

CZU 633.854.78: 632.485.2

SCREENING-UL GERMOPLASMEI DE FLOAREA-SOARELUI LA RUGINĂ

Maria DUCA¹, Tatiana ȘESTACOVA¹, Angela PORT¹,
Aliona CUCEREAVÎP, Ion GÎSCĂ² Olese TABĂRĂ¹

¹ Universitatea Academiei de Științe a Moldovei
² „AMG – Agroselect” SRL

Abstract: A key feature of sunflower commercial hybrids is the resistance to various diseases and pests, which excludes the use of chemical treatments and reduces negative environmental impacts. Rust is a fungal disease caused by *Puccinia helianthi* leading to significant yield losses. The molecular screening of rust resistance genes offers the possibility of identifying parental forms and hybrids resistant to infection. In this study 42 sunflower genotypes (*Rf* paternal lines, maternal lines with cytoplasmic male sterility (CMS) and F1 commercial hybrids) were evaluated for the presence of the amplicon 950 pb associated with *R₁* gene, which confer resistance to the rust race 100. Molecular SCAR analysis (*Sequence Characterized Amplified Regions*) showed that the amplicon was not present at CMS lines indicating that these genotypes do not possess *R₁* gene. The fragment of 950 bp was found only in 13 genotypes: 10 paternal lines and three local commercial F1 hybrids (Nistru, Doina and Oscar). The data provide useful information to breeders for selecting parental combinations to create hybrids resistant to rust.

Key words: *Helianthus annuus*; Screening; Molecular marker; Rust; Resistance

Rezumat: O caracteristică esențială a hibrizilor comerciali de floarea-soarelui reprezintă rezistența la diferite boli și dăunători, ceea ce exclude utilizarea tratamentelor chimice și diminuează impactul negativ asupra mediului. Rugina reprezintă o maladie micotică provocată de *Puccinia helianthi* ce cauzează pierderi semnificative de recoltă. Screening-ul molecular al genelor de rezistență la rugină oferă posibilitatea identificării formelor parentale și hibrizilor rezistenți la infecție. În acest studiu s-au evaluat 42 genotipuri de floarea-soarelui (linii paterne *Rf*, linii materne cu androsterilitate citoplasmatică (ASC) și hibrizi *F₁* comerciali) pentru a se stabili prezența ampliconului de 950 pb asociat cu gena *R₁*, ce conferă rezistență la rasa de rugină 100. Analiza SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) a demonstrat lipsa ampliconului de 950 pb la toate liniile materne, ceea ce indică faptul că aceste genotipuri nu posedă gena *R₁*. Fragmentul de 950 pb a fost identificat doar la 13 genotipuri de floarea-soarelui: 10 linii paterne și 3 hibrizi comerciali autohtoni *F₁* (Nistru, Doina și Oscar). Datele obținute furnizează informații utile amelioratorilor privind selectarea combinațiilor parentale în crearea hibrizilor rezistenți la rugină.

Cuvinte cheie: *Helianthus annuus*; Screening; Marker molecular; Rezistență; Rugină

INTRODUCERE

Studiul rezistenței plantelor de floarea-soarelui la diferite boli prezintă un aspect important pentru amelioratori. Majoritatea bolilor sunt cauzate de ciuperci. Cei mai frecvenți patogeni ai florii-soarelui sunt: *Puccinia helianthi* (rugină), *Verticillium dahliae* (ofilirea verticiliană), *Plasmopara halstedii* (mană), *Phoma macdonaldii* (înnegrirea tulpinii), *Sclerotinia sclerotiorum* (mucegaiul tulpinii), *Diaporthe helianthi* (pătarea brună), *Macrophomina phaseolina* (tăciune), *Alternaria helianthi* (alternarioză), *Erysiphe cichoracearum* (făinarea) (Peresypkin, V.F. 1989). Toleranța la aceste boli a fost studiată la numeroase specii sălbatice de *Helianthus*, o sursă bună de gene de rezistență (Morris, J.B. et al. 1983; Škorić, D. 1985; Quresh, Z. et al. 1993).

Rugină cauzată de *Puccinia helianthi* reprezintă una dintre cele mai răspândite patologii ale florii-soarelui (Qi, L.L. et al. 2011b). Pagubele produse variază mult în funcție de condițiile climaterice locale, favorabile dezvoltării bolii (Fick, G.N. 1983; Rashid, K. Y. et al. 2003), de calitatea lucrărilor agrotehnice și de sensibilitatea germoplasmei hibrizilor comerciali la diferite rase de rugină (Vronskih, M.D. et al. 2007).

Cu ajutorul markerilor moleculari a fost cartografiată o serie de gene de rezistență la rugină (*R*) (Tab. 1).

Gena *R₁* a fost descrisă pentru prima dată în anul 1963 ca factor ereditar, ce conferă rezistență la rasa de rugină 100 (Putt, E.D. et al. 1963). Pentru screening-ul molecular al genei *R₁* a fost elaborat markerul de tip SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) - SCT06₉₅₀, care determină producerea unui amplicon de 950 pb asociat cu rezistența la rugină (Lawson, W.R. et al. 1998; Șestacova, T. 2011). Genele *R₂*, *R₄* și *R₅* conferă rezistență la rasa de rugină 300 (Gulya, T.J. et al. 2009), iar gena *R₁₁*, identificată la linia *Rf*ANN-1742 - la rasele 336 și 777, cunoscute ca foarte virulente (Qi, L.L. et al. 2011a).

Tabelul 1. Markerii utilizați pentru identificarea genelor de rezistență la rugină

Gena	Locusul	Marker	Autorul, anul
<i>R₁</i>	<i>LG8</i>	SCT0 6950	Lawson, W.R. et al. 1998
<i>R₂</i>	<i>LG 9</i>	ORS333	Lawson, W.R. et al. 1998; 2011
<i>R₄</i>	<i>LG13</i>	ZVG61, ORS581	Qi, L.L. et al. 2011b
<i>R₅</i>	<i>LG 2</i>	ORS630, ORS316	Qi, L.L. et al. 2012a
<i>R₁₁</i>	<i>LG13</i>	ORS728	Qi, L.L. et al. 2012b
<i>R₁₂</i>	<i>LG 11</i>	CRT84	Gong, L. et al. 2013b
<i>R_{13a}, R_{13b}</i>	<i>LG13</i>	RG C15/16, SUN14	Gong, L. et al. 2013a
<i>R_{adv}</i>	<i>LG13</i>	RG C260	Baclava, E. et al. 2011

Identificarea acestor factori genetici și localizarea lor la nivelul cromozomilor oferă posibilitatea de a combina mai multe gene într-un singur genotip sau linie consangvinizată (Lawson, W.R. et al. 1998, 2011; Qi, L.L. et al. 2011b, 2012a) în scopul obținerii hibrizilor cu rezistență multiplă la rugină.

În acest context, drept obiectiv al cercetărilor a fost identificarea prezenței genei *R₁* la genotipurile incluse în studiu pentru utilizarea datelor ulterioare în programele de ameliorare și producerea hibrizilor de floarea-soarelui rezistenți la rugină în Republica Moldova.

MATERIAL ȘI METODĂ

Material genetic. În calitate de obiect de studiu în cercetările prezentate au servit 42 genotipuri de floarea-soarelui, din colecția asociației „AMG-Agroselect” Comerț, Soroca. Setul de genotipuri studiate a cuprins 22 linii paterne *R_f* (MS-2440C, MS-2064C, MS-1924C, MS-1944C, MS-1950C, MS-2080C, MS-1985C, MS-1995C, MS-2570C, MS-2275C, MS-3470C, MS-1920C, MS-2555C, MS-2540C, MS-2203C, MS-2583C, MS-2400C, MS-2565C, MS-2005C, MS-2020C, MS-2090C, MS-2550C), 12 linii ASC (MS-2077A, MS-2067A, MS-2091A, MS-1589A, MS-2039A, MS-2098A, MS-2161A, MS-2073A, MS-2185A, MS-2075A, MS-2036A, MS-2026A), 8 hibrizi *F₁* comerciali (Codru, Dacia, Nistru, Zimbru, Talmaz, Doina, Cezar, Oscar).

Cultivarea și colectarea materialului. Semințele de floarea-soarelui au fost cultivate în vase de vegetație de 200 ml pe substrat de nisip. Plantele au fost crescute la temperatura medie de 21°C, cu fotoperioada de 10–12 ore. Materialul vegetal a fost colectat la etapa de două frunze cotiledonale după 7 zile de cultivare.

Izolarea ADN-ului. Extragerea ADN-ului s-a realizat din material vegetativ proaspăt (trei plantele de floarea-soarelui – probe *bulk*) cu folosirea setului de reagenți GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit (*Thermo Scientific*). Puritatea și calitatea probelor de ADN a fost evaluată la spectrofotometrul T60 UV-VIS Spectrophotometer prin estimarea raportului $\lambda_{260}/\lambda_{280}$, ce a prezentat valori cuprinse între 1,8–2,0. Conținutul ADN în probă a variat între 230–800 ng/μl.

Screening-ul molecular. Reacția PCR a fost realizată la amplificatorul GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) într-un volum total de 15 μl mediu de reacție, care a inclus 50 ng de ADN, 0,25 μM fiecare primer, 200 μM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, DreamTaq Green DNA Polymerase (*Thermo Scientific*) 1U/reacție, soluție tampon.

Succesiunea primerilor pentru markerul molecular SCAR:

- sens – CAAGGGCAGAAAACAAAACACTACAC
- antisens – CAAGGGCAGAGAGTTTCCAC (Lawson et al. 1998).

Programul de amplificare: denaturare – 4 min 95°C urmat de 35 cicluri: 30 s la 95°C, 30 s la 69°C, 1 min la 72°C; elongare finală – 3 min la 72°C.

Produceții de amplificare au fost vizualizate în gel de agaroză de 1% utilizând soluția tampon TAE (Tris-acetat EDTA) în prezența markerului GeneRuler 100 bp DNA Ladder SM0241 (*ThermoScientific*).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Screening-ul fenotipic realizat pe câmpurile asociației “AMG–Agroselect” a relevat simptome de infectare a plantelor cu rugină la 31 de genotipuri dintre cele 42 studiate. Infectarea cu rugină s-a manifestat începând cu faza de plantule și până la sfârșitul perioadei de vegetație. Efecte mai pronunțate au fost constatate la nivelul frunzelor și mai puțin pe sepelele capitului. Frunzele au prezentat numeroase

pustule de uredospori punctiforme sau alungite, cu diametrul de 0,5–2,0 mm, prăfoase, dispersate pe ambele fețe, în special pe cea inferoară. În majoritatea cazurilor (75–80% din plantele infectate), frunzele prezintă pustule izolate, rareori (20–25%) în cazul unui atac mai intens, confluează și ocupă porțiuni mari din suprafața limbului foliar (Fig. 1). S-a stabilit că dezvoltarea activă a ciupercii are loc în lunile iunie-august și este favorizată de temperaturi ridicate și umiditate mai scăzută. Spre toamnă, printre pustulele cu uredospori s-au diferențiat pustule cu teleutospori, asemănătoare ca formă și dispoziție cu cele precedente, dar mai puțin prăfoase și de culoare brun-negricioase.

Simptomele observate sunt similare cu cele descrise de alți autori (Bailey, D.L. 1923; Vronskih, M.D. et al. 2007).



Figura 1. Aspectul exterior al limbului foliar atacat de rugină (câmpul asociației "AMG – Agroselect")

Studiul molecular privind gena R_1 a demonstrat prezența fragmentului de 950 pb asociat cu rezistența doar la 13 genotipuri de floarea-soarelui din cele 42 incluse în cercetare. Ampliconii, care indică rezistența la rugină asigurată de gena R_1 , au fost puși în evidență la 10 linii paterne din 22 studiate (MS-2064C, MS-1924C, MS-1985C, MS-2570C, MS-2555C, MS-2540C, MS-2583C, MS-2400C, MS-2565C, MS-2005C). Aceste genotipuri pot fi recomandate în calitate de surse de gene pentru producerea de hibrizi rezistenți. În cazul celor 12 linii materne cu ASC fragmentul de 950 pb asociat genei R_1 nu a fost identificat, ceea ce indică asupra faptului că aceste genotipuri nu posedă gena respectivă și nu manifestă rezistență la rasa 100 de rugină (Fig. 2, Tab. 2).

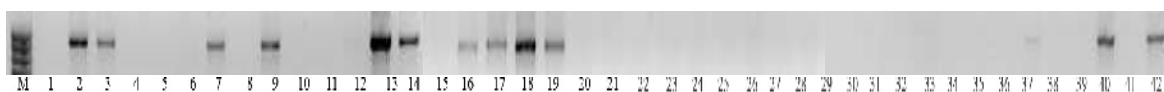


Figura 2. Screening-ul molecular al liniilor de floarea-soarelui privind prezența genei R_1

M – markerul masei moleculare, 1 – MS-2440C, 2 – MS-2064C, 3 – MS-1924C, 4 – MS-1944C, 5 – MS-1950C, 6 – MS-2080C, 7 – MS-1985C, 8 – MS-1995C, 9 – MS-2570C, 10 – MS-2275C, 11 – MS-3470C, 12 – MS-1920C, 13 – MS-2555C, 14 – MS-2540C, 15 – MS-2203C, 16 – MS-2583C, 17 – MS-2400C, 18 – MS-2565C, 19 – MS-2005C, 20 – MS-2020C, 21 – MS-2090C, 22 – MS-2550C, 23 – MS-2077A, 24 – MS-2067A, 25 – MS-2091A, 26 – MS-1589A, 27 – MS-2039A, 28 – MS-2098A, 29 – MS-2161A, 30 – MS-2073A, 31 – MS-2185A, 32 – MS-2075A, 33 – MS-2036A, 34 – MS-2026A, 35 – Codru, 36 – Dacia, 37 – Nistru, 38 – Zimbru, 39 – Talmaz, 40 – Doina, 41 – Cezar, 42 – Oscar.

Din 8 hibrizi F_1 incluși în investigație doar trei (Nistru, Doina și Oscar) s-au caracterizat prin prezența în gel a fragmentului asociat cu gena R_1 (Fig. 2, Tab. 2). Hibridii menționați au fost obținuți prin încrucișarea formei paterne MS-2570C, care posedă gena R_1 , cu diferite forme materne, care, după cum s-a constatat în datele prezentate mai sus, nu conțin gena de rezistență la rugină.

Tabelul 2. Repartizarea genotipurilor în funcție de prezența sau absența markerilor asociați cu gena de rezistență R_1

Genotipuri	Rezistente	Susceptibile
Hibridi F1 (3R/5S)	Nistru, Doina, Oscar	Codru, Dacia, Zimbru, Talmaz, Cezar
Linii Rf (10R/12S)	MS-2064C, MS-1924C, MS-1985C, MS-2570C, MS-2555C, MS-2540C, MS-2583C, MS-2400C, MS-2565C, MS-2005C	MS-2440C, MS-1944C, MS-1950C, MS-2080C, MS-1995C, MS-2275C, MS-3470C, MS-1920C, MS-2203C, MS-2020C, MS-2090C, MS-2550C
Linii ASC (0R/12S)		MS-2077A, MS-2067A, MS-2091A, MS-1589A, MS-2039A, MS-2098A, MS-2161A, MS-2073A, MS-2185A, MS-2075A, MS-2036A, MS-2026A
Total	13 genotipuri	29 genotipuri

CONCLUZII

În condițiile zonei de Nord a Republicii Moldova (or. Soroca) s-a constatat o dezvoltare tipică a infectării genotipurilor de floarea-soarelui cu rugină.

Screening-ul molecular al genei R_1 la genotipurile de floarea-soarelui a demonstrat prezența markerului asociat cu rezistența la rugină a 13 genotipuri, inclusiv trei hibridi comerciali autohtoni, din 42 de genotipuri incluse în cercetare. Se recomandă producerea de hibridi comerciali utilizând formele Rf cu rezistență la rugină pentru a controla în mod eficient răspândirea fitopatogenului în culturile de floarea-soarelui.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. BACHLAVA, E., RADWAN, O.E., ABRATTI, G. et al., 2011. Downy mildew (PI8 and PI14) 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. In: Theoretical and Applied Genetics, vol. 122, pp. 1211–1221.
2. BAILEY, D.L., 1923. Sunflower rust. University of Minnesota Agricultural Experiment Station, Technical Bulletin 16, 39 p. Disponibil: <http://conservancy.umn.edu/bitstream/handle/11299/139550/1/TB16.pdf>
3. FICK, G.N., 1983. Genetics breeding of sunflower. In: Journal of Oil and Fat Industries, vol. 60 (7), pp. 1252–1253.
4. GONG, L., GULYA, T.J., MARKELL, S.G., HULKE, B.S., QI, L.L., 2013a. Genetic mapping of rust resistance genes in confection sunflower line HA-R6 and oilseed line RHA 397. In: Theoretical and Applied Genetics, vol. 126, pp. 2039–2049.
5. GONG, L., HULKE, B.S., GULYA, T.J., MARKELL, S.G., QI, L.L., 2013b. Molecular tagging of a novel rust resistance gene R12 in sunflower (*Helianthus annuus* L.) In: Theoretical and Applied Genetics, vol. 126, pp. 93–99.
6. GULYA, T.J., MARKELL, S., 2009. Sunflower rust status - 2008. Race frequency across the midwest and resistance among commercial hybrids, Fargo. Disponibil: http://www.sunflowernsa.com/uploads/resources/195/gulya_ruststatus_09.pdf
7. GULYA, T., VENETTE, R., VENETTE, J. R., LAMEY, H. A., 1990. Sunflower rust. North Dakota State University, NDSU Extension Service, PP-998. Disponibil: <http://www.ext.nodak.edu/extpubs/plantsci/rowcrops/pp998.pdf>
8. LAWSON, W.R., GOULTER, K.C., HENRY, R.J., KONG, G.A., KOCHMAN, J.K., 1998. Marker assisted selection for two rust resistance genes in sunflower. In: Molecular Breeding, nr 4, pp. 227–234.
9. LAWSON, W.R., JAN, C.C., SHATTE, T., SMITH, L., KONG, G.A., KOCHMAN, J.K., 2011. DNA markers linked to the R2 rust resistance gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) facilitate anticipatory breeding for this disease variant. In: Molecular Breeding, nr 28, pp. 569–576.
10. MORRIS, J.B., YANG, S.M., WILSON, L., 1983. Reaction of *Helianthus* species to *Alternaria helianthi*. In: Plant Disease, nr 67, pp. 539–540.
11. PERESYPKIN, V.F., 1989. Sel'skhozajstvennâ fitopatologîâ. Moskva: Agropromizdat. 480 s.
12. PUTT, E.D., SACKSTON, W.E., 1963. Studies on sunflower rust IV. Two gene, R1 and R2 for resistance in the host. In: Canadian Journal of Plant Science, vol. 43(4), pp. 490–496.
13. QI, L.L., GULYA, T.J., HULKE, B.S., VICK, B.A., 2012a. Chromosome location, DNA markers and rust resistance of the sunflower gene R5. In: Molecular Breeding, nr. 30, pp. 745–756.

14. QI, L.L., GULYA, T.J., SEILER, G.J., HULKE, B.S., VICK, B.A., 2011a. Identification of resistance to new virulent races of rust in sunflowers and validation of DNA markers in the gene pool. In: Phytopathology, vol. 101, pp. 241–249.
15. QI, L.L., HULKE, B.S., VICK, B.A., GULYA, T.J., 2011b. Molecular mapping of the rust resistance gene R4 to a large NBS-LRR cluster on linkage group 13 of sunflower. In: Theoretical and Applied Genetics, vol. 123, pp. 51–358.
16. QI, L.L., SEILER, G. J., VICK, B. A., GULYA, T. J., 2012b. Genetics and mapping of the R11 gene conferring resistance to recently emerged rust races, tightly linked to male fertility restoration, in sunflower (*Helianthus annuus* L.). In: Theoretical and Applied Genetics, vol. 125, pp. 921–932.
17. QURESH, Z., JAN, C.C., GULYA, T.J., 1993. Resistance of sunflower rust and its inheritance in wild sunflower species. In: Plant Breeding, vol. 119, pp. 297-306.
18. RASHID, K. Y., DESJARDINS, M., KAMINSKI, D. A., 2003. Diseases of sunflower in Manitoba in 2002. In: The Canadian Plant Disease Survey, vol. 83, pp. 133-134.
19. ȘESTACOVA, T., 2011. Molecular screening of R1 rust resistance gene among different sunflower genotypes cultivated in Republic of Moldova. In: Structura și funcționalitatea sistemelor biologice – diversitate și universalitate: materialele conf. șt., 17 noiem. 2011, pp. 57-60.
20. ŠKORIĆ, D., 1985. Sunflower breeding for resistance to *Diaporthe/Phomopsis helianthi*. In: Helia, nr. 8, pp. 21-23.
21. VRONSKIH, M.D., PETKOVIČ, I.P., 2007. Bolezni podsolnečnika i mery bor'by s nimi. Chișinău. 68 s. ISBN 978-9975-9521-8-7.

Data prezentării articolului: 12.06.2014

Data acceptării articolului: 15.10.2014