

¹ Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва,

Україна, 61060, м. Харків, пр. Московський, 142, e-mail: vnpop@ukr.net

² Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва,

Україна, 62483, Харківська обл., Харківський р-н, п/в «Комуніст-1»

ДЕТЕКЦІЯ ГЕНА *Or5* СТІЙКОСТІ ДО ВОВЧКА СОНЯШНИКУ ЗА ДОПОМОГОЮ SCAR-МАРКЕРУ RTS05

В генетико-селекційних дослідженнях соняшнику широко використовуються різні типи ДНК-маркерів: RAPD, ISSR, AFLP, SSR, SNP тощо. За цими типами маркерів накопичена значна кількість інформації щодо їх мінливості, через те нині побудовано детальні генетичні карти соняшнику з розташуванням генів стійкості до фітопатогенів, морфологічних та біохімічних ознак відносно певного типу молекулярних маркерів [1–4]. Це стало можливим не тільки з розробкою методів ПЛР, але з детальним дослідженням з генетики стійкості, морфологічних та біохімічних ознак соняшнику, а також вивченню ефектів більшості генів. Тому, інформацію щодо зчеплення маркеру та гена можна використовувати у маркер-залежній селекції (marker-assisted selection, MAS), яка отримала розповсюдження в багатьох країнах світу для інтенсифікації селекційного процесу.

Локуси та гени, які контролюють стійкість соняшнику до біотичного стресу було ідентифіковано та картовано за допомогою ДНК-маркерів. Так, наприклад, для більшості генів *Or*, які контролюють стійкість до вовчка, визначено ДНК-маркери [5–7]. Ідентифіковано 5 SCAR-та 1 RAPD-локус, які зчеплені з геном *Or5*. Найменша відстань між SCAR-маркерами та геном *Or5* було визначено для RTS05 і склало 5,6 сМ. Також зчеплення з *Or5* показано для певних мікросателітних локусів. Крім того, ідентифіковано ДНК-маркери, які маркують QTL стійкості до білої гнилі, іржі та фомозу [8–10].

Метою роботи було встановлення наявності SCAR-маркера – RTS05, зчепленого з геном *Or5*, на різноманітному селекційному вихідному матеріалі соняшнику.

Матеріали і методи

До молекулярно-генетичних досліджень було залучено 37 інбредних ліній соняшнику селекції Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва, серед яких 11 ліній – стерильні аналоги, 19 – відновники фертильності пилку та 7 – мутантні лі-

нії. Також було залучено 29 зразків соняшнику, отриманих з міжвидових гібридів та сорти різного походження (Україна, Росія, Чехія, Словаччина, Угорщина, США, Канада). Всього проаналізовано 39 сортів соняшнику. Для проведення ПЛР використовували набори реагентів GenePak PCR Core виробництва фірми «Ізоген» (Росія). Кінцевий об'єм реакційної суміші склав 20 мкл та містив 20 нг загальної ДНК з додаванням по 0,2 мкМ кожного праймера. Нуклеотидна послідовність праймерів до локусу RTS05 була такою: прямий (F): tggcgcagatggacgtgtgggtg, зворотній (R): gtcgcagagagtggagagagtgt. У пробірці з реакційною сумішшю нашаровували по 20 мкл мінеральної олії. ПЛР проводили у термоциклері «Терцик» (Росія) за програмами, запропонованими авторами [6]. Продукти ампліфікації розділяли методом горизонтального електрофорезу у 2 % агарозному гелі з високою роздільною здатністю з додаванням бромистого етидію в буфері з низькою іонною силою та послідовним фотографуванням в УФ світлі за допомогою фотосистеми Nikon D50. Як маркер довжини фрагментів ДНК використовували GenePak DNA Markers 50 bp («Ізоген», Росія). Розміри продуктів ампліфікації визначали за допомогою демо-версії програми Totallab120.

Результати та обговорення

На першому етапі для тестування маркера RTS05 були залучені селекційні інбредні лінії соняшнику з робочої колекції лабораторії селекції та генетики соняшнику Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва – стерильні аналоги та відновники фертильності пилку. Ці лінії є селекційним матеріалом, які залучають для створення простих або трілінійних гібридів соняшнику. За допомогою маркеру RTS05 у інбредних ліній соняшнику, які потенційно можуть містити ген *Or5*, детектується фрагмент розміром 650 пн. Молекулярний маркер до гена *Or5* зчеплений з ним та знаходиться на відстані приблизно 5,6 сМ [6].

При аналізі відібраних з робочої колекції інбредних ліній соняшнику продукт ампліфікації розміром 650 пн. був детектований у 24 з 37 ліній. Поширення фрагменту розміром 650 пн. серед інбредних ліній соняшнику було нерівномірним. У материнських ліній амплікон розміром 650 пн. спостерігався в 9 лініях, а в двох лініях він був відсутній. Крім того у 11 з 19 батьківських ліній також було ідентифіковано цей продукт ампліфікації ДНК. Амплікон розміром 650 пн. був представлений у 4 мутантних ліній, а у 3 лініях маркер RTS05 був відсутній. Частка інбредних селекційних ліній з маркером RTS05 становила 64,9 %.

До молекулярно-генетичного аналізу нами також було залучено зразки міжвидових гібридів різного походження. Вони були створені за участю однорічних дикорослих видів соняшнику *Helianthus annuus*, *H. argophyllus* та *H. debilis*. Залучений матеріал не аналізувався на наявність генів *Or* класичними селекційними методами. Серед 29 зразків міжвидових гібридів соняшнику амплікон розміром 650 пн. детектувався тільки у 9 зразках. Селекційні номери 22/2, 24/3, 36/1, 26/1, 28/3, 30/1, 32/1, 48/2, 42/2 можна рекомендувати як джерела стійкості до вовчка в різних селекційних програмах. Частка таких зразків становила 31,0 %.

Наявність маркеру RTS05, асоційованого з геном *Or5*, вивчали також в сортах соняшнику різного походження. Так, частота маркеру в сортах України змінювалася від 0,00 до 1,00; Росії – від 0,47 до 1,00; Чехії та Словаччини – 0,68–1,00; Угорщини – 0,05–1,00; США – 0,32–0,95; Канади – 0,00–0,95. Слід відзначити, що для більшості сортів соняшнику характерним було наявність маркеру RTS05 і частота його була високою. Для 32 сортів соняшнику з 39, частота маркера RTS05 перевищувала значення 0,50. Тільки для семи сортів частота RTS05 була низькою.

Висновки

SCAR-маркер (локус RTS05) чітко ідентифікується у селекційних лініях соняшнику. Використання зразків соняшнику, що створені із залученням однорічних дикорослих видів, дозволило встановити наявність в їх генотипах продуктів ПЛР розміром 650 пн., що свідчить також про присутність гена *Or5*. В сортах соняшнику маркер зустрічається з високою частотою. Отримані результати надають можливість цілеспрямовано проводити селекцію інбредних ліній материнського або батьківського типів із наявним геном *Or5* на основі міжвидових гібридів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Jan C.-C., Vick B., Miller J., Kahler A., Burtler E. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower // *Theor. Appl. Genet.* – 1998. – 96. – P. 15–22.
2. Lai Z., Livingstone K., Zou Y., Church S., Knapp S. Identification and mapping of SNPs from ESTs in sunflower // *Theor. Appl. Genet.* – 2005. – 111. – P. 1532–1544.
3. Kusterer B., Horn R., Friedt W. Molecular mapping of the fertility restoration locus *Rf1* in sunflower and development of diagnostic markers for the restorer gene // *Euphytica.* – 2005. – 143. – P. 35–42.
4. Tang S., Yu J., Slabaugh M., Heesacker A., Cole G., Berry S., Leon A., Knapp S. Simple sequence repeat map of the sunflower genome // *Theor. Appl. Genet.* – 2002. – 105. – P. 1124–1136.
5. Imerovski I., Dimitrijevic A., Miladinovic D., Dedic B., Jovic S., Kovacevic B., Obrecht D. Identification of PCR markers linked to different *Or* genes in sunflower // *Plant Breeding.* – 2013. – 132. – P. 115–120.
6. Lu Y.H., Melero-Vara J., Garcia-Tejada J., Blanchard P. Development of SCAR markers linked to the gene *Or5* conferring resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) // *Theor. Appl. Genet.* – 2000. – 100. – P. 625–632.
7. Tang S., Heesacker A., Kishore V., Fernandez A., Sadik E. S., Cole G., Knapp S.J. Genetic mapping of the *Or5* gene for resistance to *Orobanche* race E in sunflower // *Crop Sci.* – 2003. – 43. – P. 1021–1028.
8. Bert P.-F., Jouan I., Tourvieille de Labrouhe D., Serre F., Nicolas P., Vear F. Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 1. QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Diaporthe helianthi* // *Theor. Appl. Genet.* – 2002. – 105. – P. 985–993.
9. Bert P.-F., Dechamp-Guillaume G., Serre F., Jouan I., Tourvieille de Labrouhe D., Nicolas P., Vear F. Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 3. Characterization of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldi* // *Theor. Appl. Genet.* – 2004. – 109. – P. 865–874.
10. Lawson W., Goulter K., Henry R. Marker-assisted selection for two rust resistance genes in sunflower // *Mol. Breed.* – 1998. – 4. – P. 227–234.

POPOV V.M. ¹, TERENIAK YU.M. ¹, AKININA G.E. ¹, SHARUPINA YA.YU. ¹, DOLGOVA T.A. ²,
KIRICHENKO V.V. ^{1,2}

¹ The Plant Production Institute nd. a. V.Ya. Yuriev,
Ukraine, 61060, Moskovskiy avenue, 142, e-mail: vnpop@ukr.net

² Kharkiv National Agrarian University nd. a. V.V. Dokuchaev,
Ukraine, 62483, Kharkiv reg., Kharkiv dist., p/v "Kommunist-1"

THE DETECTION GENE *OR5* OF RESISTANCE TO BROOMRAPE BY SCAR-MARKER RTS05

Aims. The SCAR-marker RTS05 are linked to *Or5*-gene mapped on 5.6 cM from it. The aim of this work was investigation of the presence of SCAR-marker RTS05 on various breeding initial material of sunflower. **Methods.** We studied the presence of RTS05 marker in 37 inbred lines, 29 interspecific hybrids-based samples and 39 varieties of sunflower that created in The Plant Production Institute nd. a. V. Ya. Yuriev. The identification of RTS05 marker we conducted by polymerase chain reaction (PCR). The amplicon of 650 bp size as a result of amplification was indicated about the presence of *Or5*-gene. In the case of absence *Or5*-gene in sunflower samples this specific amplicon was not synthesized.

Results. The amplicon of 650 bp size was identified in all type of studied sunflower breeding material. The frequency of RTS05-marker in sunflower samples was different. **Conclusions** The results of our work are suggested possibility to use sunflower samples with identified *Or5*-gene for creation initial breeding material resistant to broomrape.

Keywords: sunflower, broomrape, DNA-markers, *Or5*-gene.