УДК 631.523:633.854.78
DOI 10.25230/ conf13-2025-03-12

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ SNP-МАРКЕРА ГЕНА PL_{ARG}

Бадьянов Е.В., Гучетль С.З.
ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК
badyanov656@mail.ru

Подсолнечник – одна из наиболее значимых масличных культур, возделывание которого значительно затруднено из-за возбудителя ложной мучнистой росы (*Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni). В настоящее время перспективным для использования в селекции является ген Pl_{arg}, обеспечивающий устойчивость ко всем известным расам *P. halstedii*. Определена диагностическая ценность SNP-маркера NSA_006530 на основе гибридологического анализа поколения F_2 в расщепляющейся гибридной популяции ВК-925×RHA-419. Показано сцепленное наследование гена Pl_{arg} с локусом NSA_006530 при генетическом расстоянии по Косамби между исследуемой парой локусов 28,85 сМ. Проведена валидация исследуемого маркера на линиях подсолнечника коллекции ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК.

Ключевые слова: ДНК-маркер, подсолнечник, устойчивость, *Pl*-гены, *Plasmopara halstedii*.

Введение. Подсолнечник (*Helianthus annuus* L.) является пятой по значимости культурой среди масличных культур и второй по гибридным семенам после кукурузы в мире. За последние 10 лет наблюдается постоянный рост мирового производства семян подсолнечника [1]. При этом выращивание подсолнечника часто затруднено в связи с многими факторами, включая биотические (болезни, вредители, птицы и т. д.) и абиотические стрессы (засуха, заболачивание, высокие и низкие температуры). По данным Hussain *et al*. [2], болезни являются причиной среднегодовой потери 12 % мирового производства подсолнечника, что является наиболее ограничивающим фактором для выращивания данной сельскохозяйственной культуры в большинстве регионов.

Ложная мучнистая роса (ЛМР) — одно из наиболее вредоносных заболеваний культурного подсолнечника, вызываемое паразитарным оомицетом *Plasmopara halstedii*

(Farl.) Berl. Et de Toni. Заболевание может привести к значительным потерям урожая (50–95 %) в прохладные и влажные годы и отрицательно повлиять на различные аспекты качества семян [3]. Обработка семян химическими препаратами и генетически обуславливаемая резистентность являются двумя основными методами борьбы с этим заболеванием. Однако широкое использование фунгицидов для борьбы с этим патогеном привело к развитию устойчивых патотипов, которые снизили эффективность химической обработки. Расы *P. halstedii*, толерантные к металаксилу-М, были описаны в Венгрии [4-5], Франции [6], США [7], Испании [8] и Германии [9]. При этом, практика введения в селекционный материал основных доминантных генов устойчивости, обозначенных как *Pl,* широко признана и считается наиболее эффективным и экологически ответственным подходом, что в сочетании с подходящими агрономическими приемами является одной из наиболее предпочтительных стратегий борьбы с ложной мучнистой росой у подсолнечника.

На данный момент перспективным для использования в селекции подсолнечника на устойчивость к ложной мучнистой росе является ген Pl_{arg}. Он является основным локусом *Pl,* который по-прежнему эффективен против всех известных рас *P. halstedii,* включая преодолевшие действие металаксила [10]. Молекулярное маркирование данного гена значительно ускорит создание устойчивого селекционного материала, так как позволит проводить раннюю и точную диагностику носителей гена Pl_{arg} в гибридной популяции. В различных литературных источниках имеются сведения о молекулярных маркерах разных типов, сцепленных с локусом Pl_{arg} [11–14]. Но перед практическим использованием молекулярного маркера в селекции всегда необходима его валидация на своем наборе генотипов. Данное исследование является продолжением комплекса наших работ по оценке диагностической ценности молекулярных маркеров для идентификации гена Pl_{arg}, в рамках которого уже были отобраны микросателлитные маркеры ORS509, ORS662 и ORS822, а также маркер однонуклеотидного полиморфизма NSA_008037 [15, 16, 17].

Материалы и методы. Материалом для исследования являлись растения поколения F_2 гибридной комбинации линий подсолнечника ВК-925×RHA-419. Для выделения ДНК использовали фрагменты зеленых листьев подсолнечника. Экстракцию ДНК проводили с использованием набора для выделения DiamondDNA Plant kit (РФ). Концентрацию ДНК в полученных препаратах определяли на микроспектрофотометре Nano-300 (Allsheng, Китай). Для ПЦР-анализа применили систему праймеров NSA_006530, модифицированных нами для маркирования локуса Pl_{arg}, представленных двумя прямыми аллель-специфичными последовательностями и одной общей обратной последовательностью (F1: CGACTGAGAAACGAACTCCG, F2: CGACTGAGAAACGAACTACA, R: GCATCGCACCATCAAAGGTAA) [18].

Полимеразную цепную реакцию выполняли с использованием коммерческого набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I (Синтол, РФ) в амплификаторе QuantStudio 5 (Thermo Scientific, США). Температурно-временные режимы амплификации были аналогичны использованным Qi с соавт. [18].

Математическую обработку результатов фенотипического и генотипического расщеплений проводили с помощью программного обеспечения F2breed [19].

Результаты и обсуждение. В рамках исследования нами был апробирован и валидирован аллель-специфичный праймер NSA_006530, ассоциированный с соответствующим SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Для определения диагностической ценности данного SNP-маркера нами было проанализировано 102 образца подсолнечника поколения F_2 из комбинации скрещивания ВК-925×RHA-419, где линия ВК-925 является восприимчивой, а линия RHA-419 – носитель гена Pl_{arg}. Для этого проводили ПЦР в реальном времени с указанным SNP-праймером и выявляли наличие аллеля, специфичного для каждого из родительских линий.

Результаты по оценке наследования SNP-локуса NSA_006530 для комбинации ВК-925×RHA-419 представлены в таблице 1. Исследуемый локус показал полное соответствие фактического расщепления ожидаемому соотношению 1:2:1.

Таблица 1. **Наследование SNP-локуса ДНК NSA_006530 в F2 при скрещивании линий ВК-925 и RHA-419**

Локус	Всего растений, шт	Теоретически ожидаемое соотношение	Фактически наблюдаемое соотношение, шт	χ^2	df	P
NSA_006530	97	1:2:1	20:50:27	1,10	2	0,57

Ранее нами уже проводилась фитопатологическая оценка комбинации ВК-925×RHA-419 [20], поэтому в сочетании с ней тест на совместное наследование гена Pl_{arg} с SNP-локусом в потомстве F_2 позволил распределить всех потомков F_2 на 5 классов. Это устойчивые растения, имеющие мутантный аллель, такой же как у линии RHA-419. Устойчивые и восприимчивые растения с аллелем дикого типа, как у линии ВК-925. Устойчивые и восприимчивые растения, имеющие аллели обоих родителей (гетерозиготы). По пяти образцам не было получено отжига праймера на матрице ДНК, поэтому они были исключены из исследования (табл. 2).

Значение χ^2 между геном Pl_{arg} и SNP-локусом в поколении F_2 для гибридной комбинации ВК-925×RHA-419 показано в таблице 3. Тест на совместное наследование показал сцепленное наследование гена Pl_{arg} с локусом ДНК NSA_006530, несмотря на некоторое несоответствие теоретически ожидаемого соотношения фактическому, что возможно объяснить расположением гена устойчивости в области искажения сегрегации. Подобное явление наблюдается в 7–13 % случаев при внутривидовых скрещиваниях, а в литературе описаны многочисленные примеры такого искажения расщепления [21, 22].

Таблица 2. **Распределение на классы потомков F2 комбинации ВК-925×RHA-419 по SNP-локусу NSA_006530**

Фенотип	Генотип по SNP	Число растений, шт.	Нет отжига праймера у растений, шт.	Всего растений, шт.
Устойчивые	RHA419	20	5	102
	ВК925	17		
	гетерозигота	46		
Восприимчивые	ВК925	10		
	гетерозигота	4		

Таблица 3. **Значение χ^2 между геном Pl_{arg} и NSA_006530 в потомстве F_2 (ВК-925×RHA-419)**

Пара локусов	Всего растений, шт	Фактически наблюдаемое соотношение, шт	Теоретически ожидаемое соотношение	χ^2	df	P
Pl_{arg}– NSA_006530	97	20:46:17:0:4:10	3:6:3:1:2:1	16,8	5	< 0,01

Была выполнена оценка частоты рекомбинации между парой локусов Pl_{arg}– NSA_006530. Значение частоты рекомбинации и расстояние по Косамби, представленные в таблице 4, подтвердили сцепление этих локусов. Генетическое расстояние между парой локусов Pl_{arg} – NSA_006530 составило 28,85 см (табл. 4).

Таблица 4. **Значения частот рекомбинации между геном Pl_{arg} и локусом NSA_006530 в потомстве F_2 (ВК-925 × RHA-419)**

Пара локусов	r	к	χ^2	df	P
Pl_{arg}– NSA_008037	0,26	28,85	10	2	< 0,01

Примечание. r – частота рекомбинации, k – генетическое расстояние по Косамби (в сМ)

Также данный маркер был дополнительно валидирован на 54 линиях коллекции ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, включая устойчивые к смеси рас (330, 334, 337, 710, 713, 730 и 734) *P. halstedii.* Ни у одной из линий подсолнечника коллекции ВНИИМК не выявлено SNP-маркера гена Pl_{arg}, что полностью согласуется с результатами анализа по микросателлитным локусам и фитопатологической оценки данных образцов.

Заключение. Полученные результаты позволяют объединить исследованный SNP-маркер SNA_006530 с изученными нами ранее микросателлитными маркерами гена Pl_{arg} и SNP-маркером SNA_008037 в единую систему, которую возможно использовать в программах МАС (маркер-ассоциированная селекция) для ускорения и облегчения работ по созданию нового селекционного материала устойчивого к разным расам возбудителя ложной мучнистой росы.

Литература

1. FAOSTAT. 2021. Statistical division. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available from https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL (retrieved on 7th October, 2024).

2. Hussain M., Farooq S., Hasan W. et al. Drought stress in sunflower: Physiological effects and its management through breeding and agronomic alternatives // Agricultural Water Management. – 2018. – V. 201. – P. 152–166. doi: 10.1016/j.agwat.2018.01.028.

3. Molinero-Ruiz M.L., Melero-Vara J.M., Dominguez J. Inheritance of resistance to two races of sunflower downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in two *Helianthus annuus L*. lines // Euphytica. – 2003. – V. 131. – P. 47–51. doi: 10.1023/A:1023063726185.

4. Oros G., Virányi F. Resistance of *Plasmopara halstedii* to metalaxyl in the greenhouse // Temp. Downy Mildew Newsl. – 1984. – V. 3. – P. 22–23.

5. Korosi K., Kovacs A., Nisha N. et al. New data on pathotype distribution and mefenoxam tolerance of *Plasmopara halstedii* in Hungary // Plant Prot. Sci. – 2021. – V. 57. – P. 31–37. doi: 10.17221/73/2020-PPS. doi: 10.17221/73/2020-PPS.

6. Lafon S., Penaud A., Walser P. et al. Le mildiou du tournesol toujours sous surveillance // Phytoma-La Défense Des Végétaux. – 1996. – V. 484. – P. 35–36.

7. Gulya T.J., Draper M., Harbour J. et al. Metalaxyl resistance in sunflower downy mildew in North America // In Proceedings of the 21st NSA Sunflower Research. – Workshop, Fargo, ND, USA, 14–15 January 1999. – National Sunflower Association, Ed. – P. 118–123.

8. Molinero-Ruiz M. L., Domínguez J., Melero-Vara J. M. Races of isolates of *Plasmopara halstedii* from Spain and studies on their virulence // Plant Dis. – 2002. – V. 86. – P. 736–740. doi: 10.1094/PDIS.2002.86.7.736.

9. Spring O., Bachofer M., Thines M. et al. Intraspecific relationship of *Plasmopara halstedii* isolates differing in pathogenicity and geographic origin based on ITS sequence data // Eur. J. Plant Pathol. – 2006. – V. 114. – P. 309–315. doi: 10.1007/s10658-005-5996-9.

10. Brahm L., Hahn V., Röcher T., Friedt W. Molecular markers as a tool in breeding for resistance against sunflower downy mildew // In: Proceedings of the 15th international sunflower conference, Toulouse, France. – 2000. – 12–15 June. – P. 143–148.

11. 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. – № 105. – P. 1124–1136. doi: 10.1007/s00122-002-0989-y.

12. Imerovski I., Dimitrijevic D., Miladinovic A. et al. Identification and validation of breeder-friendly DNA markers for Pl_{arg} gene in sunflower // Molecular Breeding. – 2014. – V. 34 (3). – P. 779–788. doi: 10.1007/s11032-014-0074-7.

13. Solodenko A. Validation of Microsatellite Markers of *Pl* Resistance Genes to Downy Mildew of Sunflower // Helia. – 2018. – V. 41 (68). – P. 73–82. doi: 10.1515/helia-2017-0026.

14. Qi L.L., Ma G., Talukder Z.I. et al. Molecular mapping of the disease resistance gene and its impact on sunflower breeding // In Proceedings of the 19th Intetnational Sunflower Conference. ISA, Edirne. – 2016 (b). – P. 20–30.

15. Бадьянов Е.В., Рамазанова С.А., Гучетль С.З. Использование молекулярных маркеров для идентификации генов устойчивости к ложной мучнистой росе у подсолнечника // Защита растений от вредных организмов: Материалы XI международной научно-практической конференции. – Краснодар: изд-во Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, 2023. – С. 27–30.

16. Бадьянов Е.В., Рамазанова С.А., Гучетль С.З. Маркеры генов устойчивости к *P. halstedii* у подсолнечника селекции ВНИИМК // Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки сельскохозяйственных культур: Сборник материалов 12-й Международной конференции молодых учёных и специалистов. – Краснодар: изд-во Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта», 2023. – С. 15–19. doi: 10.25230/conf12-2023-15-19.

17. Бадьянов Е.В. Апробирование SNP-маркера гена Pl_{arg}, контролирующего устойчивость подсолнечника к *Plasmopara halstedii* // Актуальные проблемы науки и практики в исследованиях молодых ученых: Сборник материалов I-й Международной научно-практической конференции. – Новосибирск: ИЦ НГАУ «Золотой колос», 2024. – С. 120–124.

18. Qi L.L., Talukder Z.I., Hulke B.S., Foley M.E. Development and dissection of diagnostic SNP markers for the downy mildew resistance genes Pl_{Arg} and Pl_8 and maker-assisted gene pyramiding in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Mol. Genet. Genomics. – 2017. – V. 292. – P. 551–563. doi: 10.1007/s00438-017-1290-8.

19. Жернаков А.И., Кулаева О.А., Жуков В.А. F2breed – новая программа для построения генетических карт при анализе наследования в популяции поколения F_2 // Генетика. – 2018. – Т. 54. – № 1. – С. 117–121. doi: 10.7868/S0016675818010149.

20. Рамазанова С.А., Бадьянов Е.В., Савиченко В.Г., Гучетль С.З., Стрельников Е.А. Оценка сцепления гена Pl_{arg}, контролирующего устойчивость к ложной мучнистой росе у подсолнечника, и микросателлитных локусов ДНК // Масличные культуры. – 2022. – № 3 (191). – С. 14–23. doi: 10.25230/2412-608X-2022-3-191-14-23.

21. Dußle C.M., Hahn V., Knapp S.J., Bauer, E. Pl_{arg} from *Helianthus argophyllus* is unlinked to other known downy mildew resistance genes in sunflower // Theor. Appl. Genet. – 2004. – V. 109. – P. 1083–1086. doi: 10.1007/s00122-004-1722-9.

22. Imerovski I., Dimitrijevic A., Miladinovic D. et al. Mapping of a new gene for resistance to broomrape races higher than F // Euphytica. – 2016. – V. 209. – P. 281–289. doi: 10.1007/s10681-015-1597-7.

DETERMINATION OF THE DIAGNOSTIC VALUE OF SNP-MARKER OF A GEN PL_{ARG}

Badyanov E.V., Guchetl S.Z.

Sunflower is one of the most important oil crops, the cultivation of which is hampered significantly by the pathogen of downy mildew (Plasmopara halstedii (Farl.) Berl. et de Toni). Currently, the gen Plarg responsible for resistance to all known races of P. halstedii is promising for breeding. The diagnostic value of SNP-marker NSA_006530 is determined basing on the hybrid analysis of F2 in a segregating hybrid population ВК-925 × RHA-419. The genetic distance by Kosambi between studied pair of loci 28.85 cM showed the linked inheritance of the gene Plarg and a locus NSA_006530. The studied marker was validated on sunflower lines from a collection of the V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops.

Key words: DNA-marker, sunflower, resistance, Pl-gens, Plasmopara halstedii.