

ДНК-МАРКЕРЫ УСТОЙЧИВОСТИ К ЛОЖНОЙ МУЧНИСТОЙ РОСЕ (*PLASMOPARA HALSTEDII*) У ДИКОРАСТУЩИХ ФОРМ ПОДСОЛНЕЧНИКА

Усатов А.В.¹, Азарин К.В.¹, Тихобаева В.Е.¹, Воличенко М.И.¹, Гаврилова В.А.², Маркин Н.В.¹

¹Южный федеральный университет, Россия, 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, e-mail: azkir@rambler.ru

²Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова, Россия, 190000, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42

Проведен поиск новых доноров генов устойчивости к ложной мучнистой росе (*Plasmopara halstedii*) среди однолетних и многолетних видов рода *Helianthus L.* Показано, что при идентификации локуса устойчивости *Pl6* у однолетних видов информативным является маркер HaP2 (фрагмент 1200 п.н.), в то время как у многолетних видов – HaP3 (фрагмент 1800 п.н.). В то же время необходимо отметить, что в большинстве случаев у многолетних видов результаты амплификации ДНК с праймером HaP2 совпадают с результатами ПЦР-анализа с праймером HaP3. Выделенные по результатам молекулярно-генетического анализа образцы дикорастущего подсолнечника, несущие locus *Pl6*, представляют непосредственный интерес для селекции этой с/х культуры.

Ключевые слова: ДНК-маркеры, селекция, ложная мучнистая роса, подсолнечник (*Helianthus*).

DNA MARKERS FOR RESISTANCE TO DOWNY MILDEW (*PLASMOPARA HALSTEDII*) IN WILD SUNFLOWER

Usatov A.V.¹, Azarin K.V.¹, Tikhobaeva V.E.¹, Volichenko M.I.¹, Gavrilova V.A.², Markin N.V.¹

¹Southern Federal University, Russia, Rostov-on-Don, 344090, av. Stachki 194/1, e-mail: azkir@rambler.ru

²N. I. Vavilov Research Institute of Plant Industry, Russia, St. Petersburg, 190000, B. Morskaya Street, 42

A search for new donor genes for resistance Downy mildew (*Plasmopara halstedii*) among annual and perennial wild species of *Helianthus L.* was conducted. It is shown that the identification of the resistance locus *Pl 6* in annual species is informative marker Ha P2 (1200 bp), while in perennial species – Ha P3 (1800 bp). At the same time it should be noted that for perennial species in most cases amplification of DNA with a primer Ha P2 coincide with the results of PCR analysis with primer Ha P2. Discovered on the results of molecular genetic analysis a wild forms, containing the locus *Pl 6*, are of direct interest for the breeding of cultivated sunflower.

Keywords: DNA markers, breeding, Downy mildew, sunflower (*Helianthus*).

Введение

Наиболее рентабельным и экологически безопасным методом борьбы с болезнями сельскохозяйственных культур является создание устойчивого исходного материала. Такой селекционный материал с высокой продуктивностью и комплексной устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам среды целесообразно получать с привлечением генетического потенциала дикорастущих форм [1; 2]. Эффективному поиску генов устойчивости в настоящее время способствует применение современных технологий молекулярных ДНК-маркеров. В частности, как показано нами ранее на культурном подсолнечнике, они могут успешно использоваться в селекции линий резистентных к ложной мучнистой росе (ЛМР) *Plasmopara halstedii* [3]. Показавшие высокую информативность в данном случае STS-маркеры – HaP2 и HaP3 идентифицируют locus *Pl6*, который включает по меньшей мере 11 тесно сцепленных генов, каждый из которых

контролирует устойчивость к одной из рас ЛМР [4; 5]. В связи с этим с помощью маркеров HaP2 и HaP3, идентифицирующих линии культурного подсолнечника, резистентные к ложной мучнистой росе, в данной работе был проведен поиск новых доноров генов устойчивости среди образцов однолетних и многолетних видов рода *Helianthus L.*

Материал и методы

В работе исследовали 22 образца 5-ти однолетних видов (табл. 1) и 91 образец 33-х многолетних видов (табл. 2) подсолнечника из Мировой коллекции ВИР. В анализе использовали праймеры HaP2 и HaP3 [4]. Полимеразную цепную реакцию проводили в стандартной реакционной смеси в термоциклере PalmCycler Corbett Research (Австралия). Для проведенных реакций оптимальным оказался терморегим с начальной денатурацией при 95 °С в течение 3 мин., затем 35 циклов при соблюдении температурно-временного режима: отжиг при 60 °С в течение 30 сек., элонгация – 2 мин. при 72 °С, денатурация при 95 °С – 30 сек., финальная элонгация – 1 мин. Продукты реакции амплификации разделяли электрофоретически в 1%-ном агарозном геле с бромистым этидием (1мкг/мл), используя трис-боратный буфер. После электрофореза гели переносили на трансиллюминатор и фотодокументировали с помощью видеосистемы (GelDoc 2000, BioRad, США). В качестве маркеров массы амплифицированных фрагментов использовали набор GeneRuler 1 Kb DNALadder (Fermentas).

Результаты и их обсуждение

В таблице 1 суммированы результаты анализа наличие/отсутствие маркеров локуса *Pl6* в генотипе исследованных образцов однолетних видов подсолнечника.

Таблица 1

Образцы однолетних видов подсолнечника из Мировой коллекции ВИР

№, п/п	Вид	№ интродукции образца	Наличие гена <i>Pl6</i> (HaP2/HaP3)
1	<i>Helianthus annuus</i>	441183	-/-
2	<i>Helianthus annuus</i>	441236	-/-
3	<i>Helianthus annuus</i>	441245	-/-
4	<i>Helianthus annuus</i>	545520	-/-
5	<i>Helianthus annuus</i>	441169	-/-
6	<i>Helianthus annuus</i>	545497	-/-
7	<i>Helianthus annuus</i>	504835	+/-
8	<i>Helianthus annuus</i>	436863	-/-
9	<i>Helianthus annuus</i>	440545	-/-
10	<i>Helianthus annuus</i>	545573	-/-
11	<i>Helianthus annuus</i>	545577	-/-
12	<i>Helianthus annuus</i>	545534	-/-

13	<i>Helianthus agrophyllus</i>	Без №*(4)	+/-
14	<i>Helianthus agrophyllus</i>	ARG-Mosambic	+/-
15	<i>Helianthus agrophyllus</i>	1000	-/-
16	<i>Helianthus agrophyllus</i>	Мозамбик 1000	-/-
17	<i>Helianthus debilis</i>	560388	-/-
18	<i>Helianthus debilis</i>	560395	-/-
19	<i>Helianthus debilis</i>	545666	-/-
20	<i>Helianthus petiolaris</i>	503232	-/-
21	<i>Helianthus petiolaris</i>	440660	-/-
22	<i>Helianthus praecox</i>	560400	-/-

Примечание: * – номер деланки

По результатам молекулярно-генетического анализа маркер HaP2, ассоциированный с признаком устойчивости к ЛМР, идентифицирован у образцов *Helianthus annuus* с номером интродукции 504835 и *Helianthus argophyllus* (Б/№ и ARG-Mosambic) (табл. 1). Данные образцы характеризуются наличием на электрофореграмме ампликона 1200 п.н., специфичного локусу *Pl6*. С другой стороны, результаты амплификации маркера HaP3 не выявили локусов резистентности в генотипе исследованных однолетних видов. Следовательно, можно заключить, что праймер HaP3 оказался в данном случае не информативным для определения генов устойчивости в представленных генотипах однолетних дикорастущих форм.

В таблице 2 приведены данные ДНК-анализа многолетних видов подсолнечника. Результаты амплификации с праймером HaP2 показали, что маркер локуса устойчивости *Pl6* присутствует у 14 из 91 исследованного образца. При этом популяции одного и того же вида с различными номерами интродукции демонстрируют полиморфизм по наличию/отсутствию искомого маркерного фрагмента (табл. 2).

Таблица 2

Образцы многолетних дикорастущих видов подсолнечника из Мировой коллекции ВИР

№, п/п	Вид	№ интродукции образца	Наличие локуса <i>Pl6</i> (HaP2/HaP3)
1	<i>Helianthus angustifolius</i>	1889	+/+
2	<i>Helianthus angustifolius</i>	Б/№*(5)	-/-
3	<i>Helianthus angustifolius</i>	Б/№*(3)	-/-
4	<i>Helianthus californicus</i>	530447	-/-
5	<i>Helianthus californicus</i>	441063	-/+
6	<i>Helianthus californicus</i>	Без №*(52)	-/-
7	<i>Helianthus ciliaris</i>	Без №*(51)	-/-
8	<i>Helianthus decapetalus</i>	440449	-/-

9	<i>Helianthus decapetalus</i>	545682	-/-
10	<i>Helianthus decapetalus</i>	Без № *(10)	-/-
11	<i>Helianthus decapetalus</i>	Б/№ *(11)	-/-
12	<i>Helianthus decapetalus</i>	Б/№ *(13)	-/-
13	<i>Helianthus decapetalus</i>	Б/№ *(14)	-/-
14	<i>Helianthus decapetalus parviflorus</i>	Б/№ *(15)	-/-
15	<i>Helianthus divaricatus</i>	2099	-/+
16	<i>Helianthus divaricatus</i>	545674	+/+
17	<i>Helianthus divaricatus</i>	Б/№ *(17)	-/-
18	<i>Helianthus eggertii</i>	Б/№ *(18)	+/-
19	<i>Helianthus eggertii</i>	Б/№ *(19)	-/-
20	<i>Helianthus floridanus</i>	94	-/-
21	<i>Helianthus floridanus</i>	Б/№ *(21)	-/-
22	<i>Helianthus floridanus</i>	Б/№ *(6)	-/-
23	<i>Helianthus giganteus</i>	441029	-/-
24	<i>Helianthus giganteus</i>	2100	+/+
25	<i>Helianthus giganteus</i>	Б/№ *(55)	-/-
26	<i>Helianthus giganteus</i>	Б/№ *(56)	-/-
27	<i>Helianthus giganteus</i>	489253 *(53)	-/+
28	<i>Helianthus giganteus</i>	489253 *(54)	-/-
29	<i>Helianthus glaucophyllus</i>	Б/№ *(95)	-/-
29	<i>Helianthus grosseserratus</i>	Б/№ *(64)	-/-
30	<i>Helianthus grosseserratus</i>	545698	-/-
31	<i>Helianthus grosseserratus</i>	Б/№ *(62)	+/+
32	<i>Helianthus grosseserratus</i>	Б/№ *(61)	-/-
33	<i>Helianthus grosseserratus</i>	545711	-/-
34	<i>Helianthus hirsutus</i>	560389	-/-
35	<i>Helianthus hirsutus</i>	441331	+/+
36	<i>Helianthus hirsutus</i>	Б/№ (20)	-/-
37	<i>Helianthus kellemanii</i>	Б/№ *(93)	-/-
38	<i>Helianthus laetiflorus</i>	1886	-/-
39	<i>Helianthus laetiflorus</i>	Б/№ *(41)	+/+
40	<i>Helianthus laetiflorus</i>	Б/№ *(39)	-/-
41	<i>Helianthus laevigatus</i>	Б/№	-/-
42	<i>Helianthus macrophyllus</i> (болгарский)	Б/№ *(91)	-/-
43	<i>Helianthus macrophyllus</i> (российский)	Б/№ *(92)	-/-

44	<i>Helianthus smaximiliani</i>	2099	-/-
45	<i>Helianthus maximiliani</i>	440553	+/+
46	<i>Helianthus maximiliani</i>	Б/№ *(67)	-/-
47	<i>Helianthus maximiliani</i> (настоящий)	Б/№ *(65)	-/-
48	<i>Helianthus maximiliani</i> (поздний)	96А	-/-
49	<i>Helianthus microcephalus</i>	Б/№ *(68)	-/-
50	<i>Helianthus mollis</i>	50/88	-/-
51	<i>Helianthus mollis</i>	2102	-/-
52	<i>Helianthus mollis</i> (фертильный)	530453	-/-
53	<i>Helianthus mollis</i> (стерильный)	Б/№ *(69)	-/-
54	<i>Helianthus nuttallii</i>	442735	-/-
55	<i>Helianthus nuttallii</i>	Б/№ *(70)	-/-
56	<i>Helianthus nuttallii</i>	Б/№ *(71)	-/-
57	<i>Helianthus nuttallii</i>	Б/№ *(72)	-/-
58	<i>Helianthus occidentalis</i>	441062	+/+
59	<i>Helianthus occidentalis</i>	Б/№ *(1)	-/-
60	<i>Helianthus occidentalis</i>	Б/№ *(2)	-/-
61	<i>Helianthus occidentalis</i> ssp. <i>occidentalis</i>	Б/№ *(7)	-/-
62	<i>Helianthus occidentalis</i>	611801	+/-
63	<i>Helianthus orgyalis</i>	Б/№ *(86)	-/-
64	<i>Helianthus parichi</i>	Б/№ *(82)	-/-
65	<i>Helianthus parichi</i>	Б/№ *(83)	-/-
66	<i>Helianthus rigidus</i>	545660	+/+
67	<i>Helianthus rigidus</i>	545681	-/-
68	<i>Helianthus rigidus</i>	545646	-/+
69	<i>Helianthus rigidus</i>	1886	-/+
70	<i>Helianthus rigidus</i>	2106	-/+
71	<i>Helianthus rigidus</i>	545658	-/-
72	<i>Helianthus rigidus</i>	Б/№ *(37)	-/-
73	<i>Helianthus rigidus</i>	Б/№ *(38)	-/-
74	<i>Helianthus salicifolius</i> (болгарский)	Б/№ *(36)	-/-
75	<i>Helianthus salicifolius</i>	440074	-/+
76	<i>Helianthus scaberimus</i>	Б/№ *(88)	-/-
77	<i>Helianthus simulans</i>	545659	+/+
78	<i>Helianthus simulans</i>	Б/№ *(8)	-/-
79	<i>Helianthus smithii</i>	Б/№ *(9)	-/+

80	<i>Helianthus strumosus</i>	440679	+/+
81	<i>Helianthus strumosus</i>	440683	+/+
82	<i>Helianthus sub canescens</i> (болгарский)	Б/№ *(90)	-/-
83	<i>Helianthus sub connencens</i>	Б/№ *(89)	-/-
84	<i>Helianthus tomentosus</i>	2107	-/-
85	<i>Helianthus trachelifolius</i>	Б/№ *(81)	-/-
86	<i>Helianthus tuberosus</i>	441026	-/-
87	<i>Helianthus tuberosus</i>	Б/№ *(48)	-/-
88	<i>Helianthus tuberosus</i>	2111	-/-
89	<i>Helianthus tuberosus vilmorin</i>	Б/№ *(47)	-/-
90	<i>Helianthus tuberosus subcon</i>	Б/№ *(46)	-/-
91	<i>Helianthus umbaburensis</i>	Б/№ *(84)	+/+

Примечание: * – номер деланки

Результаты амплификации маркера НаРЗ подтвердили наличие локусов резистентности к ЛМР у образцов *H. angustifolius* (1889), *H. divaricatus* (545674), *H. giganteus* (2100), *H. grosseserratus* (Б/№ *(62)), *H. hirsutus* (441331), *H. laetiflorus* (Б/№ *(41)), *H. maximiliani* (440553), *H. occidentalis* (441062), *H. rigidus* (545660), *H. simulans* (545659), *H. strumosus* (440679), *H. strumosus* (440683) и *H. umbaburensis* (Б/№ *(84)). В данном случае НаРЗ инициировал синтез фрагмента размером около 1800 п.н., характерного для устойчивых линий. Также было показано наличие маркера НаРЗ в продуктах амплификации растений *H. californicus* (№ 441063), *H. divaricatus* (№ 2099), *H. giganteus* (№ 489253), *H. rigidus* (№ 545646, 1886, 2106), *H. salicifolius* (№ 440074), *Helianthus smithii* (Б/№ *(9)) в то время как маркер НаР2 показал отсутствие локусов резистентности к ЛМР у данных форм. У образцов видов *H. ciliaris*, *H. decapetalus*, *H. floridanus*, *H. glaucophyllus*, *H. kellemanii*, *H. laevigatus*, *H. macrophyllus*, *H. smaximiliani*, *H. mollis*, *H. microcephalus*, *H. nuttallii*, *H. orgyalis*, *H. parichi*, *H. scaberimus*, *H. sub connencens*, *H. tomentosus*, *H. trachelifolius*, *H. tuberosus* маркерные фрагменты НаР2/НаРЗ локуса *Pl6* не обнаружены.

Таким образом можно заключить, что для идентификации локуса устойчивости *Pl6* у однолетних видов подсолнечника наиболее информативным является маркер НаР2, а у многолетних видов – НаРЗ. В то же время необходимо отметить, что в большинстве случаев у многолетних видов результаты амплификации ДНК с праймером НаР2 совпадают с результатами ПЦР-анализа с праймером НаРЗ. По результатам молекулярно-генетического анализа с данными праймерами были выделены новые доноры генов устойчивости среди однолетних и многолетних видов рода *Helianthus L.* Выделенные образцы из коллекции ВИР представляют непосредственный интерес для селекции культурного подсолнечника.

Исследование выполнено в рамках темы Министерства образования и науки РФ (№ 4.5642.2011) и при финансовой поддержке ФЦП Министерства образования и науки РФ (госконтракт № 16.740.11.0485).

Список литературы

1. Гаврилова В.А., Анисимова И.Н. Генетика культурных растений. Подсолнечник // СПб. : Изд-во ВИР, 2003. – 209 с.
2. Маркин Н.В. [и др.] Анализ полиморфизма хлоропластной ДНК культурного и дикорастущего подсолнечника *Helianthus petiolaris* // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИМК. – 2011. – Вып. 2 (148-149). – С. 105-108.
3. Маркин Н.В. [и др.]. Генотипирование линий подсолнечника с различной устойчивостью к ложной мучнистой росе с помощью STS-маркеров // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИМК. – 2012. – Вып. 2 (152-153). – С. 35-39.
4. Bouzidi M.F., Badaoui S., Cambon F., Vear F., Tourvieille de Labrouhe D., Nicolas Mouzeyar S. Molecular analysis of a major locus for resistance to downy mildew in sunflower with specific PCR-based markers // Theor Appl Genet. – 2002. – № 104. – P. 592–600.
5. Vear F., Gentzbittel L., Philippon J., Mouzeyar S., Mestries E., Roeckel-Drevet P., Tourvieille De Labrouhe D., Nicolas P. The genetics of resistance to five races of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus*) // Theor Appl Genet. – 1997. – № 95. – P. 584–589.

Рецензенты:

Чистяков В.А., д.б.н., заведующий лабораторией экспериментального мутагенеза НИИ биологии ЮФУ, г. Ростов-на-Дону.

Костылев П.И., д.с.-х.н., профессор, заведующий лабораторией риса ГНУ «ВНИИЗК им. И.Г. Калининко» РАСХН, г. Зерноград.