

ЧЕКАЛОВ В.А., ВОЛКОВА Н.Е.✉

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення, Україна, 65036, м. Одеса, вул. Овідіопольська дорога, 3, e-mail: natavolki@ukr.net

✉ natavolki@ukr.net, (096) 362-07-29

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОТИПІВ НУТУ ЗВИЧАЙНОГО ЗА ГЕНАМИ СТІЙКОСТІ ДО ЗБУДНИКА ФУЗАРІОЗУ *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CICERIS*

Мета. Молекулярно-генетичний аналіз генотипів нуту звичайного за *foс0*, *foс3*, *foс4* генами стійкості до збудника фузаріозу *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. **Методи.** Екстрагування та очищення ДНК, спектрофотометрія, полімеразна ланцюгова реакція, електрофорез е поліакриламідних гелях. **Результати.** За даними генотипування зразків нуту звичайного за мікросателітними маркерами ТА59, TR19 та TR59 генів *foс0*, *foс3*, *foс4* стійкості до збудника фузаріозу *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* рас 0, 3 та 4 відповідно охарактеризовано 35 ліній та сортів нуту української та закордонної селекції. Фрагменти очікуваного розміру за всіма маркерами отримано для зразків, для яких встановлено рівень стійкості саме до певних рас. Щодо збігу даних із наявності фрагмента ампліфікації певного розміру та рівня стійкості серед інших зразків, то такої закономірності не виявлено. **Висновки.** Для 35 сортів і ліній нуту звичайного встановлено алейний стан генів *foс0*, *foс3*, *foс4* стійкості до збудника фузаріозного в'янення *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* рас 0, 3, 4. Сорт «Пам'ять» рекомендуємо використовувати як контроль стійкості до *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* рас 0, 3, 4 в умовах півдня України. **Ключові слова:** нут, гени, молекулярні маркери, фузаріоз, стійкість.

В умовах сучасного росту населення планети Земля однією із найгостріших проблем є забезпечення людства продуктами харчування, зокрема, повноцінний раціон людини повинен передбачати достатню кількість протеїнів, особливо тих, до складу яких входять незамінні амінокислоти. Одним із шляхів вирішення цієї проблеми є вирощування зернобобових культур, зокрема нуту (*Cicer arietinum* L.), до складу насіння якого входять протеїни (до 30%) високої якості, крім того, нут є багатим джерелом вітамінів В₁, В₆, поліненасичених жирних кислот (до 7% у насінні) та незамінної амінокислоти лізину. Для України нут є переважно експорто-

орієнтованою культурою. Очікується ріст посівних площ нуту з 40–45 тис. га в 2016 р. до 100–125 тис. га у 2020 р. Такій тенденції сприятиме висока прибутковість виробництва цієї культури. До того ж нут досить посухостійкий та може без втрат переносити затримки із збиранням.

До біотичних обмежень, що впливають на виробництво насіння нуту у світі, відносяться ураження багатьма (більш ніж 50) хворобами. В умовах півдня України найбільш розповсюдженим та шкодочинним є фузаріоз, втрати врожаю насіння від якого можуть сягати 100%. Крім цього, уражене насіння накопичує у собі токсичні речовини, що роблять його непридатним до споживання людиною та тваринами. Збудником фузаріозу є гриб *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Fusarium oxysporum* Schlecht. f.sp. *ciceris* (Padw.) Matuo & Sato (as 'ciceri')). Встановлено існування восьми фізіологічних рас *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*: 1А, 2, 3, 4, 5, 6 (викликають синдром в'янення), 0 та 1В/С (викликають синдром пожовтіння). Даних щодо расового складу *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* в Україні немає.

Стійкість до різних рас патогену забезпечують гени *foс0*, *foс1*, *foс2*, *foс3*, *foс4*, *foс5*. Визначено, що ген *foс1* зчеплений з *foс5* на дистанції 2,0 сМ, тоді як *foс3*, *foс2* та *foс4* близько зчеплені на дистанціях 1,0 сМ та 1,8 сМ відповідно. Певна кількість молекулярних маркерів розроблена для детекції різних генів стійкості, частина з них валідована в колекціях сортів та сортозразків нуту різних країн [1].

Метою нашої роботи є молекулярно-генетичний аналіз генотипів нуту звичайного за *foс0*, *foс3*, *foс4* генами стійкості до збудника фузаріозного в'янення *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

Матеріали і методи

Досліджували 35 ліній та сортів нуту: 11 ліній, отриманих із бази генетичних ресурсів National Plant Germplasm System (NPGS) –

© ЧЕКАЛОВ В.А., ВОЛКОВА Н.Е.

‘CRIL-1-17’, ‘CRIL-1-94’, ‘CRIL-1-36’, ‘CRIL-1-53’, ‘ICCV2’, ‘WR-315’, ‘Sanford’, ‘JG62’, ‘JG74’, ‘P-2245’, ‘CA2954’; 18 сортів ‘Краснокутський 123’, ‘Пам’ять’, ‘Александрит’, ‘Пегас’, ‘Розанна’, ‘Антей’, ‘Буджак’, ‘Скарб’, ‘Тріумф’, ‘Одісей’, ‘Красноградський 213’, ‘Турція’, ‘Турція-2’, ‘Еспаньйол’, ‘Орнамент’, ‘Тарас Бульба’, ‘Yarden’, ‘Торнадо’ та 6 ліній ‘72/12’, ‘14/12’, ‘25/14’, ‘69/12’, ‘20/14’, ‘53/14’ колекції Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення (СГІ-НЦНС). Для ліній нуту, отриманих із NPGS, визначені рівні стійкості до певних рас збудників фузаріозного в’янення. Для зразків нуту колекції СГІ-НЦНС визначено ступінь стійкості до фузаріозного в’янення, стійкість до окремих рас збудника не визначена (табл.).

Екстракцію та очищення ДНК проводили за допомогою набору реагентів GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit™ (ThermoFisher Scientific, США) за рекомендованим фірмово-виробником протоколом. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили із парами праймерів до мікросателітних локусів TA59, TR19 та TR59. Послідовності праймерів та умови ПЛР наведено в [2]. Гель-електрофорез проводили у 6% ПААГ. Для аналізів електрофоретичного розподілу фрагментів ампліфікації використовували програмне забезпечення GelAnalyzer ver. 2010a (ліцензія не потрібна).

Результати та обговорення

Проведено типування зразків нуту за мікросателітними маркерами TA59, TR19 та TR59 генів стійкості до фузаріозу (табл.).

Мікросателітний локус TR59 є маркером гена *fos0* стійкості до фузаріозу, збудником якого є гриб *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* раси 0 [3]: для стійких генотипів характерна наявність продуктів ампліфікації ДНК розміром 171 п. н.

Крім фрагмента очікуваного розміру, також детектовано фрагменти ампліфікації 186, 183, 180, 177, 174, 168, 165 п. н. Найчастіше траплявся алель розміром 171 п. н. (31,4%), найрідше – 186 п. н. (2,9%). Інші алелі цього локусу траплялися з частотою 8,6–14,3%.

Фрагмент ампліфікації розміром 171 п. н., що маркує стійкі до раси 0 генотипи, детектовано в 11 зразках, із яких вісім мали високий або середній рівень стійкості до раси 0, для двох зразків рівень стійкості не визначено, а

сорт Еспаньол має низький рівень стійкості до фузаріозу.

Мікросателітний локус TA59 є маркером гена *fos3* стійкості до фузаріозу, збудником якого є гриб *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* раси 3 [3]: для стійких генотипів характерна наявність продуктів ампліфікації ДНК розміром 267 п. н. Детектовано 10 алелів цього локусу розмірами 276, 273, 270, 267, 264, 261, 255, 251, 245, 242 п. н. (рис.). Серед досліджених зразків найчастіше траплявся алель розміром 267 п. н. (31,4%), частота потрапляння алелів 261 та 255 п. н. – 14,3%, інших – 2,9–8,6%.

Фрагмент ампліфікації розміром 267 п. н., що маркує стійкі до раси 3 генотипи, детектовано у тих зразках, що мали високий або середній рівень стійкості, а також у сорту Красноградський 213 з низьким рівнем стійкості.

Мікросателітний локус TR19 є маркером гена *fos4* стійкості до фузаріозу, збудником якого є гриб *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* раси 4 [3, 4]: для стійких генотипів характерна наявність продуктів ампліфікації ДНК розміром 227 п. н. Детектовано 12 алелів цього локусу розмірами 241, 239, 236, 233, 227, 224, 215, 212, 206, 197, 194, 185 п. н. Найчастіше траплявся алель розміром 227 п. н. (25,7%). Такий алель детектовано у дев’яти зразках, шість із яких мають високий рівень стійкості, три – низький.

Слід зазначити, що фрагменти очікуваного розміру за всіма маркерами отримано для зразків, для яких встановлено рівень стійкості саме до певних рас. Щодо збігу даних з наявності фрагмента ампліфікації певного розміру та рівня стійкості серед інших зразків, то такої закономірності не виявлено. Підкреслимо, що у сорту Пам’ять, який має загальний високий рівень стійкості до фузаріозу, детектовано за трьома маркерами саме ті алелі, що характерні для генотипів, стійких до певних рас. Так, як і для сорту WR-315, який є сортом-диференціатором певних рас і має високий рівень стійкості до них. Вважаємо можливим рекомендувати використовувати сорт Пам’ять як контроль стійкості до *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* рас 0, 3, 4 в умовах півдня України.

Розбіжності в оцінках стійкості сортів нуту у польових дослідах можна пояснити тим, що фузаріоз можуть викликати представники інших рас *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* та підвидів *F. oxysporum*, які входять до популяцій цього збудника в польових умовах, і гени стійкості, до яких можуть бути відсутні у названих сортах.

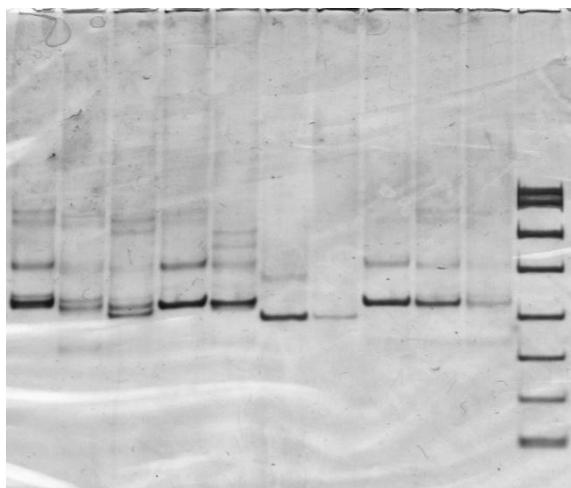
Серед сортів нуту селекції СГІ-НЦНС, крім сорту Пам'ять, також стійкими виявилися сорти: Буджак – до раси 0, Антей – до раси 3, Одисей –

до рас 0 і 4 (загальний рівень стійкості середній) і 'Пегас' (високий загальний рівень стійкості) – до раси 4.

Таблиця. Результати типування зразків ДНК нуту за маркерами генів стійкості до гриба *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

Зразок	Рівень стійкості до гриба <i>F. oxysporum</i> * раси			Продукти ампліфікації мікросателітного локусу, п. н.		
	0	3	4	TR59	TA59	TR19
'14/12'	Середній			177	267	239
'20/14'	Високий			186	251	230
'25/14'	Середній			180	267	236
'53/14'	Високий			171	261	236
'69/12'	Середній			180	267	233
'72/12'	Середній			183	270	233
'CA2954'	Високий	НВ **	НВ	171	273	215
'CRIL-1-17'	НВ	Високий	Низький	171	267	206
'CRIL-1-36'	НВ	Низький	Низький	174	276	224
'CRIL-1-53'	НВ	Високий	Високий	165	267	227
'CRIL-1-94'	НВ	Високий	Середній	171	267	224
'ICCV2'	НВ	Середній	Високий	168	270	227
'JG62'	Високий	Низький	Низький	171	255	185
'JG74'	Високий	Високий	Середній	171	267	224
'P-2245'	Низький	Низький	Низький	168	255	212
'Sanford'	НВ	Низький	Низький	168	273	230
'WR-315'	Високий	Високий	Високий	171	267	227
'Yarden'	Низький			177	245	227
'Александрит'	Високий			165	264	236
'Антей'	Середній			183	267	233
'Буджак'	Середній			171	261	224
'Красноградський 213'	Низький			177	267	НВ
'Краснокутський 123'	Високий			165	270	241
'Одисей'	Середній			171	255	227
'Орнамент'	Низький			174	261	224
'Пам'ять'	Високий			171	267	227
'Пегас'	Високий			165	251	227
'Розанна'	Середній			168	273	233
'Скарб'	Середній			180	261	НВ
'Тарас Бульба'	Низький			174	261	227
'Торнадо'	Низький			174	242	212
'Тріумф'	Середній			168	255	197
'Турция'	Низький			183	264	НВ
'Турция-2'	Низький			177	255	227
'Еспаньоль'	Низький			171	264	194

Примітки: * Відсоток випадків ураження, що супроводжуються розвитком фузаріозу: високий – 0–10%; середній – 11–89%; низький – 90–100%. **НВ – не визначено. Жирним шрифтом виділено розміри фрагментів ампліфікації, характерні для стійких генотипів.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 М

Рис. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК зразків нуту за мікросателітним локусом TA59: 1 – Красноградський 213; 2 – Орнамент; 3 – Тарас Бульба; 4 – Турція; 5 – Еспаньйол; 6 – Торнадо; 7 – Yarden; 8 – P-2245; 9 – JG-62; 10 – WR-315; М – маркер молекулярної маси pUC19/MspI.

Висновки

Охарактеризовано 35 сортів і ліній нуту звичайного за *foc0*, *foc3*, *foc4* генами стійкості до збудника фузаріозного в'янення *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* рас 0, 3, 4. Сорт Пам'ять рекомендуємо використовувати як контроль стійкості до *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* рас 0, 3, 4 в умовах півдня України.

Подяка завідувачеві відділу селекції, генетики та насінництва бобових культур СГІ-НЦНС, к. с. г. н. Бушуляну О.В. за люб'язно надане насіння нуту з колекції СГІ-НЦНС та інформацію щодо рівня стійкості.

Література

1. Sharma K.D., Muehlbauer F.J. *Fusarium* wilt of chickpea: Physiological specialization, genetics of resistance and resistance gene tagging. *Euphytica*. 2007. Vol. 157. P. 1–14. doi: 0.1007/s10681-007-9401-y
2. Winter P., Pfaff T., Udupa S. M., Huttel B., Sharma P. C., Sahi S., Kahl G. Characterization and mapping of sequence-tagged microsatellite sites in the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome. *Mol. General Genet.* 1999. Vol. 262. P. 90–101.
3. Sharma K.D., Chen W., Muehlbauer F. J. Genetics of chickpea resistance to five races of *Fusarium* wilt and a concise set of race differentials for *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Disease*. 2005. Vol. 89. P. 385–390. doi: 10.1094/PD-89-0385
4. Padaliya R.V., Suthar K.P., Diwakar S., Mahatma M.K., Patil V.R. Marker assisted characterization of chickpea genotypes for wilt resistance. *African J. Biotech.* 2013. Vol. 50. P. 6907–6912. doi: 10.5897/AJB2013.13039

ЧЕКАЛОВ В.А., ВОЛКОВА Н.Е.

Plant Breeding and Genetic Institute,

Ukraine, 65036, Odesa, Ovidiopol's'ka doroga str., 3, e-mail: natavolki@ukr.net

CHICKPEA GENOTYPES CHARACTERISTICS ON RESISTANCE TO *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CICERIS*

Aim. Molecular-genetic analysis of the chickpea genotypes for *foc0*, *foc3*, *foc4* resistance genes to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. **Methods.** Extraction and purification of DNA, spectrophotometry, polymerase chain reaction, electrophoresis in polyacrylamide gels. **Results.** 35 chickpea lines and varieties of Ukrainian and foreign breeding characterized according to genotyping on *foc0*, *foc3*, *foc4* genes of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* by the microsatellite markers TA59, TR19 and TR59. Fragments of the expected size for all markers were obtained for samples, for which the resistance level was fixed to certain races. Match between data on the presence of a amplification fragment of a certain size and resistance level among other samples is not found. **Conclusions.** For 35 chickpea varieties and lines the allele state of *foc0*, *foc3*, *foc4* genes of resistance to the *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* races 0, 3, 4 is established. The variety 'Pam'yat' is recommended as a control of resistance to *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* races 0, 3, 4 in the southern Ukraine conditions.

Keywords: chickpea, genes, molecular markers, fusarios, resistance.