

УДК 631.524.86:582.952.6:633.854.78

## ИССЛЕДОВАНИЕ ДНК-МАРКЕРОВ УСТОЙЧИВОСТИ ПОДСОЛНЕЧНИКА К ЗАРАЗИХЕ (*OROBANCHE CUMANA WALLR.*)

Маркин Н.В.<sup>1</sup>, Усатов А.В.<sup>1</sup>, Макаренко М.С.<sup>1</sup>, Усатенко Т.В.<sup>2</sup>, Горбаченко О.Ф.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, e-mail: nmarkin@mail.ru;

<sup>2</sup>Донская опытная станция им. Л.А. Жданова Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур, Ростовская обл.

С помощью молекулярно-генетического анализа образцов подсолнечника Донской опытной станции им. Л.А. Жданова ВНИИМК, с контрастной устойчивостью/чувствительностью к заразихе, был проведен поиск информативных RAPD-, SSR- и SCAR-маркеров. Среди исследованных 18 RAPD-маркеров специфичных для устойчивых образцов не обнаружено, однако два маркера - OPA17\_1800 и UBC685\_1500 были амплифицированы у 81% чувствительных образцов. 11 SSR-маркеров, взятые в анализ, также не позволили идентифицировать устойчивые генотипы. Среди изученных 9 SCAR-маркеров отсутствие амплификации двух - RTS 40 и RTS 40\_1, позволили выделить группу неустойчивых образцов. Прямое секвенирование этих двух ампликонов - RTS 40 и RTS 40\_1, полученных у неустойчивых растений, и их выравнивание с помощью программы Blast в GenBank NCBI выявило гомологию с последовательностью семейства генов NBS-LRR (№ HQ222362.1, GenBank NCBI), контролирующих устойчивость подсолнечника к комплексу патогенов. Сделано предположение, что участок NBS-LRR полиморfen у образцов, различающихся по устойчивости к заразихе, и что праймеры маркеров RTS 40 и RTS 40\_1 комплементарны участкам, характерным неустойчивым образцам. Разработаны и апробированы 11 новых маркеров генов NBS-LRR и межгеновых регионов локуса № HQ222362.1. Среди них два маркера - Zar1 и Zar2 - амплифицировались только у устойчивых к заразихе генотипов, тем самым подтвердив свою ценность в селекции подсолнечника.

Ключевые слова: генотипирование, ДНК-маркеры, секвенирование, заразиха подсолнечная, устойчивость, маркер-вспомогательная селекция, подсолнечник.

## DNA MARKERS STUDY OF SUNFLOWER RESISTANCE TO BROOMRAPE (*OROBANCHE CUMANA WALLR.*)

Markin N.V.<sup>1</sup>, Usatov A.V.<sup>1</sup>, Makarenko M.S.<sup>1</sup>, Usatenko T.V.<sup>2</sup>, Gorbachenko O.F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Southern Federal University, Rostov-on-Don, e-mail: nmarkin@mail.ru;

<sup>2</sup>Don Experimental Station L.A. Zhdanov's All-Russia Research Institute of oilseeds, Rostov region

The investigation of DNA-markers (RAPD, SSR, SCAR) associated with resistance to broomrape was revealed. The research was conducted on sunflower lines obtained from Zhdanov Don Experiment Station of All Russia Research Institute of Oil Crop. All the 18 RAPD were not clearly informative, however the OPA17\_1800 and UBC685\_1500 markers were amplified in 81% of nonresistant lines. All the 11 investigated SSR-markers have been also useless for identification of resistant genotypes. Among the studied 9 SCAR-markers only RTS 40 and RTS 40\_1 allowed to select a group of nonresistant lines, which had specific amplicons. The Sanger sequencing of this amplicons and their alignment in NCBI database using Blast have revealed similarity to NBS-LRR-encoding genes (NCBI accession HQ222362.1). NBS-LRR genes are associated with pathogenic resistance and high duplicated, since there is a polymorphic cluster of NBS-LRR-encoding genes. Thus we developed and tested 11 new markers to coding (NBS-LRR) and intergenic regions of the HQ222362.1 locus. Among them, two markers - Zar1 Zar2 allowed to identify broomrape resistant genotypes by specific amplicons.

Keywords: genotyping, DNA markers, sequencing, sunflower broomrape, resistance, marker-assisted selection, sunflower.

Заразиха подсолнечная (*Orobanche cumana* Wallr.) представлена многочисленными расами, постоянно возникающими в результате сопряженной эволюции паразита и хозяина, которые способны преодолевать иммунитет устойчивых генотипов. В последнее время на юге России сотрудниками ВНИИ масличных культур дифференцировано 8 рас *O. cumana*: A, B, C, D, E, F, G, H [1; 3; 4]. Угроза снижения урожая подсолнечника вследствие быстрого

распространения новых рас заразихи на юге РФ актуализировала направление селекции подсолнечника на создание устойчивых генотипов к этому растению-паразиту.

Внедрение молекулярных маркеров в современные селекционные программы позволяет многократно повысить эффективность отбора перспективных образцов, в том числе устойчивых к патогенам [10; 11].

**Целью** работы является поиск информативных ДНК-маркеров устойчивости подсолнечника к заразихе.

### **Материалы и методы**

На инфекционном фоне в оранжерее Донской опытной станции им. Л.А. Жданова ВНИИ масличных культур были выделены образцы, контрастно различающиеся по устойчивости/чувствительности к наиболее вирулентным в Ростовской области расам заразихи *O. cistana* (табл. 1). Для создания инфекционного фона использовали смесь семян заразихи, собранных в различных районах и агроклиматических зонах Ростовской области. Поражаемость оценивали по наличию проростков заразихи на корнях исследуемых образцов. В работе использовали 18 RAPD-маркеров: P36, P37, P38, P46, P53, OPT-08, OPW-04, OPW-06, OPW-09, OPW-10, OPW-15, OPX-01, UBC-73, UBC-120, UBC-264, UBC-318, UBC-685, OPA-17 [7]; 11 SSR-маркеров: ORS 1222, ORS 1114, ORS 1036, ORS 1056, ORS 1040, ORS 202, ORS 1112, ORS665, ORS 1021, ORS 718, ORS 545 [12] и 9 SCAR-маркеров: RTS05, RTS 05\_1, RTS 28, RTS 29, RTS 29\_1, RTS40, RTS40\_1, RTS 41, RTS 43 [8], ассоциированных, по данным литературы, с устойчивостью подсолнечника к *O. cistana*.

Таблица 1

Образцы подсолнечника, исследованные на наличие ДНК-маркеров устойчивости к заразихе

№ пробы	Генотипы, устойчивые к заразихе	№ пробы	Генотипы, не устойчивые к заразихе
1	J-2/2979	22	C-1/98
2	C-1/87	23	C-1/132
3	C-1/144	24	J-2/4341
4	J-3/2822	25	Донской 22
5	J-3/2825	26	J-2/4412
6	J-4/495	27	J-5/169
7	J-4/501	28	J-5/931
8	J-4/507	29	J-5/236
9	J-4/509	30	J-5/1448
10	J-4/517	31	J-4/169
11	J-4/525	32	J-4/931

12	J-3/2849	33	J-4/236
13	J-4/541	34	J-5/73
14	J-4/546	35	J-5/383
15	J-3/3136	36	J-5/869
16	J-4/746	37	J-5/169
17	J-4/756	38	J-5/931
18	J-4/759	39	J-3/236
19	J-2/4402	40	J-3/73
20	J-2/4405	41	J-3/45
21	J-2/4417		

Геномную ДНК выделяли из высечки листовой ткани сорбентным методом [9]. Полимеразную цепную реакцию проводили согласно [2]. Реакцию амплификации проводили в термоциклире Palm-Cycler (Corbett Research, Австралия) по следующей программе для RAPD анализа: 1) один цикл: 4 мин. 94 °C; 30 циклов: 1 мин. 94 °C, 1 мин. 37 °C, 1 мин. 72°C; один цикл: 10 мин. 72 °C; для SSR- и SCAR-анализа 1) один цикл: 4 мин. 94 °C; 35 циклов: 1 мин. 94 °C, 1 мин. 60 °C, 1 мин. 72°C; один цикл: 10 мин. 72 °C. Очистку фрагментов амплифицированной ДНК для прямого секвенирования выполняли согласно [13]. Нуклеотидные последовательности определяли с использованием набора реагентов ABI Prism BigDye Terminator v.3.1.(«Applied Biosystems», USA) согласно прилагаемой инструкции с последующим анализом продуктов на секвенаторе ABI Prism 3130xl. Хромотограммы анализировали с помощью пакета программ BioEdit 7.0.9.0. [6].

Для дизайна праймеров использовали программу Primer Quest Tool от Integrated DNA Technologies, Inc.

## Результаты

Среди исследованных 18-ти RAPD маркеров, специфичных для устойчивых образцов не обнаружено, однако два маркера - OPA17\_1800 и UBC685\_1500, были амплифицированы у 81% чувствительных образцов. Интересно отметить, что RAPD маркер UBC120\_660, описанный в работе [8], как ассоциированный с устойчивостью к заразихе, оказался не информативным в нашей выборке генотипов. Остальные маркеры также оказались неинформативными для кластеризации генотипов по признаку устойчивости/чувствительности к патогену.

Результаты амплификация ДНК изучаемых образцов с 11 SSR-праймерами показали, что электрофоретические профили существенно отличаются друг от друга, однако они также не коррелировали с устойчивостью подсолнечника к заразихе.

Из 9 SCAR-маркеров, только два - RTS 40 и RTS 40\_1, позволили кластеризовать исследуемые генотипы. На электрофорограммах у всех устойчивых образцов отсутствовали бэнды размером около 360 п.н. (маркер RTS 40) и 300 п.н. (маркер RST 40\_1), которые были характерны для неустойчивого к заразихе подсолнечника.

В дальнейшем мы провели секвенирование этих двух ампликонов, последовательности нуклеотидов которых приведены в таблице 2.

Таблица 2

Последовательности нуклеотидов ДНК фрагментов

ДНК-маркеры	Последовательность нуклеотидов
RTS 40	ACAATGGCCGCCGAAGCCCCACTGCGGTAAACCCGGTTGGCTCGG TTTCGAAC TGACGATCTCAAAGAGGCCTAGTTCTAAACTTCAT TGCCACCACCAATGTCCTCAAAGT GATGCTAGTGGGAGTAAAC CCCTAATGTGAGCTCGACAATAGCTGAAAATTGTAATCATAAC TAAGCTTGATGAAATAACTCGGATTAAAAGCTTTAATGGCTTG ATATGTCTAGTAGAGTTCGTTGATAAAATGGCCCAAAATATAT GTTCAAATCGCTCGCTTATCGCTCGCTGCCGATCGTTCGGA AACCGCTCGGAATATGTCGCTCGGTGGAA
RTS 40_1	GGCATT TTTATCACGAAACTCTACTAGACATATCAAGCCATTAA AGCTTTAATCCGAGTTATTCATCAAGCTTAGTTATGATTACAA TTTCAGCTATTGTCGAGCTCACATTAGGGTTACTCCCACTA GCATCACTTGAGGACATTGGTGGCAATGAAGTTAGAAC TAGGCCTTTGGAGATCGTCAGTCGAAACCGAGCCGAACCGG GTTTACCGCAGTGGCCTCGGGCGGCGGGTTCTCCCGAAC TGGTAGCTCA

Данные последовательности были проанализированы с помощью программы Blast в GenBank NCBI. Оказалось, что нуклеотидные последовательности фрагмента ДНК, амплифицированного с праймером RTS 40 на 98%, а с праймером RTS 40\_1 на 81% гомологичны последовательности № HQ222362.1 в GenBank [5], в которой расположены гены NBS-LRR, контролирующие устойчивость подсолнечника к комплексу патогенов.

Исходя из полученных результатов, был расширен поиск маркеров, ассоциированных с устойчивостью к заразихе, и определены 11 новых маркеров генов NBS-LRR и межгенных регионов локуса № HQ222362.1. Для идентификации этих маркеров нами были разработаны новые праймеры (табл. 3).

Таблица 3

Праймеры для идентификации генов NBS-LRR и межгенных регионов

№	Локус	Последовательность оснований (5'-3')	Размер, п.н.	Tm, °C	GenBank
1	Zar1	GCATCACTTGAAAGGACATTGG ATGCGTTGTGTAATTCTTGTATGG	529	60	<a href="#">HQ222362.1</a>
2	Zar2	CCAACTCTGACCGTTATGAAGA GCGATGTCTAGTTGTTGGTTG	437	60	<a href="#">HQ222362.1</a>
3	Zar3	TATGGAGGATCTGGTCGGTTAG GAAAGTGGTTGTGAGTGAAGGA	716	60	<a href="#">HQ222362.1</a>
4	Zar4	CAACCATGCACCCCCAATTAC GTTGCCAACAACTTCCTAATG	990	60	<a href="#">HQ222362.1</a>
5	Zar5	TAAACAAGAAGCAAGGCATCAAG GTGCTCTATCGAACGGGAATAA	317	60	<a href="#">HQ222362.1</a>
6	Zar6	TGGGTAATCTCCTACTACCCTAAA GAATGCCAACGTTCTCGAATG	301	60	<a href="#">HQ222362.1</a>
7	Zar7	CGAACAACTGGTGTGCATT GTGTTGCCACTGCAAGTTATG	356	60	<a href="#">HQ222362.1</a>
8	Zar8	CCCAACGTCTAACGTTATCT GGGAGAAATGGGCAAACAATAC	568	60	<a href="#">HQ222362.1</a> <a href="#">EU924141.1</a>
9	Zar9	ACATGCCTTCTGTGAATGGA GAGTCAGGATCTGGATTG	206	60	<a href="#">HQ222362.1</a>
10	Zar10	CCAACCCAAATGACCAAGAATAG CTGATGCCCGAGAGTCTTAC	234	60	<a href="#">HQ222362.1</a>
11	Zar11	GCAGTGAGGACGGTTTAG AAGCAGAACAAATGATGGACAAATC	200	60	<a href="#">HQ222362.1</a>

Из 11 маркеров только два – Zar1 и Zar2, оказались информативными для идентификации генотипов, устойчивых к заразихе. Так, у 90% устойчивых форм наблюдается амплификация фрагментов 529 и 437 п.н., отсутствующих у поражаемых образцов.

### Выводы

С помощью 18 RAPD-, 11 SSR- и 9 SCAR-маркеров, которые, по данным литературы, ассоциированы с устойчивостью подсолнечника к заразихе, были генотипированы образцы Донской опытной станции ВНИИМК, контрастно различающиеся по устойчивости/чувствительности к наиболее вирулентным в Ростовской области расам. Ни один из этих маркеров не был специфичным для устойчивой группы генотипов. Однако два

RAPD-маркера - OPA17\_1800; UBC685\_1500 и два SCAR-маркера - RTS 40; RTS 40\_1 были характерны для неустойчивых к заразихе образцов.

Прямое секвенирование и поиск гомологии в GenBank NCBI маркеров - RTS 40 и RTS 40\_1, позволил найти последовательность семейства генов NBS-LRR, контролирующих устойчивость подсолнечника к комплексу патогенов. Используя последовательность локуса NBS-LRR (№ HQ222362.1, GenBank NCBI), были определены 11 новых маркеров генов и межгенных регионов. Среди них два маркера - Zar1 и Zar2 - оказались информативными для идентификации генотипов, резистентных к заразихе. Эти маркеры могут представлять непосредственный интерес в селекции подсолнечника.

### **Список литературы**

1. Антонова Т.С. Вирулентность заразихи, поражающей подсолнечник в Волгоградской и Ростовской областях / Т.С. Антонова, Н.М. Арасланова, С.А. Рамазанова, С.З. Гучетль, Т.А. Челюстникова // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИ масличных культур. – Краснодар, 2011. – Вып. № 1 (146-147). – С. 127-130.
2. Усатов А.В., Азарин К.В., Тихобаева В.Е., Воличенко М.И., Гаврилова В.А., Маркин Н.В. ДНК-Маркеры устойчивости к ложной мучнистой росе (*Plasmopara halstedii*) у дикорастущих форм подсолнечника // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4. - URL: <http://www.science-education.ru/110-9757>.
3. Antonova T.S. The history of Interconnected evolution of *Orobanche cumana* Wallr. And Sunflower in the Russian Federation and Kazakhstan // Helia. -2014. – Vol. 37. – P. 215–225.
4. Antonova T.S. Distribution of highly virulent races of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in the Southern Regions of the Russian Federation / T.S. Antonova, N.M. Araslanova, E.A. Strelnikov, S.A. Ramazanova, S.Z.Guchetl, T.A. Chelyustnikova // Russian Agricultural Sciences, 2013. – Vol. 39. – № 1. – P. 46–50.
5. Bachlava E. Downy mildew (P18 and P14) and rust (RAdv) resistance genes reside in close proximity to tandemly duplicated clusters of non-TIR-like NBS-LRR-encoding genes on sunflower chromosomes 1 and 13. / E. Bachlava, O.E. Radwan, G. Abratti, S. Tang, W. Gao, A.F. Heesacker, M.E. Bazzalo, E. Zambelli, A.J. Leon, S.J. Knapp // Theor. Appl. Genet., 2011. – 122. – P. 1211–1221.
6. Hall T.A. BioEdit: a user – friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. // Nucleic Acids Symp. Ser. - 1999. – V. 41. – P. 95-98.

7. Katzir N. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the study of the parasitic weed *Orobanche* / N. Katzir, V. Portnoy, G. Tzuri, M. Castejon-Munoz, D.M. Joel // Theoretical and Applied Genetics. - 1996. – V. 93. – P. 367-372.
8. Lu Y.H. Development of SCAR markers linked to the gene Or5 conferring resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower / Y.H. Lu, J.M. Melero-Vara, J.A. García-Tejada, P. Blanchard // Theoretical and Applied Genetics. - 2000. – Vol. 100. – P. 625-632.
9. Markin N.V. SSR Analysis of Maternal and Paternal Lines Selected in the Don Region (Russia) / N.V. Markin, A.V. Usatov, V.N. Vasilenko, A.I. Klimenko, O.F. Gorbachenko, D.N. Maidanyuk, L.V. Getmantseva // Am. J. Agric. Biol. Sci. - 2016. – V. 11. – № 1. – P. 13-18. DOI :10.3844/ajabssp.2016.13.18.
10. Prez-Vich B. Quantitative trait loci for broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) resistance in sunflower / B. Prez-Vich, B. Akhtouch, S.J. Knapp, A.J. Leon, L. Velasco, J.M. Fernández-Martínez, S.T. Berry // Theoretical Applied Genetics. - 2004. – Vol. 109. – P. 92–102.
11. Seiler G.J. Wild Sunflower Species as a Genetic Resource for Resistance to Sunflower Broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) / G.J. Seiler, C.C. Jan // Helia. - 2014. – Vol. 37. – P. 129–139.
12. Tang S. Genetic Mapping of the *Or5* Gene for Resistance to *Orobanche* Race E in Sunflower / S. Tang, A. Heesacker, V.K. Kishore, A. Fernandez, E.S. Sadik, G. Cole, S.J. Knapp // Crop Sci., 2003. – V.43. – P. 1021–1028.
13. Werle E. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing / E. Werle, C. Schneider, M. Renner, M. Völker , W. Fiehn // Nucl. Acids Res., 1994. – V. 22. – № 20. – P. 4354-4355.