерів проведено дослідження ідентичності гена (iv), який обумовлює(ють) стійкість цих ліній, з геном Rr1. Стійкі до ризоманії матеріали були проаналізовані за двома маркерами - B40S і B2S (табл.). Для найближчого маркера (B40S) у матеріалах, відібраних в умовах Киргизстану, відповідного алеля для Rr1 гена не виявлено. Для маркерного гена B2S, розташованого на відстані 1,5 cM від Rr1, такі алелі виявлені для ліній AR 51, AR 19, AR 101 і AR 100 (рис. 2). Більшість проаналізованих матеріалів на рівні ДНК виявилися поліморфними - навіть в середині однієї лінії виявлено декілька алелів, що значно ускладнило обробку отриманих результатів. Тільки в одній рослині лінії AR 19 було встановлено наявність маркерного алеля.

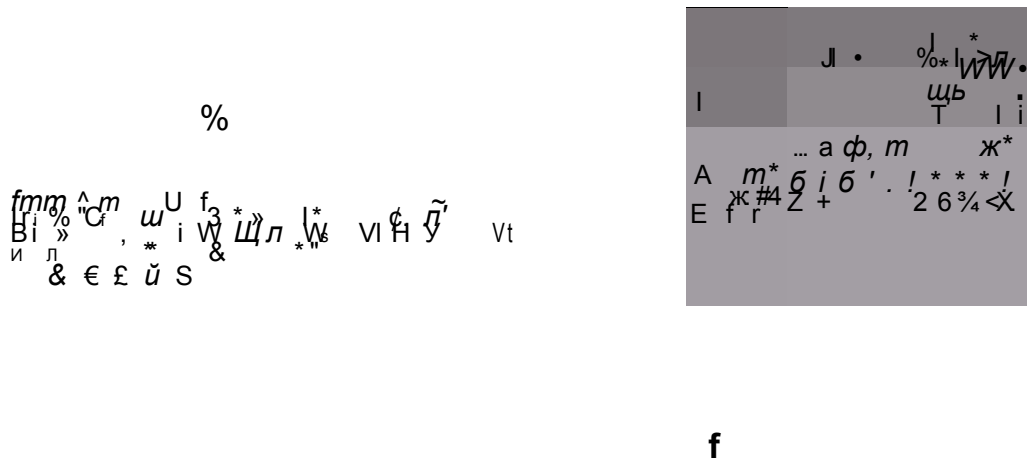


Рис. 2. Електрофореграма B28-фрагментів ДНК гена Rr1 для досліджуваних зразків цукрових буряків

Таблиця

Результати STS та частота зустрічаємості локусів у досліджуваних  
генотипах цукрових буряків

Лінія	Маркер		
	B40S		B2S
	<u>0,3 см проксимальний</u>		<u>1,2 см дистальний</u>
	локус	частота алеля,%	локус
AR 16	s+1	80	s2+x
		20	s2+3
AR 19	s+1	30	s2
		70	1+r
AR 20			s2+x
		100	s1+1
AR 99		100	s2+1
AR 100		100	s2
AR 101			s2+r
		100	s2+3
AR 51		100	r+1
AR 115		<u>12,5</u>	s2+3
	s+1	<u>87,5</u>	s2
AR 64MC	s+1	50	s2+1
		50	s2+3
AR 65 mm		20	s2
	s+1	40	s2+1
		40	s2+3
<u>ZR0276-6-г (стійка)</u>		100	s2
<u>ZR0276-12-г (стійка)</u>		100	s2+1
<u>ZR0276-15-S (сприйнятлива)</u>		100	s1
<u>RZ2-P1a-s (сприйнятлива)</u>		100	s2
<u>RZ2-P2r-г (проміжна)</u>	s+r	100	
<u>RZ2-F1-г (проміжна)</u>	s+r	100	s2+r

Примітка, г- стійкий алель; s, s1 і s2 - сприйнятливі алелі; 1, 2... інші алелі;  
x - адитивні неспецифічні фрагменти

Висновки. За результатами досліджень виявлено, що матеріали, відібрані в умовах Киргизстану, не містять Rr1 гена, а наявність алелів біля гена, можливо, пов'язана або з генами - аналогами (RGAs), яких відомо на сьогодні близько 47 [2], або ж позиційним ефектом гена Rr1. Подальші дослідження будуть спрямовані на уточнення особливостей стійкості селекційних матеріалів і пошук специфічних маркерів для їх ідентифікації, а також на проведення добору для підвищення генетичної однорідності та показників продуктивності матеріалів.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Henry C. M., Harju V., Brewer G., Barker I. Methods for the detection of Rhizomania in soil // *Aspects of Applied Biology*. - 1992. - V.32. - P. 129-133.
2. Hunger S, Di Gaspero G, Mohring S, Bellin D, Schafer-Pregl R, Borchardt DC, Durel CE, Werber M, Weisshaar B, Salamini F, Schneider K. Isolation and linkage analysis of expressed disease-resistance gene analogues of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // *Genome*. - 2003. - 46, (1). - P. 70-82.
3. Johansson E. Rhizomania in sugar beet - a threat to beet growing that can be overcome by plant breeding // *Sveriges Utsadesforenings Tidskrift*. - 1985. - 95. - P.115-121.
4. Richard-Molard M. S. Rhizomania: a world-wide danger to sugar beet // *Span*. - 1985. - 28. - P. 92-94.
5. Scholten O.E., Lange W. Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: A review // *Euphytica*. - 2000. - 112 - P. 219-231.
6. Tamada T., Baba T. Beet necrotic yellow vein virus from rhizomania-affected sugar beet in Japan // *Ann. Phytopath. Soc. Japan*. - 1973. - 43. - P.583-586.

#### Аннотация

УДК 633.63:632.3.38:632.938.1

Поиск новых источников устойчивости сахарной свеклы к ризомании

Н.В. Роик, А.К. Нурмухаммедов, Н.А. Васильева, Л.В. Шаюк,  
Н.В. Белоус, В.П. Радченко, Е. Песцова, К. Schneider

Исследовано наличие гена устойчивости к ризомании Rr1 ("Холли") в 10 устойчивых к болезни селекционных материалах Института сахарной свеклы УААН с помощью двух маркеров - B40S и B2S. Установлено отсутствие гена Rr1 в этих материалах, а наличие аллелей вблизи гена, возможно, связано с генами - аналогами (RGAs) или с позиционным эффектом гена Rr1.

Annotation

UDC 633.63:632.3.38:632.938.1

Search for new sources of resistance of sugar beet to rhizomania

M. Roik, A. Nurmukhammedov, N. Vasilyeva, L. Shayuk,  
N. Bilous, V.Radchenko, E. Pestsova, K. Schneider

The presence of the Rr1 (Holly) gene for resistance to rhizomania was investigated in 10 rhizomania resistant breeding materials of the Institute for Sugar Beet of UAAS, with the help of the two markers: B40S and B 2S. It was established that the Rr 1 gene was absent in these materials, and the presence of alleles near the gene may be connected with genes-analogues (RGAs) or with a positional effect of the Rr1 gene.