

IDENTIFICAREA GRADULUI DE REZISTENȚĂ LA LUPOAIE (RASA E) ÎN CADRUL UNOR GENOTIPURI DE FLOAREA-SOARELUI

Maria DUCA, Aliona GLIJIN, Victoria POPESCU

Catedra Biologie Vegetală

Molecular markers linked to broomrape resistance genes would permit a better understanding of genetic determinism of broomrape resistance in sunflower and facilitate early selection by screening the presence of a few specific DNA markers.

We have provided analysis of 29 sunflower lines with SCAR marker RTS05 linked to the sunflower *Or5* locus conferring resistance to broomrape that belong to race E.

Identification of 650 bp amplicon at 27 genotypes reveal the presence of *Or5* gene, missing of this amplified product at Xenia ♀ and cytoplasmic male sterile genotype # 7 suggest the susceptibility to race E.

Introducere

Lupoia reprezintă un holoparazit angiosperm ce parazitează pe rădăcinile culturilor agricole ca floarea-soarelui, tomate, tutun, bob și altele [1]. Floarea-soarelui este atacată de specia *Orobanche cumana* Wallr., care provoacă pierderi severe ale roadei în țările Europei de Est și Mediteraneene [2]. Până în prezent au fost identificate cinci rase fiziologice de *Orobanche* (A-E) de origine geografică [2,3] și genetică [4] diferită. Astfel, rezistența față de rasa A este determinată de gena *Or*; rezistența față de rasa B – de gena *Or2*, care conferă rezistență și la rasa A; rezistența față de rasa C este determinată de gena *Or3*, care conferă rezistență și la rasele A și B și, respectiv, D – *Or4* cu rezistență la A, B și C, precum și față de rasa E – *Or5* cu rezistență la A, B, C și D [5-7]. În ultimii ani s-a atestat apariția raselor F și G (în Spania). Genele rezistenței la rasa F au fost detectate la unele genotipuri cultivate și la formele sălbatice de floarea-soarelui și pare să confere rezistență la rasele depistate anterior (A-E) [2-4, 8-10].

Controlul acestui parazit este dificil, deoarece câteva mii de semințe produse de o singură plantă de lupoiaie pot fi ușor dispersate de vânt, apă, animale, utilaje, sol etc., semințele rămânând viabile pentru 10-15 ani [11], iar metodele chimice, fizice și biologice utilizate nu înlătură în totalitate parazitul. O alternativă este utilizarea culturilor rezistente la lupoiaie, astfel încât și astăzi continuă cercetările în vederea depistării și introducerii genelor rezistente la acest patogen în materialul de ameliorare [1].

Utilizarea tehnicii RAPD [12] îmbinată cu BSA (bulk segregant analysis) [13] și folosirea markerilor moleculari strâns linkați la genele rezistenței au permis identificarea acestor gene la diferite plante, cum ar fi genele rezistenței la făinărie la *Lactuca sativa* [13], genele rezistenței orzului la *Rhynchosporium secalis* [14], la rugină [15] și altele. Urmărind construcția hărții RFLP la floarea-soarelui [16] și BSA, au fost identificați markerii RFLP linkați cu genele rezistenței la făinărie *PL1*, *PL2* și *PL6* [17-19]. Toate aceste trei gene au fost linkate la același set de markeri RFLP și formează un cluster al grupului de linkaj 1 [19].

Scopul cercetărilor noastre a fost de a identifica prezența genei *Or5* la unii hibrizi și linii de floarea-soarelui.

Material și metode

Caracteristica obiectului de studiu. În calitate de material vegetal au servit zece hibrizi (F_1) de floarea-soarelui (Valentino, Xenia, Performer, Oxana, Vitalia, Drofa, Turbo, Favorit, Alkazar și Olga), liniile parentale a patru hibrizi (Performer, Oxana, Xenia, Valentino) și 11 genotipuri androsterile notate cu cifre de la 1 la 11, respectiv. Materialul semincer a fost oferit de către CCȘ „Magroselect” SRL Soroca.

Condițiile de cultivare *in vivo*. Plantele au fost crescute în vase de vegetație, la temperatura de 24-26°C, fotoperiodicitatea de 14-16 ore, umiditatea de 60%. Materialul a fost colectat și analizat la stadiul de 6-8 frunzulițe adevărate.

Metodele de cercetare

Extragerea ADN-ului. ADN genomic s-a extras din frunze de floarea-soarelui cu DAN-zol [20]. Purificarea ADN-ului s-a realizat repetat cu alcool de 100%, apoi cu alcool de 75%. Precipitatul obținut după uscare a fost dizolvat în apă distilată autoclavată. Concentrația ADN-ului a fost determinată spectrofotometric.

Reacția PCR. Amplificarea s-a efectuat cu primeri specifici SCAR – RTS05, sintetizați în baza fragmentului inițial al pimerului RAPD – OPJ18_650. Succesiunea nucleotidică a markerului SCAR (Alpha DNA, Canada) este următoarea:

F (5'-TGGTCGCAGATGGACGTGTGGGTG-3'),
R (5'-GTCGCAGAGAGTGAGAGAGAGTGT-3').

Reacția de amplificare s-a realizat în volum de 25 μ l, ce conținea apă distilată, 5X PCR tampon, amestec de nucleotide dNTP (2 mM), Taq-polimeraza 1u/ μ l (Germany), primer 50 pb, AND – 6 μ l.

Amplificarea a fost efectuată utilizând un termociclu automat (Corbett, Australia) cu următoarele condiții:

I) denaturarea: 94°C – 4 min. (un ciclu);

II) 45 cicluri, 1) denaturarea: 93°C – 1 min., 2) renaturarea: 63°C – 1 min., 3) elongarea: 72°C – 4 min.;

III) elongarea specifică: 72°C – 6 min.

Electroforeza produșilor de amplificare s-a realizat în gel de agaroză de 1,4% în soluția tampon TAE timp de o oră la 80 V. Gelurile au fost vizualizate în camera UV și fotografiate. Mărimea fragmentelor de ADN amplificate au fost comparate cu markerul standard (100pb DNA ladder, Promega, USA).

Rezultate și discuții

Majoritatea datelor din literatură atestă determinismul monogenic dominant al rezistenței la rasele A - E de lupoaie [3,10,21,22]. Însă, unele referințe relevă o moștenire mai complexă a caracterului, incluzând două gene dominante [8], una recesivă [23], epistazie recesivă dublă [24] sau chiar moștenirea cantitativă. Studiile recente sugerează că rezistența la lupoaie este determinată de mecanisme poligenice cantitative și calitative [25,26]. Identificarea determinismului genetic al rezistenței se bazează tot mai mult pe utilizarea markerilor moleculari ADN specifici [26], inclusiv a markerilor moleculari linkați cu gena *Or5*, ce conferă rezistență la rasa E [27], utilizând metoda BSA [13].

Până în prezent au fost identificați markeri RAPD (UBC120_660) și markeri SCAR (RTS05, RTS28, RTS40, RTS29 și RTS41) linkați la *Or5* și a fost elaborată harta grupului de linkaj pentru gena *Or5*, în a cărei vecinătate la distanța de 22,5 cM distal se află markerul RAPD și, de la 5,6 cM spre 39,4 cM proximal, cei 5 markeri SCAR. Acest grup de linkaj a fost plasat în grupul de linkaj 17 (LG17) al mapei CARTISOL RFLP [27]. Tang (2003), folosind aceeași metodă (BSA), a plasat gena *Or5* în regiunea telomerică a grupului de linkaj 3 (LG3) după harta markerilor SSR [28], cu cel mai apropiat marker SSR cartat la 6,2 cM proximal de locusul genei *Or5*.

În prezenta lucrare s-au studiat 29 genotipuri de floarea-soarelui în vederea cercetării genei *Or5*. Pornind de la rezultatele obținute de Lu și colab. (2004), în urma analizei BSA ei au constatat că unul dintre cei mai apropiați markeri SCAR este markerul RTS05 cartat la distanța de 5,6 cM proximal de gena *Or5*; în cercetările noastre am utilizat acest marker cu fragmentul inițial al primerului RAPD - *OPJ18_650* cu un produs de amplificare de 650 pb.

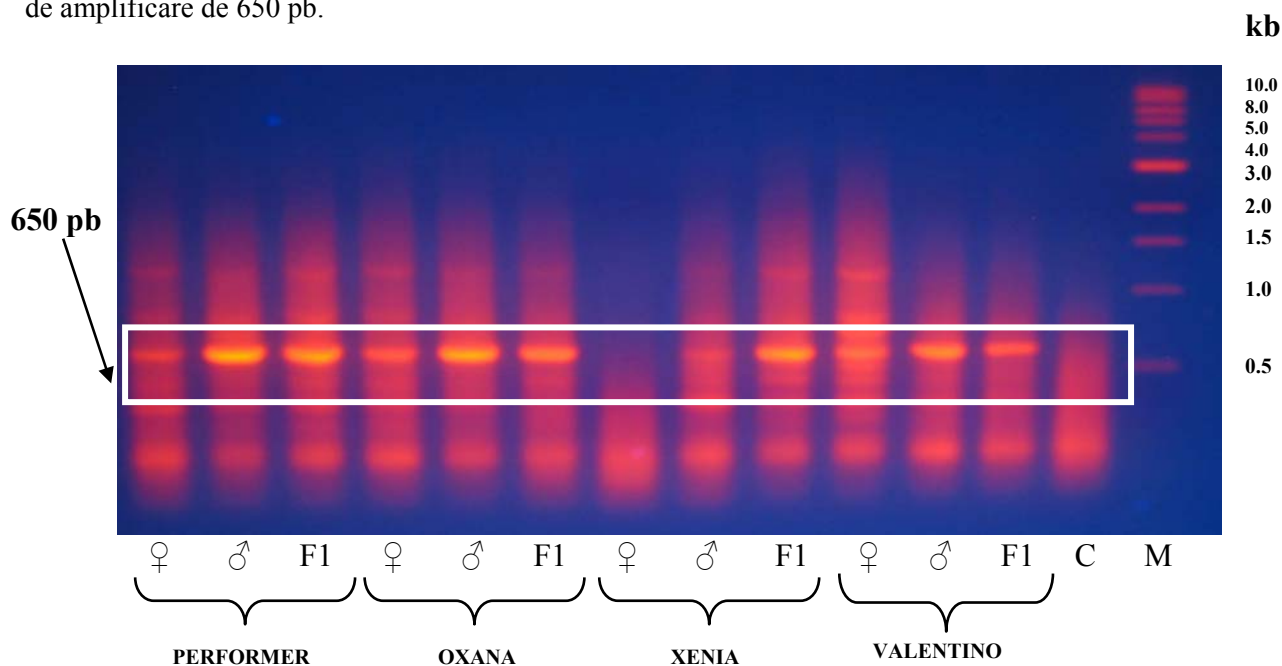


Foto 1. Rezultatele amplificării ADN-ului cu markerul specific SCAR (RTS05) la diferite familii de floarea-soarelui: M – markeri moleculari; C – control fără ADN.

Analizând rezultatele obținute (Foto.1) asupra grupurilor de genotipuri (liniile paterne homozigote și hibridul F₁), care alcătuiesc hibridii Xenia, Performer, Valentino și Oxana, în rezultatul reacției de amplificare cu perechea de primeri specifici menționați s-a vizualizat prezența produsului de 650 pb la toate genotipurile, excepție fiind doar linia maternă a hibridului Xenia. Date ce ne permit să presupunem că aceste genotipuri posedă gena *Or5*, iar lipsa acestuia la genotipul matern Xenia – că această linie este susceptibilă la rasa E.

Identificarea locusului linkat cu gena *Or5* a fost efectuată și la 11 linii androsterile și 10 hibridi de floarea-soarelui (Foto 2 și 3). Ampliconul de 650 pb a fost obținut la liniile androsterile 1-3, 8-11 și la hibridii Performer, Oxana, Xenia, Turbo, Favorit, Alcazar și Olga.

Rezultatele obținute denotă că liniile și hibridii menționați posedă rezistență la rasa E de lupoaie. La liniile androsterile 4-6 și la hibridii Valentino, Vitalia și Drofa ampliconul de 650 pb se evidențiază slab, iar la linia androsterilă Nr.7 lipsește.

Conform datelor din literatură [2] despre legătura directă dintre genele de rezistență (*Or1* – *Or7*) prezente/absente la specia *Helianthus annuus* L. și la rasele (A – G) de *Orobanche cumana* Wallr., am dedus teoretic susceptibilitatea sau rezistența genotipurilor studiate față de cele șapte rase de lupoaie existente (Tab. 1-3).

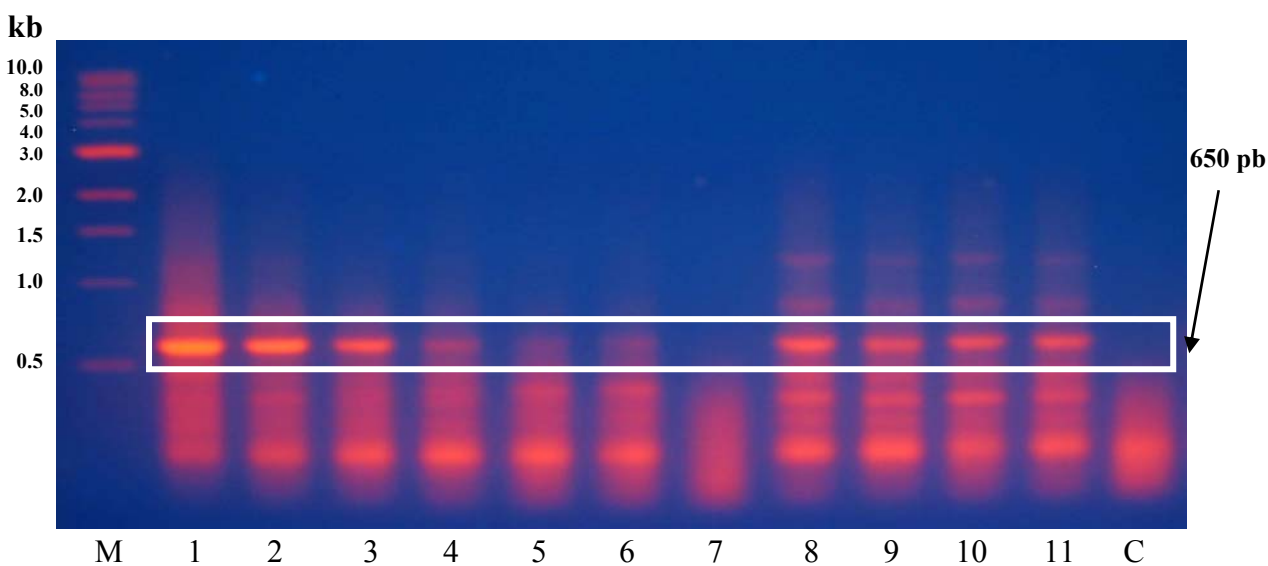


Foto 2. Rezultatele amplificării ADN-ului cu markerul specific SCAR (RTS05) la diferite genotipuri androsterile de floarea-soarelui: M – markeri moleculari; C – control fără ADN; [1-11] – genotipuri androsterile notate cu cifre de la 1 la 11.

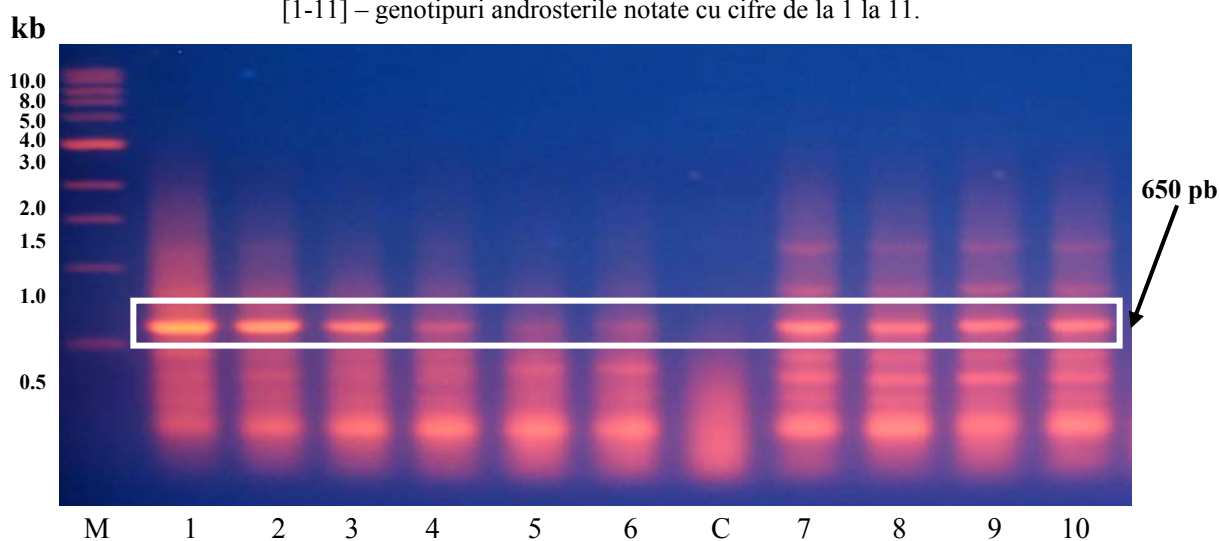


Foto 3. Rezultatele amplificării ADN-ului cu markerul specific SCAR (RTS05) la diferiți hibridi de floarea-soarelui: M – markeri moleculari, C – control fără ADN, 1 – Performer, 2 – Oxana, 3 – Xenia, 4 – Valentino, 5 – Vitalia, 6 – Drofa, 7 – Turbo, 8 – Favorit, 9 – Alcazar, 10 – Olga.

Din Tabelul 1 reiese că, cu excepția genotipului matern Xenia, toate celelalte forme parentale și hibridi teoretic posedă rezistență la rasele A – E, fiind, probabil, susceptibile la rasele F și G. Întrucât genotipul Xenia ♀ nu a prezentat produsul de amplificare 650 pb, reiese că acest genotip este susceptibil la rasele E – G. Totodată, rămâne neclară susceptibilitatea sau rezistența lui față de rasele A – D.

Tabelul 1

Reprezentarea schematică a rezistenței genotipurilor în cadrul a patru familii de floarea-soarelui la rasele de lupoaie A–G

Nr. d/o	Genotipul	Prezența (+), absența (-) ampliconului 650 pb	Rasele de lupoaie						
			A	B	C	D	E	F	G
1	Performer ♀	+	R	R	R	R	R	?	?
2	Performer ♂	+	R	R	R	R	R	?	?
3	Performer F1	+	R	R	R	R	R	?	?
4	Oxana ♀	+	R	R	R	R	R	?	?
5	Oxana ♂	+	R	R	R	R	R	?	?
6	Oxana F1	+	R	R	R	R	R	?	?
7	Xenia ♀	-	?	?	?	?	S	S	S
8	Xenia ♂	+	R	R	R	R	R	?	?
9	Xenia F1	+	R	R	R	R	R	?	?
10	Valentino ♀	+	R	R	R	R	R	?	?
11	Valentino ♂	+	R	R	R	R	R	?	?
12	Valentino F1	+	R	R	R	R	R	?	?

Cercetările efectuate asupra celor 11 genotipuri ce posedă androsterilitate citoplasmatică au permis de a constata că genotipul Nr.7 la care nu a fost identificat locusul învecinat cu gena *Or5* este susceptibil la rasele E – G, fără a putea indica rezistență sau susceptibilitate față de rasele A – D de *Orobanche cumana*. Celelalte zece genotipuri se caracterizează prin prezența ampliconului 650 pb și, respectiv, pot fi considerate rezistente la toate rasele, cu excepția F și G (Tab.2).

Studiul produsului de amplificare (650 pb) la hibridi a demonstrat prezența acestuia la toate cele zece genotipuri heterozigote, astfel că ei posedă, probabil, rezistență la rasele A – E (Tab.3)

Tabelul 2

Reprezentarea schematică a rezistenței genotipurilor androsterile de floarea-soarelui la rasele de lupoaie A–G

Genotipuri androsterile	Prezența (+), absența (-) ampliconului 650 pb	Rasele de lupoaie						
		A	B	C	D	E	F	G
Nr. 1	+	R	R	R	R	R	?	?
Nr. 2	+	R	R	R	R	R	?	?
Nr. 3	+	R	R	R	R	R	?	?
Nr. 4	+	R	R	R	R	R	?	?
Nr. 5	+	R	R	R	R	R	?	?
Nr. 6	+	R	R	R	R	R	?	?
Nr. 7	-	?	?	?	?	S	S	S
Nr. 8	+	R	R	R	R	R	?	?
Nr. 9	+	R	R	R	R	R	?	?
Nr. 10	+	R	R	R	R	R	?	?
Nr. 11	+	R	R	R	R	R	?	?

Tabelul 3

Reprezentarea schematică a rezistenței diferitelor genotipuri heterozigote de floarea-soarelui la rasele de lupoai A–G

Nr. d/o	Hibridul	Prezența (+), absența (-) ampliconului 650 pb	Rasele de lupoai						
			A	B	C	D	E	F	G
1	Performer	+	R	R	R	R	R	?	?
2	Oxana	+	R	R	R	R	R	?	?
3	Xenia	+	R	R	R	R	R	?	?
4	Valentino	+	R	R	R	R	R	?	?
5	Vitalia	+	R	R	R	R	R	?	?
6	Drofa	+	R	R	R	R	R	?	?
7	Turbo	+	R	R	R	R	R	?	?
8	Favorit	+	R	R	R	R	R	?	?
9	Alkazar	+	R	R	R	R	R	?	?
10	Olga	+	R	R	R	R	R	?	?

Conform datelor din literatură, hibridul comercial Turbo (România) rezistent la rasa E este susceptibil la noua rasă F [9]. Datele obținute de noi au demonstrat prezența ampliconului de 650 pb la acest hibrid, confirmând prezența genei *Or5* ce determină rezistența la rasa E de lupoai.

Concluzii

1. Prezența ampliconului de 650 pb la genotipurile studiate presupune prezența genei *Or5* ce conferă rezistență la rasa E de lupoai.
2. Lipsa ampliconului la genotipul matern Xenia și la linia androsterilă Nr.7 ne permite să presupunem că aceste două genotipuri sunt susceptibile la atacul lupoaii (rasele E – G).
3. Studiul în baza rezultatelor obținute și a celor deja existente despre legătura directă a genelor de rezistență (*Or1 – Or7*) prezente/absente la specia *Helianthus annuus* L. cu rasele (A – G) de *Orobanche cumana* Wallr. ne dă posibilitatea de a deduce susceptibilitatea sau rezistența genotipurilor analizate față de diferite rase de lupoai.

Referințe:

1. Parker C. The present state of the *Orobanche* problem // In Biology and management of *Orobanche*. Proceedings of the third Interactional workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. - Amsterdam: Edited by S.J. Borg. Royal Tropical Institute, 1994, p.17-26.
2. Vrânceanu A.V., Pirova N., Stoescu F.M., Pacureanu M. Some aspects of the interaction *Helianthus annuus* L./*Orobanche cumana* Wallr., and its implication in sunflower breeding. - In: Proceedings of a workshop on biology and control of *Orobanche* / Edited by S.J. Borg. Landbouwhogeschool, Wageningen, The Netherlands, 1986, p.181-189.
3. Vrânceanu A.V., Tudor V.A., Stoescu F.M., Pirvu N. Virulence groups of *Orobanche cumana* Wallr., differential hosts and resistance sources and genes in sunflower. - In: Proceedings of the 9th International sunflower conference. Torremolinos, Spain. - 1980. - Vol.1. - P.74-82.
4. Melero-Vara J.M., Dominguez J., Fernandez-Martinez J.M. Evaluation of different lines in a collection of sunflower parental lines for resistance to broomrape (*Orobanche cernua*) in Spain // Plant Breed. - 1989. - Vol.102. - P.22-326.
5. Bulbul A., Salihoglu M., Sari C., Aydin A. Determination of broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) races of sunflower in the Thrace region of Turkey // Helia. - 1991. - Vol.14.- P.21-26.
6. Saverdra del Rio R.M., Fernandez-Martinez J.M. and Melero-Vara J.M. Virulence of populations of *Orobanche cernua* Loeffl. Attacking sunflower in Spain. - In: A.H. Pieterse et al. (ed) Biology and management of *Orobanche*. Proc. 3rd Int. Work-shop on *Orobanche* and *Striga* Research. - Amsterdam, The Netherlands. Royal Tropical Inst., 8-12 Nov., 1994, p.139-141.
7. Shindrova P. Distribution and race composition of *Orobanche cumana* Wallr. in Bulgaria. - In: A.H. Pieterse et al. (ed). Biology and management of *Orobanche*. Proc. 3rd Int. Work-shop on *Orobanche* and *Striga* Research. - Amsterdam, The Netherlands. Royal Tropical Inst., 8-12 Nov., 1994, p.142-145.
8. Dominguez J., Melero-Vera J.M., Refoyo A. Virulence groups of *Orobanche cernua* in Andalusia (Southern Spain). - In: Advances in Parasitic Plant Research, Sixth Intern. Parasitic Weed Sym. - Cordoba, Spain., 1996, p.633-637.

9. Fernandez-Martinez J., Melero-Vara J., Munoz-Ruz J., Ruso J., Dominguez J. Selection of wild and cultivated sunflower for resistance to new broomrape race that overcomes resistance of the *Or5* gene // Crop Sci. - 2000. - Vol.40. - P.550-555.
10. Sukno S.A., Melero-Vara J.M., Fernandez-Martinez J.M. Inheritance of resistance to *Orobanche cernua* Loefl. In six sunflower lines // Crop Sci. - 1999. - Vol.39. - P.674-678.
11. Skoric D. Uljarstvo. Published by the Business Association of Vegetable Oil and Fat Producers of Yugoslavia. - 1988. - P.40-45.
12. Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.L., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucleic Acids Res. - 1990. - Vol.18. - P.6531-6535.
13. Michelmore R.M., Paran I., Kesseli R.V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. - 1991. - Vol.88. - P.9828-9832.
14. Barua U.M., Chalmers K.J., Hackett C.A., Thomas W.T., Powell W., Waung R. Identification of molecular markers linked to a *Rhynchosporium secalis* resistance locus in barley using near-isogenic lines and bulked segregant analysis // Heredity. - 1993. - Vol.71. - P.177-184.
15. Borovkova I.G., Jin Y., Steffenson B.J., Kilian A., Blake T.K., Kleinhofs A. Identification and mapping of a least rust resistance gene in barley line Q21861 // Genome. - 1997. - Vol.40. - P.236-241.
16. Gentzbittel L., Vear F., Zhahg Y.X., Berville A., Nicolas P. Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower *Helianthus annuus* L. // Theor. Appl. Genet. - 1995. - Vol.90. - P.1079-1086.
17. Mouzeyar S., Roeckel-Drevet P., Gentzbittel L., Philippon J., Delabrouhe D.T., Vear F., Nicolas P. RFLP and RAPD mapping of the sunflower *P11* locus for resistance to *Plasmopara halstedii* race 1 // Theor. Appl. Genet. - 1995. - Vol.91. - P.733-737.
18. Roeckel-Devert P., Gagne G., Mouzeyar S., Gentzbittel L., Philippon J., Nicolas P., Tournvieille D., Vear F. Colocation of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) resistance genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Euphytica. - 1996. - Vol.91. - P.255-228.
19. Vear F., Gentzbittel L., Philippon J., Mouzeyar S., Mestries E., Roeckel-Devert P., Nicolas P., Tournvieille D. The genetics of resistance to five races of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Theor. Appl. Genet. - 1997. - Vol.95. - P.584-589.
20. Chomczynski P., Wilfinger W., Mackey K. Isolation of genomic DNA from human, animal and plant samples with DNazol reagents // Biotechnology International. - P.185-188.
21. Pogorletsky P.K., Geshele E.E. Sunflower immunity to broomrape and rust. - In: Proceedings of the 7th International Sunflower Conference, 27 June-3 July, Krasnodar, Russia, 1976, p.238-243.
22. Ish-Shalom-Gordon N., Jacobson R., Cohen Y. Inheritance of resistance to *Orobanche cumana* in sunflower // Phytopathology. - 1993. - Vol.83. - P.1250-1252.
23. Ramaiah K.V. Control of *Striga* and *Orobanche* species – a review. – In: Weber H.C., Forestreuter W (eds) Parasitic flowering plants. Proc. 4th Int. Symp. Parasitic Flowering Plants. - Philip University, Marburg-Lahn, Germany, 1987, p.637-664.
24. Kirichenco V.V., Dolgova E.M., Aladina Z.K. Virulence of broomrape isolates and the inheritance of resistance // Plant Breed Abstr. - 1987. - Vol.57. - P.1392.
25. Labrousse P., Arnaud M-C., Grivaud Y., Fer A., Thalouarn P. Analysis of resistance criteria of sunflower recombined inbred lines against *Orobanche cumana* Wallr. // Crop Protection. - 2004. - Vol.23. - P.13-407.
26. Perez-Vich B., Akhtouch B., Knapp S.J. Quantitative trait loci for broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) resistance in sunflower // Theor. Appl. Genet. - 2004. - Vol.109. - P.92-102.
27. Lu Y. H., Melero-Vera J.M., Tereda J.M., Blanchard P.H. Development of SCAR markers linked to broomrape *Orobanche cumana* Wallr. resistance gene *Or5* in sunflower // Theor. Appl. Genet. - 2000. - Vol.100. - P.625-632.
28. Tang S. Yu J-K., Slabaugh M.B., Shintani D.K., Knapp S.J. Simple sequence repeat map of the sunflower genome // Theor. Appl. Genet. - 2002. - Vol.105. - P.1124-1136.

Notă: Lucrarea a fost îndeplinită cu suportul CRDF/MRDAS, grantul BPG (Business Partnership Grant), Programul STEP (Science & Entrepreneurship Program) Award # BPP-04-06 și, de asemenea, în cadrul Proiectului instituțional 06.407.026 F.

Prezentat la 08.02.2008