

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова

Біологічний факультет

Кафедра генетики та молекулярної біології

Дипломна робота

бакалавра

на тему: **«Маркери гена *AHAS1* для ідентифікації вихідного генетичного матеріалу в селекції соняшнику на стійкість до гербіцидів»**

«Markers of gene *AHAS1* for identification of the original genetic material in the selection of sunflower for resistance to herbicides»

Виконав: студент денної форми навчання
напряму підготовки 6.040102 Біологія
Афіногенов Олександр Анатолійович

Науковий керівник:

д. б. н., с. н. с., член-кор. НААН України,
Чеботар Сабіна Віталіївна

Рецензент:

к. б. н., доцент
Ліманська Наталія Вікторівна

Рекомендовано до захисту:
Протокол засідання кафедри
№ _____ від «__» _____ р.

Завідувач кафедри
_____ **Чеботар С. В.**
(підпис) (прізвище та ініціали)

Захищено на засіданні ЕК № 2
Протокол № _____ від «__» _____ р.
Оцінка _____ / _____ / _____ (за
національною шкалою/ шкалою ECTS/бал)

Голова ЕК
_____ **Стойловський В.П.**
(підпис) (прізвище та ініціали)

Одеса – 2017

Анотація

Досліджено лінії соняшника різноманітного походження, які використовуються в селекційних програмах створення стійких до гербіцидів генотипів. Виявлено маркерні алелі мікросателітних локусів, локалізованих в межах послідовності мутантного гена *AHAS1*, асоційованого зі стійкістю до гербіцидів, які інгібують ключовий фермент синтезу амінокислотних ланцюгів. Диференційовані лінії-донори стійкості до імідазолінонових та сульфонілсечовинних гербіцидів за маркерними мікросателітними алелями. Запропоновано використання отриманих ДНК-маркерів в процесі добору зразків з гібридних популяцій, в яких донорами стійкості будуть слугувати лінії Sumo-1, Sumo-2, IMISUN-4 та SURES-1. Загальний обсяг роботи складається з тридцяти дев'яти сторінок, містить одну таблицю та чотири рисунки. Використано 38 джерел літератури (20 кирилицею і 18 латиницею).

Ключові слова: соняшник, гербіциди, стійкість, ДНК-маркери, ген *AHAS1*

Different origin sunflower lines that are used in breeding programs aimed on creating of herbicide-resistant genotypes were investigated. Microsatellite marker alleles from *AHAS1* mutant gene that associated with resistance to AHAS-inhibiting herbicides were identified. Microsatellite markers allow to differ imidasolinone- and sulfonylurea-resistant lines. Markers are proposed for selecting of samples from hybrid populations in that Sumo-1, Sumo-2, IMISUN-4 and SURES-1 would be used as resistance donor lines. The total volume of work consists thirty-nine pages, also consists one table and four figures. Used 38 sources of literature (Cyrillic 20 and 18 Latin).

Key words: sunflower, herbicides, resistance, DNA markers, *AHAS1* gene

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1. Відкриття гербіцидів сульфонілсечовинної та імідазолінонової природи.....	6
1.2. Вплив бур'янів на врожай.....	8
1.3. Системи боротьби з бур'янами.....	9
1.4. Дія гербіцидів на бур'яни.....	13
1.5. Гени сімейства <i>AHAS</i> і їх продукт.....	14
1.6. Мутації в гені <i>AHAS</i>	19
1.7. Інгібітори синтезу амінокислот.....	22
1.8. Створення гібридів українською селекції стійких до гербіцидів.....	26
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	28
2.1. Матеріал для дослідження.....	28
2.2. Метод виділення ДНК з паростків.....	28
2.3. ПЛР-аналіз гену <i>AHAS1</i>	29
2.4. Метод електрофорезу в поліакриламідному гелі.....	29
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	31
ВИСНОВКИ.....	36
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	37

ВСТУП

Соняшник однорічний, або олійний (*Helianthus annuus* L.) – основна олійна культура в нашій країні. За даними ФАО, світова площа його посівів становить понад 14,5 млн. га. Посіви соняшнику в Україні займають понад 2 млн. га, що становить 96 % площі всіх олійних культур. Середня його врожайність в останні роки становила 16 – 18 ц/га [9]. Оскільки рослинні олії необхідні всім галузям народного господарства і можуть бути надійним джерелом валютних надходжень, то Україна, як один з найбільших виробників соняшникового насіння у світі, потребує зростання випуску конкурентоздатної продукції. Основними факторами, що дестабілізують його виробництво в країні, є значна забур'яненість посівів, ураженість культури грибними хворобами, несприятливі погодні умови і чутливість до деяких гербіцидів [1, 2, 3]. Беручи до уваги високу ефективність і низьку токсичність, гербіциди імідазолінової та сульфонілсечовинної груп придатні для сільськогосподарського застосування. Однак можливість застосовувати ці гербіциди у конкретній системі рослинництва залежить від доступності стійких сортів цікавлячої дослідників сільськогосподарської культури. Для отримання таких стійких сортів селекціонерам необхідно розробляти певні генетичні лінії з ознаками стійкості. Тому особливим напрямком у сучасній селекції є створення гібридів соняшнику, стійких до цих післясходових гербіцидів.

Основною метою нашого дослідження була ідентифікація маркерних алелів гену *AHAS1* у генотипів соняшника, які використовуються в селекції на стійкість до гербіцидів імідазолінової та сульфонілсечовинної груп.

Для досягнення вказаної мети вирішували такі задачі:

1. Диференціювати лінії соняшника за маркерними алелями мікросателітного локусу, що присутній у послідовності гена *AHAS1* стійкості до гербіцидів імідазолінової та сульфонілсечовинної груп.
1. Запропонувати ДНК-маркери для добору стійких до гербіцидів зразків

з гібридних популяцій соняшника.

2. Визначити чи відрізняються лінії одеської селекції ОС1011 і ОС1013 за алелями маркерного мікросателітного локусу від ліній соняшника, що є стійкими до гербіцидів вказаних груп.

Об'єкт дослідження – генетичний поліморфізм за геном *AHAS1* у вихідному матеріалі, що використовується в селекції соняшнику на стійкість до гербіцидів.

Предмет дослідження – алелі гену *AHAS1* в гібридах, стійких до гербіцидів.

Щиро вдячний провідному науковому співробітнику відділу Загальної і молекулярної генетики Селекційно-генетичного інституту – НЦНС, кандидату біологічних наук Солоденко Анжелі Євгеновні, за допомогу у проведенні дослідження, а також керівництву СГІ-НЦНС за надання необхідного для виконання досліджень обладнання.

ВИСНОВКИ

3. Лінії-донори стійкості до імідазолінонових та сульфонілсечовинних гербіцидів SURES-1, Sumo-1, Sumo-2, IMISUN-4 диференційовані за маркерними алелями мікросателітного локусу, що детектується з праймерами *pAHAS 16-17* та *pAHAS 18-19*, у послідовності гена *AHAS1*.
4. Запропоновано використання отриманих ДНК-маркерів – алелів *pAHAS 16-17* – 184 п.н., 191 п.н. та *pAHAS 18-19* – 320 п.н., 328 п.н. в процесі добору зразків з гібридних популяцій, в яких донорами стійкості будуть слугувати лінії Sumo-1, Sumo-2, IMISUN-4 та SURES-1.
5. Нестійкі до гербіцидів інбредні лінії одеської селекції ОС1011 і ОС1013 не відрізняються за дослідженими мікросателітними алелями від групи ліній НА 425, RHA 426, RHA 427, НА 442, RHA 443, IMISUN-1, IMISUN-2, IMISUN-3, які є стійкими до імідазолінонових гербіцидів, тому алелі - 176 п.н. за маркером *pAHAS 16-17* та 313 п.н. за маркером *pAHAS 18-19* не можуть бути використані для диференціації стійких та нестійких до імідазолінонових гербіцидів селекційних форм соняшника.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антонова Т.С. Селекция подсолнечника на иммунитет / Т.С. Антонова. – Краснодар, 2003. – 273 с.
2. Бородин С.Г. Биологические особенности грибов на сое и подсолнечнике / С.Г. Бородин, И.А. Котлярова. – Краснодар, 2005. – 86 с.
3. Бурлов В.В. Конкурентоспроможність гібридів соняшнику вітчизняної селекції // Агронамка соняшника. Науково-практичний збірник. – 2014. – Т. 2. – С. 112 – 114.
4. Вальков В. Ф. Почвы Краснодарского края, их использование и охрана / В.Ф. Вальков, Ю.А. Штомпель, И.Т. Трубилин. – Ростов-на-Дону. – 1996. – 191 с.
5. Васильев Д.С. Химические способы борьбы с сорняками на посевах масличных и эфиромасличных культур / Д. С. Васильев. – М.: Колос, 1983. – 236 с.
6. Велецкий И.Н. Технология применения гербицидов / И.Н. Велецкий. – Л.: Агропромиздат. – 1989. – 203 с.
7. Венцлавович Ф.С. Подсолнечник. Культурная флора СССР / Ф.С. Венцлавович. – Л., 1981. – 289 с.
8. Володарский Н.И. О стадийной неоднородности тканей у подсолнечника Н.И. Володарский // Ботанический журнал – М., 1980. – №5. – С. 18 – 23.
9. Воронова О. В борьбе за место под солнцем / О. Воронова // Новый аграрный журнал. – М., 2011. – Вып. № 2 (2). – С. 48–54.
10. Гудзь В. П. Землеробство / В. П Гудзь, І. Д Примак, Ю. В Будьонний., С. П. Танчик. Підручник. 2-ге вид. перероб. та доп. / За ред. В. П. Гудзя. — К.: Центр учбової літератури, 2010. – С. 37–39.

11. *Герасименко Т. П.* Убережемо соняшник від хвороб // Головна державна інспекція рослин, 2011. – 1 – 3с.
12. *Демури́н, Я.Н.* Влияние ALS-ингибиторов на клубеньки зарази́хи у гербицидоустойчивых линий подсолнечника / Я.Н. Демури́н, А.А. Перстенёва // Масличные культуры: Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – Краснодар, 2011. – Вып. № 1 (146–147). – С. 134–138.
13. *Зайцев О.М.* Використання якісного насіння – найшвидший шлях до підвищення ефективності сільськогосподарського виробництва // Пропозиція. – 2002. – № 5. – С. 14.
14. *Захаренко В. А.* Гербициды. – М.: ВО "Агро-промиздат". – 1990. – 415 с.
15. *Зінченко О.І.* Рослинництво / О. І. Зінченко, В. Н. Салатенко, М. А. Білоножко — К.: Аграрна освіта, 2001. – С. 356 – 359.
16. *Зинков Р.* Терминатор "замочит" всех! // АПК Информ. – 2008. – 1 с.
17. *Кириченко В.В.* Селекция и семеноводство подсолнечника (*Helianthus annuus L.*) / Кириченко В.В. [Монография]. – Харьков, 2005. – С. 57 – 68.
18. *Перстенёва А.А.* Наследование устойчивости к имидазолиновым гербицидам у подсолнечника дис. канд. биол. наук. – Краснодар, 2009. – 112 с.
19. *Солоденко А.Є.* Идентификация генотипов подсолнечника украинской селекции с помощью SSRP-маркеров / А. Солоденко, А. Саналатий, Ю. Сиволап // Цитология и генетика. – Т. 40, №4 – 2006. – С. 37 – 43.
20. *Солоденко А.Є.* Система ДНК-маркерів для використання в селекції та насінництві соняшника // А. Солоденко, А. Трояновська, Ю. Сиволап // Геном рослин: збірник наукових статей. – Одеса, 2008. – С. 121 – 124.

21. *Al-Khatib K., J.R. Baumgartner, D.E. Peterson, and R.S. Currie.* Imazethapyr resistance in common sunflower (*Helianthus annuus L.*) // *Weed Sci.* – 1998. – V. 46. – P. 403 – 407.
22. *Al-Khatib K., and J.F. Miller.* Registration of four genetic stocks of sunflower resistant to imidazolinone herbicides // *Crop Sci.* – 2002. – V. 40. – P. 869 – 870.
23. *Alonso L. C., Rodrigues-Ojeda M. I., Fernandez-Escobar.* Chemical control of broomrape in sunflower resistant to imazethapyr herbicide // *Helia.* – 1998. – V. 21. – P. 45 – 54.
24. *Anderson, P. C. and M. Georgeson.* Herbicide-tolerant mutants of corn // *Genome.* – 1989. – V. 34. – P. 994 – 999.
25. *Baumgartner J. R., Al-Khatib K., Currie R.S.* Survey of Common Sunflower (*Helianthus annuus L.*) Resistance to Imazethapyr and Chlorimuron in Northeast Kansas // *Weed Technology.* – 1999. – V.13. – P. 510 – 514.
26. *Bently, A., B. Mac Lennan, J. Calvo, and C.R. Dearolf.* Targeted recovery of mutations in *Drosophila* // *Genetics.* – 2000. – V. 156. – P. 1169 – 1173.
27. *Bernasconi, P., A.R. Woodworth, B.A. Rosen, M.V. Subramanian, and D.L. Siehl.* A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase // *J. Biol. Chem.* – 1995. – 270 p.
28. *Bradford, M.M.* A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1986. – V. 72. – P. 248 – 254.
29. *Bruniard J. M., Miller J. F.* Inheritance of imidazolinone-herbicide resistance in sunflower // *Helia.* – 2001. – V. 24. – P. 11 – 16.
30. *Chipman, D.M., Duggleby, R.G. and Tittmann, K.* Mechanisms of acetohydroxyacid synthases // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2005. – V. 9. – P. 475–481.

31. *Dominguez J., Alvarado J., Espinosa J. L., Falcon M., Mateos A., Navarro F.* Use of sunflower cultivars with resistance to imidazolinone herbicides to control broomrape (*Orobanche cumana*) infection // Proc. 16th International Sunflower Conference. – 2004. – V.1. – P.181 – 186.
32. *Kolkman, J. M., M. B. Slabaugh, J. M. Bruniard, S. Berry, B. S. Bushman, C. Olungu, N. Maes, G. Abratti, A. Zambelli, J. F. Miller, A. Leon, and S. J. Knapp.* Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonyleurea herbicides in sunflower // Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – V. 109 (6). – P. 1147 – 1159.
33. Material safety data sheet – Dupont – Express Herbicide (with – TotalSol soluble granules), 2006. – P.1 – 8.
34. *Miller, J.F. and Al-Khatib, K.* Registration of imidazolinone herbicide-resistant sunflower maintainer (HA425) and fertility restorer (RHA426 and RHA427) germplasms // Crop Science. – 2002. V. 42. – P. 988–989.
35. *Saghai-Marouf M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W.* Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics // PNAS USA. – 1984. – 81. – P. 8014–8018.
36. *Sala C.F., Bulos M., Altieri E., Ramos M.L.* Genetics and breeding of herbicide tolerance in sunflower // Proc. 18th Int. Sunfl. Conf., Mar del Plata, Argentina. – 2012. – P. 75–81.
37. *Tranel P.J., Wright T.R.* Resistance of weeds to ALS inhibiting herbicides: what have we learned? // Weed Science. – 2002. – V. 50. – P. 700 – 712.
38. *White, A.D., Owen, M.D., Hartzler, R.G. and Cardina, J.* Common sunflower resistance to acetolactate-inhibiting herbicides // Weed Sci – 2002. – V. 50. – P. 432–437.