

А.Е. СОЛОДЕНКО<sup>1</sup>, А.В. САНАЛАТИЙ<sup>1</sup>,  
В.В. ТОЛМАЧЕВ<sup>2</sup>, К.В. ВЕДМЕДЕВА<sup>2</sup>,  
Ю.М. СИВОЛАП<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Южный биотехнологический центр в растениеводстве  
УААН и МОН Украины, Одесса

e-mail: yuri@genome.intes.odessa.ua

<sup>2</sup> Институт масличных культур УААН, Запорожье

## МАРКИРОВАНИЕ ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ К ЗАРАЗИХЕ *Or 3* У ПОДСОЛНЕЧНИКА



*Для поиска ДНК-маркера к гену Or 3, контролирующему устойчивость подсолнечника к «молдавской» расе заразики (раса С), использован анализ расщепляющихся смесей ДНК (метод BSA) и амплификация по локусам RTS. Выявлены полиморфные фрагменты амплификации, дифференцирующие контрастные по устойчивости родительские формы и растения F<sub>2</sub>. Определено сцепление кодоминантного маркера и локуса Or 3.*

© А.Е. СОЛОДЕНКО, А.В. САНАЛАТИЙ,  
В.В. ТОЛМАЧЕВ, К.В. ВЕДМЕДЕВА,  
Ю.М. СИВОЛАП, 2005

**Введение.** Для повышения эффективности гибридной селекции подсолнечника особый интерес представляют изучение исходного материала и ранняя диагностика генетически детерминированной устойчивости к наиболее распространенным патогенам.

Интеграция быстро развивающихся молекулярных технологий с традиционными методами селекции растений может ускорить процесс создания новых генотипов с комплексом необходимых признаков.

Обязательным требованием, предъявляемым к гибридам подсолнечника при их создании и регистрации, является наличие у них устойчивости к растению-паразиту — заразику. В настоящее время на производственных посевах подсолнечника заразику представлена в основном расой С («молдавской»), устойчивость к которой связана со специфической защитной реакцией в сосудах корней и контролируется одним доминантным геном *Or 3* [1]. Создание ДНК-маркеров к гену *Or 3* позволит сократить сроки тестирования заразикуустойчивости генотипов, а также, что чрезвычайно важно в практической селекции, проводить такой анализ на любой стадии развития растения.

Использование RAPD-техники [2] в сочетании с анализом расщепляющихся смесей ДНК (BSA — bulked segregant analysis) [3] дает возможность идентифицировать молекулярные маркеры, тесно сцепленные с генами устойчивости [3—5]. У подсолнечника такая стратегия позволила выявить несколько маркеров, которые сцеплены с геном *Or 5*, отвечающим за устойчивость к испанской популяции заразики расы Е [6]. В результате изучения генетики устойчивости подсолнечника к заразику выдвинута гипотеза о кластеризации генов *Or 1—Or 5* подобно генам устойчивости подсолнечника к ложной мучнистой росе — *Pl 1*, *Pl 2* и *Pl 6*, формирующим кластер и сцепленным с одними и теми же ДНК-маркерами [7].

Целью настоящей работы являлось маркирование гена устойчивости подсолнечника к заразику *Or 3*.

**Материалы и методы.** Материалом исследования служила популяция F<sub>2</sub> (50 растений), полученная от скрещивания линий подсолнечника ВА 1 (устойчива к заразику, генотип — *Or 3Or 3*) и К 811 (не устойчива к заразику, генотип — *or 3or 3*). Для тестирования устойчи-

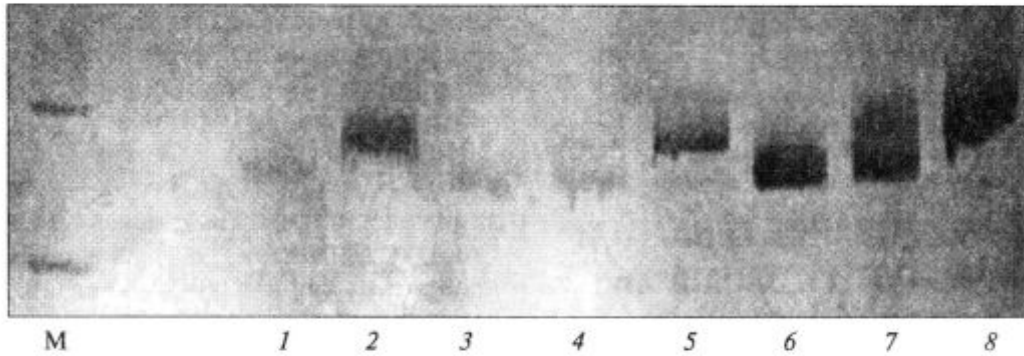


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации по локусу RTS 29(1) в 10%-ном ПААГе: 1 — линия ВА 1 (*Or 3Or 3*); 2 — линия К 811 (*or 3or 3*); 3, 4, 6, 7 — смесь ДНК растений  $F_2$  с генотипом *Or 3Or 3*; 5, 8 — смесь ДНК растений  $F_2$  с генотипом *or 3or 3*; М — маркер молекулярной массы

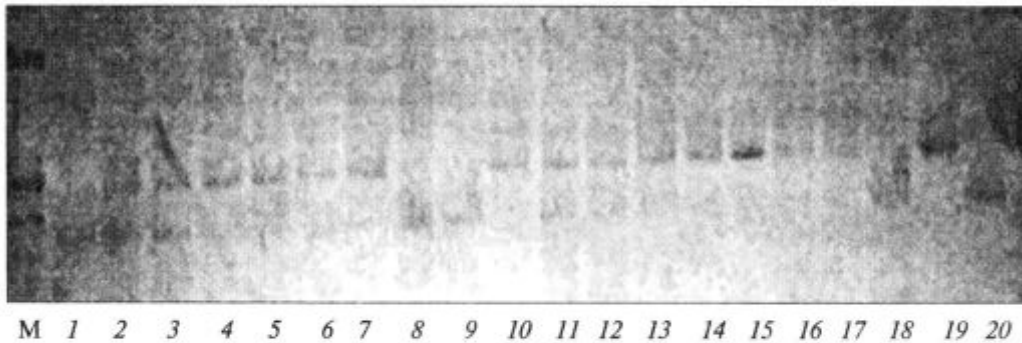


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации по локусу RTS 29(1) ДНК индивидуальных растений тестируемой популяции (1—20). М — маркер молекулярной массы

востости к «молдавской» расе заразики родительских форм, индивидуальных растений  $F_2$  и  $F_3$  использовали метод ранней диагностики заразиоустойчивости [8]. Растения подсолнечника подвергали заражению заразигой в ящиках (6×40×15 см), заполненных почвенно-песчаной смесью. Оценку осуществляли на 25-й день после всходов при инфекционной нагрузке 0,2 г семян заразики 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 выборок семян каждой семьи  $F_3$  дифференцировали исходные устойчивые растения  $F_2$  на гомо- и гетерозиготные по локусу *Or 3*.

ДНК выделяли из этиолированных 5-дневных индивидуальных проростков цетавлоновым методом. Смеси ДНК формировали из

ДНК 10 и 21 гомозиготного растения  $F_2$  с генотипами *Or 3Or 3* и *or 3or 3* соответственно.

Для амплификации ДНК использовали праймеры, синтезированные в отделе молекулярной генетики ЮБЦ, а также прибор «Терцик» (ДНК-технология, Россия). Состав реакционной смеси: 50 мМ КСl, 20 мМ трис-НСl (рН 8,4 при 25 °С), 0,01 % Tween-20, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мкМ каждого праймера, 200 мкМ 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 с 95 °С, 30 с 55 °С, 30 с 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 (Pharmacia) и компьютерной программы «Image Master 1D Eli-

те» относительно маркера молекулярной массы — ДНК плазмиды рUC 19, рестрицированной *MspI*.

Тест на независимое наследование и анализ сцепления проводили согласно [9].

**Результаты исследований и их обсуждение.** Среди 50 растений популяции  $F_2$  выявлены: 10 гомозиготных с генотипом *Or 3Or 3*, 19 гетерозиготных с генотипом *Or 3or 3* и 21 гомозиготное с генотипом *or 3or 3*. Для поиска фрагмента амплификации, дифференцирующего ДНК родительских линий и смеси ДНК гомозиготных контрастных по устойчивости растений  $F_2$ , использовали 12 пар направленных праймеров [7]. По 11 локусам спектры амплификации всех анализируемых образцов были идентичны.

С помощью пары праймеров RTS 29(1) выявлено два полиморфных продукта амплификации. Для линии ВА 1 и для смеси ДНК гомозиготных устойчивых растений  $F_2$  характерен фрагмент амплификации 320 п.н.; у линии К 811 и у смеси ДНК гомозиготных неустойчивых растений  $F_2$  выявлен фрагмент 338 п.н. (рис. 1).

Анализ индивидуальных растений, из которых сформированы смеси ДНК, показал, что аллель 320 п.н. (характерный для устойчивой родительской линии ВА 1) выявлялся у 5 из 10 устойчивых гомозиготных растений  $F_2$ , в то время как аллель 338 п.н. (характерный для неустойчивой родительской линии К 811) выявлялся у 18 из 21 неустойчивого гомозиготного растения  $F_2$ . По локусу RTS 29(1) проанализирована вся тестируемая популяция (рис. 2), определен аллельный состав всех 50 растений  $F_2$ . В  $F_2$  21 растение представляло собой рекомбинантные формы. Тест на независимое наследование подтвердил сцепление локусов RTS 29(1) и локуса, который отвечает за устойчивость к заразихе «молдавской» расы (локус *Or 3*) ( $\chi^2 = 11,26$ ,  $P > 0,01$ ). По результатам гибридологического анализа расстояние между локусами 20 сМ ( $\chi^2 = 7,72$ ,  $P > 0,01$ ). Как показано в работе [7], сцепление локусов RTS 29(1) и *Or 5* — 25,7 сМ. Выявленное между локусами RTS 29(1) и *Or 3* сцепление позволило подтвердить гипотезу о кластерной организации генов устойчивости подсолнечника к разным расам заразихи.

Использование праймеров RTS 29(1) как одиночных не позволило получить продукты амплификации.

По локусу RTS 29(1) протестирован ряд генотипов подсолнечника — линий и гибридов селекции Селекционно-генетического института, Института масличных культур и Института растениеводства им. Юрьева (всего 40 генотипов). В 14 случаях обнаружено несоответствие между аллельным составом генотипа по локусу RTS 29(1) и его фенотипом по признаку устойчивости к заразихе. У ряда линий обнаружена гетерозиготность по данному локусу. К преимуществам выявленного маркера можно отнести его кодоминантность, что является полезным свойством маркера при использовании в селекционных программах с беккроссированием.

Современная селекция предполагает эффективное привлечение технологии MAS (marker assisted selection). Для надежного маркирования признака ДНК-маркер должен быть тесно сцеплен с локусом, определяющим проявление данного признака. В связи с этим наша дальнейшая работа направлена на использование выявленных маркеров RTS 29(1)\_320 и RTS 29(1)\_338 для поиска фрагментов ДНК, которые с большей надежностью будут дифференцировать генотипы подсолнечника, контрастные по устойчивости к «молдавской» расе заразихи.

**Выводы.** Амплификация ДНК растений, расщепляющейся по признаку устойчивости к «молдавской» расе заразихи (раса С) популяции  $F_2$  по локусу RTS 29(1), позволила выявить фрагменты RTS 29(1)\_320 и RTS 29(1)\_338. Данные маркеры дифференцируют родительские формы и пулы ДНК гомозиготных контрастных по устойчивости растений  $F_2$ . Определено сцепление локусов RTS 29(1) и *Or 3*. Протестирована маркирующая способность выявленных ампликонов на выборке генотипов подсолнечника украинской селекции.

**SUMMARY.** Bulked segregant analysis and amplification of RTS loci were used for searching of DNA-markers to *Or 3* gene that controls resistance of sunflower to broomrape. Polymorphic amplified fragments have been discovered which differentiate resistant and non-resistant parental lines and  $F_2$  plants. Linkage between codominant marker and locus *Or 3* is defined.

**РЕЗЮМЕ.** Для пошуку ДНК-маркера гена *Or 3*, який контролює стійкість соняшника до «молдавської» раси вовчка (раса С), використано аналіз сумішей ДНК, що розщеплюються (метод BSA), та ПЛР-аналіз за локусами RTS. Виявлено поліморфні фрагменти ампліфікації, що диференціюють контрастні за стійкістю батьківські форми і рослини F<sub>2</sub>. Встановлено зчеплення кодомінантного маркера та локуса *Or 3*.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Толмачев В.В. Идентификация рас заразихи и генов устойчивости подсолнечника к «молдавской» расе // Растениеводство, генетика и селекция технических культур : Сб. науч. тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. — 1991. — **144**. — С. 92—101.
2. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids. Res. — 1990. — **18**. — P. 6531—6535.
3. Michelmore R.W., Paran I., Kesseli R.V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1991. — **88**. — P. 9828—9832.
4. Borovkova I.G., Jin Y., Steffenson B.J., Kilian A., Blake T.K., Kleinhofs A. Identification and mapping of a least rust resistance gene in barley line Q21861 // Genome. — 1997. — **40**. — P. 236—241.
5. Hu X.Y., Ohm H.W., Dweikat I. Identification of RAPD markers linked to the gene PM for resistance to powdery mildew in wheat // Theor. Appl. Genet. — 1997. — **94**. — P. 832—840.
6. Lu Y.H., Melero-Vara J.M., Garcia-Tejada J.A., Blanchard P. Development of SCAR markers linked to the gene *Or5* conferring resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower // Theor. Appl. Genet. — 2000. — **100**. — P. 625—632.
7. Roeckel-Drevet P., Tourvieille D., Nicolas P. The genetics of resistance to five races of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Theor. Appl. Genet. — 1997. — **95**. — P. 584—589.
8. Панченко А.Я. Ранняя диагностика заразихоустойчивости при селекции и улучшающем семеноводстве подсолнечника // Вестн. с.-х. науки. — 1975. — № 2. — С. 107—115.
9. Тихомирова М.М. Генетический анализ. — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1990. — 280 с.

Поступила 16.03.05