

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

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

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

²Донская 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 заразице, 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), контролирующей устойчивость подсолнечника к комплексу патогенов. Сделано предположение, что участок NBS-LRR полиморфен у образцов, различающихся по устойчивости к заразице, 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 межгенных регионов локуса № HQ222362.1. Среди них два маркера - Zar1 и Zar2 - амплифицировались только у устойчивых к заразице генотипов, тем самым подтвердив свою ценность в селекции подсолнечника.

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

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

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

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

²Don 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.

Заразица 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*: А, В, С, D, Е, F, G, H [1; 3; 4]. Угроза снижения урожаев подсолнечника вследствие быстрого

распространения новых рас заразики 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 заразики.

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 заразики *O. citana* (табл. 1). Для создания инфекционного фона использовали смесь семян заразики, собранных в различных районах и агроклиматических зонах Ростовской области. Поражаемость оценивали по наличию проростков заразики 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. citana*.

Таблица 1

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

№ пробы	Генотипы, устойчивые к заразики	№ пробы	Генотипы, не устойчивые к заразики
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 термоциклере Palm-Cycler (Corbett Research, Австралия) по следующей программе для RAPD анализа: 1) один цикл: 4 мин. 94 °С; 30 циклов: 1 мин. 94 °С, 1 мин. 37 °С, 1 мин. 72°С; один цикл: 10 мин. 72 °С; для SSR- и SCAR-анализа 1) один цикл: 4 мин. 94 °С; 35 циклов: 1 мин. 94 °С, 1 мин. 60 °С, 1 мин. 72°С; один цикл: 10 мин. 72 °С. 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. Хроматограммы 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 заразице, 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 заразице.

Из 9 SCAR-маркеров, только два - RTS 40 и RTS 40_1, позволили кластеризовать исследуемые генотипы. На электрофореграммах у всех устойчивых образцов отсутствовали бэнды размером около 360 п.н. (маркер RTS 40) и 300 п.н. (маркер RTS 40_1), которые были характерны для неустойчивого к заражению 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	ACAATGGCCGCCGAAGCCCACTGCGGTAACCCGGTTCGGCTCGG TTTCGAACTGACGATCTCCAAAGAGGCCTAGTTCTAAACTTCAT TGCCACCACCAATGTCCTTCAAAGTGATGCTAGTGGGAGTAAAC CCCTAATGTGAGCTCGACAATAGCTTGAAAATTGTAATCATAAC TAAGCTTGATGAAATAACTCGGATTTAAAAGCTTTAATGGCTTG ATATGTCTAGTAGAGTTTCGTTGATAAAAATGGCCCAAATATAT GTTCAAATCGCTCGTCGCTTATCGCTCGCTCGCCGATCGTTCGGA AAACGCTCGGAATATGTCCGCTCGGTGGAA
RTS 40_1	GGCATTTTTATCACGAAACTCTACTAGACATATCAAGCCATTAA AGCTTTTAATCCGAGTTATTTTCATCAAGCTTAGTTATGATTACAA TTTTCAAGCTATTGTGAGCTCACATTAGGGGTTTACTCCCACTA GCATCACTTTGAAGGACATTGGTGGTGGCAATGAAGTTTAGAAC TAGGCCTCTTTGGAGATCGTCAGTTCGAAACCGAGCCGAACCGG GTTTTACCGCAGTGGGCCTTCGGGCGGCGGGTTTTCTCCGGAAC 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 заражению, 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	GCATCACTTTGAAGGACATTGG ATGCGTTGTGTAATTCTTGTATGG	529	60	HQ222362.1
2	Zar2	CCAACTCTGACCGTTATGAAGA GCGATGTCTAGTTGTTTGGTTG	437	60	HQ222362.1
3	Zar3	TATGGAGGATCTGGTTCGGTTAG GAAAGTGGTTGTGAGTGAAGGA	716	60	HQ222362.1
4	Zar4	CAACCATGCACTCCCAATTTAC GTTGCCCAACAACCTTCTAATG	990	60	HQ222362.1
5	Zar5	TAAACAAGAAGCAAGGCATCAAG GTGCTCTATCGAACGGGAATAA	317	60	HQ222362.1
6	Zar6	TGGGTAATCTCCTACTACCCTAAA GAATGCCAAGTTCTTCTCGAATG	301	60	HQ222362.1
7	Zar7	CGAACAACCTGGTGTGCATTT GTGTTGCCACTGCAAGTTATG	356	60	HQ222362.1
8	Zar8	CCCAACGTCTCAACGTTATCT GGGAGAAATGGGCAAACAATAC	568	60	HQ222362.1 EU924141.1
9	Zar9	ACATGCCTTTCTGTGAATGGA GAGTTCAGGATCTGGGATTTGG	206	60	HQ222362.1
10	Zar10	CCAACCCAAATGACCAAGAATAG CTGATGCCCGAGAGTCTTTAC	234	60	HQ222362.1
11	Zar11	GCAGTGAGGACGGTTGTTAG AAGCAGAACAATGATGGACAAATC	200	60	HQ222362.1

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 заразице образцов.

Прямое секвенирование и поиск гомологии в GenBank NCBI маркеров - RTS 40 и RTS 40_1, позволил найти последовательность семейства генов NBS-LRR, контролирующей 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 заразице. Эти маркеры могут представлять непосредственный интерес в селекции подсолнечника.

Список литературы

1. Антонова Т.С. Вирулентность заразицы, 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 P114) 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.