

Н.Е. КОЖУХОВА<sup>1</sup>, Ю.М. СИВОЛАП<sup>1</sup>,  
Б.Ф. ВАРЕНИК<sup>2</sup>, В.М. СОКОЛОВ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Південний біотехнологічний центр у рослинництві УААН, Одеса  
E-mail: genom2005@ukr.net

<sup>2</sup> Селекційно-генетичний інститут – Національний центр  
насінництва і насіннезнавства УААН, Одеса

## МАРКУВАННЯ ЛОКУСІВ, ЩО ОБУМОВЛЮЮТЬ СТІЙКІСТЬ КУКУРУДЗИ ДО ФУЗАРІОЗНИХ ГНИЛЕЙ



Проведено генотипування популяції  $F_2$ , яку отримано від схрещування ліній кукурудзи Одеська 139 і R221, контрастних за стійкістю до фузаріозних гнилей. Виявлено кодомінантний ДНК-маркер RGA11 за локусом, що відповідає за стійкість кукурудзи до фузаріозних гнилей, на відстані 18,3 сМ.

© Н.Е. КОЖУХОВА, Ю.М. СИВОЛАП, Б.Ф. ВАРЕНИК,  
В.М. СОКОЛОВ, 2007

**Вступ.** На врожайність кукурудзи (*Zea mays* L.), важливої сільськогосподарської культури півдня України, впливають багато факторів, в тому числі рівень стійкості до захворювань. Серед них стеблова та коренева гниль, що викликається грибом *Fusarium moniliforme* Sheldon var. *lactis* (Pirota et Riboni) Bilai. Це одна з найнебезпечніших хвороб кукурудзи: поряд з великими втратами врожаю зерна негативна дія фузаріумних грибів проявляється у синтезі мікотоксинів, що є шкідливими для здоров'я людей і тварин, в раціоні яких присутня кукурудза [1, 2].

Стійкість кукурудзи до фузаріумів є мультигенною ознакою. Використання класичних методів добору за фенотипом неможливе внаслідок неперервної мінливості кількісних ознак. В останні роки широке розповсюдження для детекції локусів кількісних ознак (Quantitative Trait Loci, QTL) отримали системи молекулярних маркерів, зокрема тих, що генеруються за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Використання техніки на основі ПЛР спільно з аналізом сумішей ДНК, що розщеплюються (Bulked Segregant Analysis, BSA) [3], дає можливість ідентифікувати маркери, зчеплені з генами стійкості [4–9].

При дослідженнях геному кукурудзи продемонстрована можливість використання молекулярних маркерів для ідентифікації і картування локусів, зчеплених з генами стійкості до фузаріозних гнилей. Так, аналіз популяції контрастних за стійкістю до стеблової гнилі ліній В89 і 33-16 (Італія) з використанням 95 ПДРФ- і 10 RAPD-маркерів дозволив отримати карту зчеплення, на якій п'ять геномних регіонів пов'язані зі стійкістю до *F. graminearum* [10]. QTL, асоційовані зі стійкістю до гнилі качанів, що викликана *F. moniliforme*, ідентифіковано при генотипуванні двох популяцій високогірної кукурудзи з використанням 149 і 106 ПДРФ-маркерів відповідно [11]. Прокартовано дев'ять QTL (на хромосомах 1, 2, 3, 4, 6, 7 і 10) для популяції I і сім QTL для популяції II (на хромосомах 1, 3, 4, 5, 6 і 7) кукурудзи (Мексика), три з яких збігались для обох популяцій, пов'язаних зі стійкістю до *F. moniliforme*. ПЛР-маркери стійкості північної кукурудзи (Канада) до гнилі качанів, збудником якої є *F. graminearum*, локалізовано на хромосомах 1 (стійкість зерен) і 9 (стійкість рилець) при тестуванні рекомбінантної інбредної по-

пуляції, створеної схрещуванням ліній СО387 і СG62, що контрастні за стійкістю рилець і зерен до качанової гнилі [12].

Слід зазначити, що генетична детермінація стійкості до фузаріозу має істотні сортові різниці. Ознака стійкості може бути значно модифікована як взаємодією генів, так і факторами навколишнього середовища. У зв'язку з цим вихідний матеріал треба аналізувати та маркувати на стійкість до фузаріозу в кожному конкретному випадку.

Більшість генотипів кукурудзи вітчизняної та закордонної селекції, що культивуються в Україні, відносно їх стійкості до ураження грибами роду *Fusarium* вивчено недостатньо. Ідентифікація QTL стійкості значно підвищить ефективність селекційних робіт по створенню ліній та гібридів кукурудзи, стійких до збудників фузаріозних гнилей, найбільш розповсюджених патогенів кукурудзи в умовах півдня України, а також продемонструє можливість використання цих QTL у програмах, пов'язаних з добором за маркерами (Marker-assisted selection, MAS).

Мета нашої роботи полягала у ідентифікації локусів геному кукурудзи, що відповідають за стійкість до фузаріозних гнилей.

**Матеріали і методи.** Дві інбредні лінії Одеська 139 і R221 були відібрані як контрастні за стійкістю до фузаріозної коренево-стеблевої гнилі (стійка і сприйнятлива, відповідно) за даними польових оцінок і схрещені для отримання поколінь  $F_1$  і  $F_2$ . Для отримання родин  $F_3$  було самозапилено 218 рослин  $F_2$ . З кожної рослини зібрано фрагмент листя. За об'єктивними причинами тільки 180 родин  $F_3$  використовували для тестування стійкості.

Зараження рослин кукурудзи фузаріозною коренево-стеблевою гниллю у польових умовах провокаційного фону проведено наступним чином: інокулюм чистої культури *F. oxysporum* var. *orthoceras*, *F. moniliforme* var. *lactis*, *F. graminearum* вносили в ґрунт разом з насінням (на 1 кг насіння 20 г інокулюму). Облік ураженості рослин проводили в фазу фізіологічної стиглості зерна і при перестой на 10–20-й і 30-й день після повної зрілості зерна. Використовували наступну шкалу: до 5 % уражених рослин — високостійкі, до 10 % — середньостійкі, 26–50 % — середньосприйнятливі, вище 50 % — сприйнятливі. За результатами тестування

рослин кожної родини  $F_3$  диференційовано рослини популяції  $F_2$  на гомозиготні (рецесивні та домінантні) і гетерозиготні генотипи з урахуванням крайніх значень шкали.

ДНК виділяли з 7-добових етіологованих паростків батьківських форм і з фрагментів листя кожної з 180 рослин  $F_2$  за методикою [13]. Суміші ДНК формували з ДНК 10 гомозиготних («стійких» і «сприйнятливих») рослин  $F_2$  у двох повтореннях.

ПЛР-ампліфікацію проводили у 0,5 мкл епендорфах в ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-технологія», Росія). Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила буфер (0,05 М КСl; 0,02 М Трис-НСl рН 8,4; 0,002 М MgCl<sub>2</sub>; 0,01 % Твін-20); по 0,2 мМ кожного dATP, dCTP, dTTP, dGTP; 0,25 мкМ праймеру; 20 нг ДНК; 2 од. ДНК-полімерази Taq. Поверх реакційного розчину нашаровували 20 мкл мінеральної олії.

Температурний режим ампліфікації: перша денатурація 94 °С 2 хв; заключна елонгація 72 °С 3 хв; 30 основних циклів: денатурація 94 °С 1 хв; відпалювання праймерів 52 °С 1 хв; елонгація 72 °С 2 хв.

Використано 38 пар SSR-, п'ять пар STS-, 24 ISSR- та 23 довільних праймерів, дизайн яких обрано з бази даних по генетиці і геноміці кукурудзи ([www.maizegdb.org](http://www.maizegdb.org)).

Продукти ПЛР з парами праймерів (5 мкл аліквоту ПЛР-суміші) фракціонували в 10%-ному поліакриламідному гелі в ТВЕ-буфері (0,089 М Трис-НСl рН 8,0; 0,089 М борна кислота; 0,002 М Na<sub>3</sub> ЕДТА) за постійної напруги 500 В та температури 60 °С 2–3 год залежно від довжини фрагментів ампліфікації у апараті для вертикального гель-електрофорезу «Hoefer Scientific Instruments» (США). Перед нанесенням продуктів ампліфікації у гель проводили префорез протягом 30 хв за постійної напруги 300 В і температури 60 °С.

Продукти ПЛР з довільними та ISSR-праймерами (10 мкл реакційної суміші) розподіляли у 2%-ному «підводному» агарозному гелі в ТВЕ-буфері за постійної напруги 100 В та кімнатної температури 2–3 год залежно від довжини фрагментів ампліфікації у апараті для горизонтального гель-електрофорезу «Hoefer Scientific Instruments» (США).

Для фарбування продуктів ампліфікації, що розподіляли у агарозних гелях, гель поміщали

у TBE-буфер з 5 мкг/мл бромістого етидію на 15 хв і фотографували з використанням світлофільтру ОС-12 в ультрафіолетовому світлі (300 нм) на плівку «Мікрат-300». Поліакриламідний гель фарбували з використанням нітрату срібла. Гелі зберігали між двома листами прозорої поліетиленової плівки.

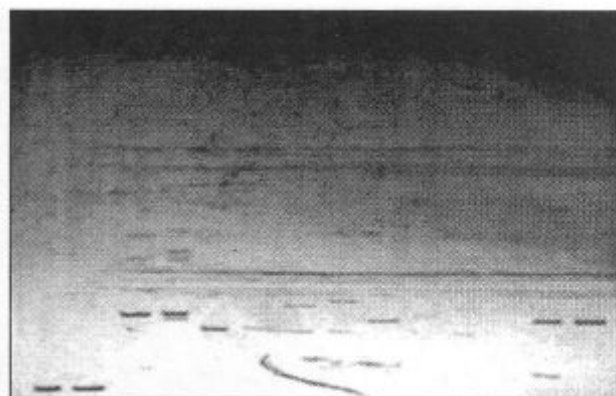
Відеозображення електрофоретичних профілів ампліфікованої ДНК та оцінки довжини продуктів ампліфікації одержували за допомогою системи документації і аналізу гелів «Image Master VDS» («Amersham Pharmacia Biotech», ОКВ) згідно з керівництвом користувача обладнання.

Гібридологічний аналіз популяцій F<sub>2</sub> і F<sub>3</sub> проводили за ознакою стійкості до фузаріозної коренево-стеблевої гнилі, аналіз розщеплення — шляхом розрахунку стійких і сприйнятливих генотипів. Практично отримане і теоретично очікуване розщеплення використовували для аналізу відповідності фактичних даних за критерієм  $\chi^2$  [14].

Для обробки результатів аналізів використовували комп'ютерну програму «JOINMAP ver. 2,0». Для встановлення зчеплення ДНК-маркера з генетичним локусом використовували двоточковий аналіз. Локус вважали зчепленим з геном, якщо значення LOD (Logarithm of Odds Ratio) складало 3,0 та більше. Частоту рекомбінації оцінювали за принципом максимальної правдоподібності. Для перерахування значення частоти рекомбінації у сантиморгани (сМ, відстань на генетичній карті) використовували картувальну функцію Козамбі.

**Результати досліджень та їх обговорення.** За результатами фітопатологічного польового тестування ураженості рослин родин F<sub>3</sub> фузаріозною гниллю 37 рослин F<sub>2</sub> оцінили як гомозиготні стійкі генотипи, 47 — гомозиготні сприйнятливі генотипи, 84 — гетерозиготні генотипи. Створили дві суміші ДНК рослин доміантних та рецесивних гомозиготних генотипів для ПЛР-аналізу за BSA-методом.

Проведено пошук серед 38 пар SSR-, п'яти STS-, 24 ISSR- та 23 довільних праймерів тих, що детектують поліморфізм між батьківськими лініями та контрастними пулами. На рис. 1 наведено електрофореграму продуктів ампліфікації локусів при пошуку поліморфних між батьківськими формами.



1A 1B 2A 2B 3A 3B 4A 4B 5A 5B 6A 6B

Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації локусів: 1 — umc1726; 2 — umc1203; 3 — umc1172; 4 — umc1546; 5 — umc1545; 6 — umc1545 ДНК батьківських ліній R221 (А) і Одеська 139 (Б)

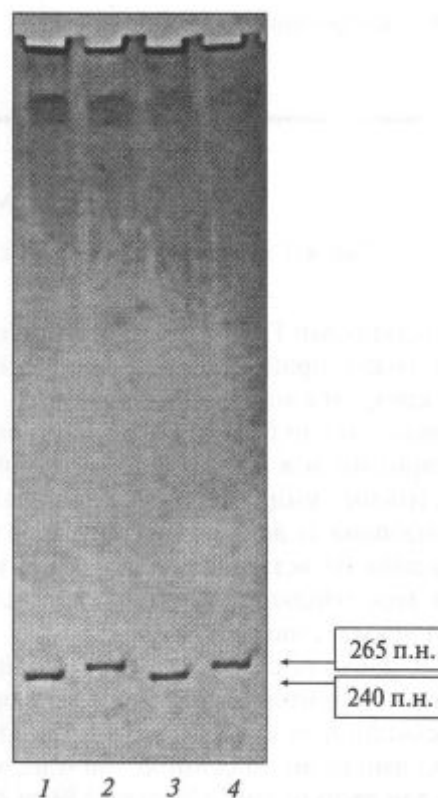


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації локусу RGA11 ДНК батьківських форм: 1 — Одеська 139 (стійка); 2 — R221 (сприйнятлива); 3 — суміші ДНК «стійких» генотипів; 4 — «сприйнятливих» генотипів



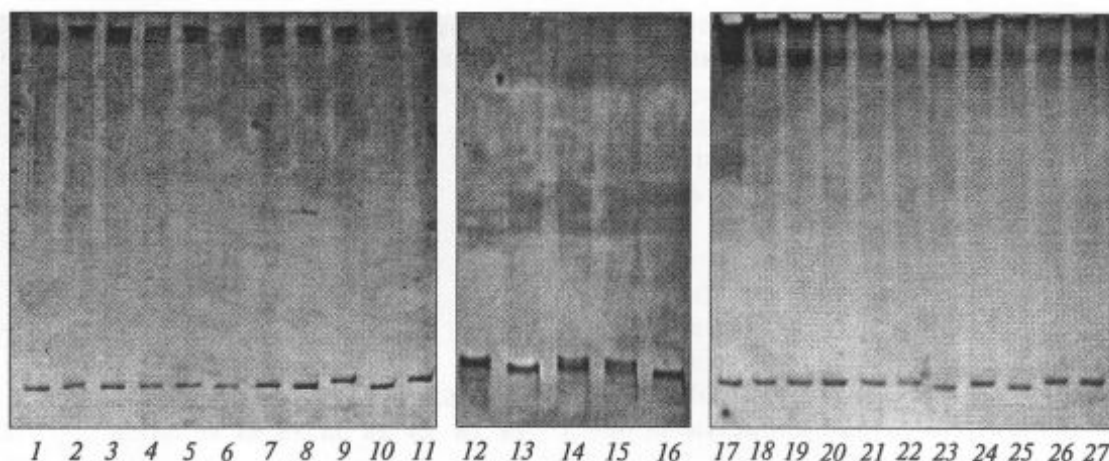


Рис. 3. Электрофореграма продуктів ампліфікації локусу RGA11 ДНК генотипів популяції F<sub>2</sub>: 1–27 – ДНК індивідуальних рослин популяції, що тестували

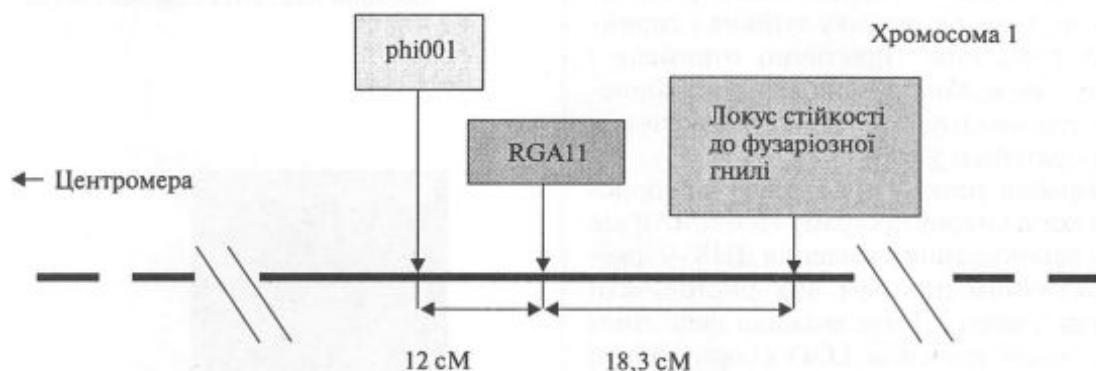


Рис. 4. Схема розташування потенційного маркера стійкості до фузаріозних гнилей

За результатами ПЛР-аналізу з використанням 83 (пар) праймерів отримано неполіморфні спектри ампліфікації зразків.

Добрано сім пар праймерів до локусів, що є поліморфними між батьківськими лініями та контрастними сумішами ДНК. Популяція F<sub>2</sub> проаналізована за даними локусами. За п'ятьма локусами не встановлено достовірних кореляцій між ознакою стійкості та аallelним складом локусів, що тестували.

За SSR-локусом phi001 знайдено поліморфні фрагменти ампліфікації, що розрізняють батьківські лінії та контрастні за стійкістю пули ДНК: амплікон довжиною 180 п.н., характерний для стійкої лінії Одеська 139 та суміші ДНК стійких F<sub>2</sub>-зразків, та амплікон довжиною 195 п.н., характерний для нестійкої лінії R221 та суміші ДНК нестійких F<sub>2</sub>-зразків. Аналогічні результати отримано при використанні

пари STS-праймерів RGA11, дизайн яких розроблено на основі амінокислотної послідовності лейцин-збагачених регіонів аналогів генів стійкості: амплікони довжиною 240 та 265 п.н. відповідно характерні для «стійких» та «сприйнятливих» генотипів (рис. 2). За даними локусами проаналізовано досліджувану популяцію F<sub>2</sub> (180 зразків) (рис. 3).

Тест на незалежне успадкування підтвердив, що мікросателітний локус phi001 зчеплений з локусом RGA11 та з локусом, що відповідає за стійкість до фузаріозної гнилі. Відома хромосомна локалізація мікросателітного локусу phi001 дозволяє локалізувати локус RGA11: він знаходиться на короткому плечі хромосоми 1. Згідно з результатами гібридологічного аналізу встановлено, що локус RGA11 зчеплено з локусом, що відповідає за стійкість до фузаріозної гнилі, на відстані 18,3 сМ (рис. 4).

Розробка сучасних біотехнологій та їх впровадження в селекційний процес у вигляді технологій MAS забезпечить науково-технічний прогрес у створенні стійких до збудників хвороб сортів і гібридів. Важливою перевагою MAS для впровадження генів стійкості є можливість для селекціонера здійснити різні добори на протязі одного року без «вимушеної» залежності від природної наявності патогена і навіть без його присутності. Ідентифікація маркерів дає можливість здійснити в подальшому ефективний перенос генів, що контролюють стійкість до фузаріозних гнилей, у сприйнятливі генотипи кукурудзи для створення стійких генотипів та запобігання втра-там стійкості.

**Висновки.** Проведено генотипування популяції  $F_2$ , яку отримано від схрещування ліній кукурудзи Одеська 139 і R221, контрастних за стійкістю до фузаріозних гнилей. За допомогою різних технік ПЛР з використанням 90 (пар) праймерів проскриновано ДНК ліній Одеська 139 і R221 та сумішей доміантних і рецесивних гомозиготних зразків  $F_2$  на наявність поліморфізму. Виявлено кодомінантний ДНК-маркер RGA11 до локусу, що відповідає за стійкість кукурудзи до фузаріозної гнилі, на відстані 18,3 сМ.

**SUMMARY.** Genotyping of  $F_2$ -population from crossing of maize lines Odesskaya 139 and R221 contrasting on Fusarium rot resistance has been carried out. Codominant DNA-marker RGA11 to the locus determining Fusarium resistance was found out at the distance of 18,3 cM.

**РЕЗЮМЕ.** Проведено генотипування популяції  $F_2$ , которая получена от скрещивания линий кукурузы Одесская 139 и R221, контрастных по устойчивости к фузариозным гнилям. Вывявлен кодоминантный ДНК-маркер RGA11 локуса, детерминирующего устойчивость кукурузы к фузариозным гнилям, на расстоянии 18,3 сМ.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Miller J., Savard M., Schaafsma A., Seifert K., Reid M. Mycotoxin production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from Ontario and occurrence of fumonisin in the 1993 corn crop // Can. J. Plant Pathol. — 1995. — 17. — P. 233—239.
2. Лісовий М.П. Историчні етапи розвитку досліджень генетики стійкості рослин щодо збудників хвороб//Захист і карантин рослин. — 2001. — Вип. 47. — С. 3—31.
3. Michelmore R., Paran I., Kesseli R. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1991. — 88. — P. 9828—9832.
4. Haley S., Miklas P., Stavely J., Byrum J., Kelly J. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean // Theor. Appl. Genet. — 1993. — 86. — P. 505—512.
5. Poulsen D., Henry R., Johnston R., Irwin J., Rees R. The use of bulk segregant analysis to identify a RAPD marker linked to leaf rust resistance in barley // Theor. Appl. Genet. — 1995. — 91. — P. 270—273.
6. Mouzeyar S., Roedel-Drevet P., Gentzbittel L., Philippon J., Tourvieille De Labrouhe D., Vear F., Nicolas P. RFLP and RAPD mapping of the sunflower P11 locus for resistance to *Plasmopara halstedii* race 1 // Theor. Appl. Genet. — 1995. — 91. — P. 733—737.
7. Borovkova I., Jin Y., Steffenson B., Kilian A., Blake T., Kleinhofs A. Identification and mapping of a least rust resistance gene in barley line Q21861 // Genome. — 1997. — 40. — P. 236—241.
8. Hu X., Ohm H., 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.
9. Солоденко А.Е., Саналатий А.В., Толмачев В.В., Ведмедева К.В., Сиволап Ю.М. Маркирование гена устойчивости к заразихе Or3 у подсолнечника // Цитология и генетика. — 2005. — 39, № 5. — С. 9—12.
10. Pe M., Gianfranceschi L., Taramino G., Tarchini R., Ahgelini P., Dani M., Binelli D. Mapping quantitative trait loci (QTLs) for resistance to *Gibberella zeae* infection in maize // Mol. Gen. Genet. — 1994. — 241. — P. 11—16.
11. Perez-Brito D., Jeffers D., Gonzalez-de-Leon D., Khairallah M., Cortes-Cruz M. QTL mapping of Fusarium moniliforme ear-rot resistance in highland maize, Mexico // Agrocienca. — 2001. — 35, № 2. — P. 181—196.
12. Pauls P., Taylor J., Sun G., William M., Liu J., Kasha K., Reid L. Identification of molecular markers for resistance to *Fusarium graminearum* in maize // Canadian Workshop on Fusarium Head Blight. — Ottawa, 2001. — P. 4—6.
13. Сиволап Ю.М., Календарь Р.Н. Генетический полиморфизм ячменя, детектируемый ПЦР с произвольными праймерами // Генетика. — 1995. — 31, № 10. — С. 1358—1364.
14. Тихомирова М.М. Генетический анализ. — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1990. — 280 с.

Надійшла 10.04.06