



УДК 631.523:633.854.78
DOI 10.25230/conf12-2023-15-19

МАРКЕРЫ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К *P. HALSTEDII* У ПОДСОЛНЕЧНИКА СЕЛЕКЦИИ ВНИИМК

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

Одной из самых вредоносных болезней подсолнечника является ложная мучнистая роса, вызываемая оомицетом *Plasmopara halstedii*. Введение доминантных генов устойчивости к этому патогену в растение-хозяин является самым эффективным, экономичным и экологичным методом контроля возбудителя болезни. На линиях и селекционных образцах апробированы известные из литературных источников микросателлитные маркеры генов *Pl₆*, *Pl₈* и *Pl_{arg}*. Четыре изученных молекулярных маркера – ORS328 (локус *Pl₆*), ORS509, ORS662 и ORS822 (локус *Pl_{arg}*), позволили идентифицировать указанные гены в линиях и селекционных образцах ВНИИМК. Перспективными для дальнейшего изучения признаны маркеры ORS316, ORS707 и ORS799 (локус *Pl₈*). Изученные ДНК-маркеры могут представлять особый интерес в маркер-ассоциированной селекции подсолнечника на устойчивость к возбудителю ложной мучнистой росы.

Ключевые слова: подсолнечник, *Plasmopara halstedii*, расы, гены устойчивости, микросателлитные маркеры, MAS.

Введение. Подсолнечник является экономически значимой масличной культурой, возделываемой в России. Поскольку подсолнечное масло является одним из самых полезных растительных масел доступных для приготовления пищи, спрос на него растет ввиду повышенного тренда на здоровое питание [1]. Как и для других культур, производству подсолнечника часто препятствуют различные факторы, среди которых болезни, вредители, засуха и многие другие. Ложная мучнистая роса (ЛМР), вызываемая оомицетом *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berlese & de Toni, является одним из наиболее серьезных биотических факторов, влияющих на производство подсолнечника во всем мире.

Для борьбы с этим заболеванием применяют различные методы, включающие как агротехнические, так и химические приемы защиты. Наиболее экологичная стратегия предотвращения потерь урожая подсолнечника, вызванных патогеном, заключается в поиске новых генов устойчивости и введение их в селекционный материал.

Plasmopara halstedii имеет несколько патотипов (или рас) с разной степенью вирулентности, возникновение которых постоянно происходит по всему миру и даже ускорилось в последнее десятилетие [2, 3]. Всего в мире насчитывается до 50 патотипов *P. halstedii* [4–6] а у подсолнечника идентифицировано 36 основных генов *Pl*, расположенных в пяти группах сцепления (LG 1, 2, 4, 8 и 13) [7, 8] и три QTL, расположенных в LG7, LG10 и LG8 [9, 10]. До начала 2000-х годов устойчивость ко многим расам в большинстве случаев определялась одним доминантным геном, что широко использовали в селекции на устойчивость по всему миру. Одна из основных причин, по которой такая резистентность часто оказывается неэффективной является следствием быстрых генетических изменений в популяциях возбудителя ЛМР. Некоторые из генов *Pl*, которые широко применяли для борьбы с данным заболеванием у подсолнечника в начале XXI столетия, уже оказались неэффективными против новых рас *P. halstedii* [3, 11, 12]. Поэтому необходимо использовать различные источники генов устойчивости и создавать сорта и гибриды с комбинациями двух



или более эффективных генов *Pl*. Разработка и валидация высокопроизводительных диагностических ДНК-маркеров, связанных с генами *Pl*, будет способствовать селекции с помощью маркеров (MAS), особенно для отбора генотипов с комплексной устойчивостью к ложной мучнистой росе. В настоящем обзоре резюмируются результаты исследований данного вопроса в ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК за последние два года.

Материалы и методы. Объектом исследования служили 196 образцов подсолнечника, включающие как линии и образцы селекции ВНИИМК, так и линии дифференциаторы устойчивости подсолнечника, входящие в стандартный международный тест-набор для идентификации рас *P. halstedii*. Кроме того, валидацию молекулярных маркеров ORS662, ORS509 и ORS822 дополнительно проводили на гибридных комбинациях линий подсолнечника RHA419 × BK776 и RHA419 × BK925.

Фитопатологическая оценка всех линий и селекционных образцов подсолнечника проводилась в лабораторных условиях совместно с сотрудниками лаборатории иммунитета ВНИИМК методом искусственного заражения проростков зооспорами оомицета [13]. Образцы оценивались на устойчивость к расам 330, 334, 337, 710, 730 и 737.

Для выделения ДНК использовали фрагменты зеленых листьев подсолнечника. Экстракцию ДНК проводили с использованием набора для выделения геномной ДНК (DiamondDNA Plant kit, РФ). Концентрацию ДНК в полученных препаратах определяли визуально по интенсивности свечения пробы объемом 10 мкл в ультрафиолетовом свете в 1 %-ном агарозном геле с добавлением 2 мкл бромистого этидия.

Для ПЦР-анализа применили 17 SSR-праймеров, разработанных для маркирования локуса *Pl_{arg}*, 15 для локуса *Pl₅/Pl₈*, 1 для локуса *Pl₆* [14, 15]. Полимеразную цепную реакцию выполняли в реакционной смеси объемом 25 мкл следующего состава: 67 мМ трис-НСl, рН 8,8; 16,6 мМ сульфата аммония; 1,5– 3,0 мМ MgCl₂; 0,01 % Tween 20; 200 мМ dNTP; по 0,5 мМ каждого праймера; 10 нг геномной ДНК и 1 ед. рекомбинантной термостабильной ДНК полимеразы (НПО «Сибэнзим», РФ). Амплификацию ДНК проводили в термоциклере MiniAmp Plus (Thermo Fisher Scientific, США). Температуру отжига подбирали в соответствии с нуклеотидной последовательностью праймеров.

Электрофорез продуктов амплификации проводили в 2 %-ном агарозном и 8 %-ном полиакриламидном гелях. Использовали камеры SE-20 и VE-20 для горизонтального и вертикального электрофореза соответственно (Хеликон, Россия). Результаты электрофореза документировали при помощи гельдокументирующей видеосистемы BIOPRINT (Vilber Lourmat, Франция). Размер фрагментов ДНК определяли с использованием программного обеспечения BioCapture (Vilber Lourmat, Франция) относительно маркера длины фрагментов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder Thermo Scientific (Сибэнзим, Россия).

Результаты и обсуждение. В настоящее время перспективными для использования в селекции являются локусы *Pl₆*, *Pl₈* и *Pl_{arg}*, в комплексе обеспечивающие устойчивость ко всем известным расам *P. halstedii* [7, 16–18]. Ранее нами уже проводились исследования по идентификации локуса *Pl₆*, однако из шести изученных микросателлитных маркеров, картированных в группе сцепления LG8, лишь один STS-маркер HaP3 показал свою пригодность для идентификации данного локуса [19]. Поэтому мы дополнительно использовали SSR-локус ORS328, картированный в этой же группе сцепления, и изучили его генетический полиморфизм. У линии Ha335, в которую этот ген был интродуцирован из дикорастущего вида *H. annuus* [20], выявлена фракция длиной 271 п.н. Валидация этого маркера на 77 селекционных образцах с разной устойчивостью позволяет предположить, что он пригоден для маркирования локуса *Pl₆* [21].

Также ведется работа по поиску молекулярных маркеров гена *Pl₈*. В предыдущих работах нами были сконструированы три SNP-праймера – 8R2, 5S2 и 5S3, которые можно использовать для маркирования локусов *Pl₅* и *Pl₈* в линиях подсолнечника [22]. Кроме того, дополнительно исследовали SSR-маркеры, но ни один из них не выявил полиморфизма среди



анализированных образцов [23]. Поэтому мы использовали 15 дополнительных микросателлитных локусов. По шести локусам не было выявлено полиморфизма ни у одной из изученных линий. Еще шесть хотя и выявляли полиморфные фракции на линиях-дифференциаторах подсолнечника, но амплифицированные фрагменты не являлись характерными только для линии 803-1, являющейся носителем гена Pl_8 , что указывает на фактическое отсутствие связи данных локусов с целевым геном [21]. Перспективными для дальнейшего изучения были признаны локусы ORS316, ORS707 и ORS799 и сейчас ведется выявление их пригодности для маркирования гена Pl_8 в линиях и образцах селекции ВНИИМК.

Так же продолжается работа по маркированию гена Pl_{arg} , который уже более 10 лет сохраняет эффективность против всех известных рас *P. halstedii*. После апробации 17 SSR-маркеров на линиях-дифференциаторах подсолнечника были отобраны три ORS509, ORS662 и ORS822, которые являлись наиболее информативными, со стабильно высоким полиморфизмом и четко интерпретируемыми результатами. Их валидация на линиях и образцах селекции ВНИИМК показала отсутствие в исследуемом материале локуса Pl_{arg} , вследствие чего было принято решение о создании двух гибридных комбинаций линий ВК925 и ВК776 с линией RHA419, носителем гена Pl_{arg} , для оценки диагностической ценности молекулярных маркеров ORS509, ORS662 и ORS822. Молекулярно-генетический анализ поколения F_1 позволил установить, что данные локусы наследуются кодоминантно [24]. Анализ расщепления по устойчивости подсолнечника к ложной мучнистой росе в F_2 показал доминантное моногенное наследование устойчивости для обеих комбинаций, что было подтверждено с помощью χ^2 -критерия. Далее был проведен гибридологический анализ поколения F_2 для трех SSR-локусов по обеим комбинациям. При этом, для комбинации RHA419 \times ВК776 наблюдалось искажение расщепления, что вероятно связано с искажением расщепления всей геномной области при скрещивании культурных линий с линиями, происходящими из дикорастущих видов подсолнечника [25]. Значения частот рекомбинации, рассчитанные по методу максимального правдоподобия [26], подтвердили сцепление локусов Pl_{arg} – ORS509 с частотой рекомбинации $0,23 \pm 0,04$ и $0,28 \pm 0,05$, локусов Pl_{arg} – ORS662 с частотой рекомбинации $0,11 \pm 0,03$ и $0,34 \pm 0,05$, а также для локусов Pl_{arg} – ORS822 с частотой рекомбинации $0,31 \pm 0,05$ и $0,26 \pm 0,05$ в комбинациях скрещиваний RHA419 \times ВК776 и RHA419 \times ВК925, соответственно [25]. Результаты нашего исследования показали, что частоты рекомбинации между геном Pl_{arg} и изученными локусами в обеих комбинациях скрещиваний отличались. Причем, если по локусам ORS509 и ORS822 различия небольшие, то по ORS662 они значительнее. В связи с этим мы считаем, что в практической селекции на устойчивость к *P. halstedii* необходимо совместное применение трех молекулярных маркеров. Кроме того, для отбора устойчивых гетерозиготных растений данные маркеры не применимы. Но их можно использовать для отбора гомозиготных устойчивых растений из расщепляющейся популяции.

Применение всех исследованных нами маркеров в виде единой системы позволит ускорить и облегчить работу по созданию нового селекционного материала с комплексной устойчивостью к разным расам возбудителя ложной мучнистой росы.

Заключение. За последние два года во ВНИИМК была проведена обширная работа по изучению маркеров генов устойчивости к ложной мучнистой росе у подсолнечника, определена их диагностическая ценность и пригодность для использования в маркер-ассоциированной селекции. Выявлены специфичные аллели SSR-маркеров у линий подсолнечника, которые являются донорами устойчивости генов Pl_6 , Pl_8 и Pl_{arg} . Применение данных маркеров в виде единой системы позволит ускорить и облегчить работу по созданию нового селекционного материала с комплексной устойчивостью к разным расам возбудителя ложной мучнистой росы.



Литература

1. USDA: Министерство сельского хозяйства США: офиц. сайт. // Foreign Agricultural Service EU Oilseeds Annual Report 2021 – URL: https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Oilseeds%20and%20Products%20Annual_Vienna_European%20Union_04-01-2021 (дата обращения: 13.12.2022).
2. Gulya T.J. Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower around the world // Advances in Downy Mildew Research. Lebeda A., Spencer-Phillips PTN (eds) In: Proceedings of 2-nd International Downy Mildew Symposium. Olomouc and JOLA, Czech Republic July 2–6. Palcky University. 2007. V. 3. P. 121–134.
3. Gulya T.J., Markell S., McMullen M., Harveson B., Osborne L. New virulent races of downy mildew: distribution, status of DM resistant hybrids, and USDA sources of resistance // In: Proceedings of 33th Sunflower Research Forum. Fargo, ND, USA, January. 2011. P. 12–13.
4. Рамазанова С.А., Антонова Т.С., Ивебор М.В. Дифференциация изолятов возбудителя ложной мучнистой росы подсолнечника на основе SNP-маркеров // Масличные культуры. 2011. №1 (146–147). С. 122–126.
5. Spring O., Gomez-Zeledon J., Hadziabdic D., Trigiano R.N., Thines M., Lebeda A. Biological characteristics and assessment of virulence diversity in pathosystems of economically important biotrophic oomycetes // Crit. Rev. Plant Sci. 2018. V.37. P. 439–495.
6. Spring O. Spreading and global pathogenic diversity of sunflower downy mildew – Review // Plant Prot. Sci. 2019. V. 55. P. 149–158.
7. 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 *PI_{Arg}* and *PI₈* and maker-assisted gene pyramiding in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Mol. Genet. Genomics. 2017. Vol. 292 (3). P. 551–563.
8. Pecrix Y., Penouilh-Suzette C., Munos S., Vear F., Godiard L. Ten broad spectrum resistances to downy mildew physically mapped on the sunflower genome // Front. Plant Sci. 2018. Vol. 9. P. 1780.
9. Tourvieille de Labrouhe D., Serre F., Walser P., Roche S., Vear F. Quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica*. 2008. Vol. 164. P. 433–44.
10. Vincourt P., Assadi F., Bordat A., Langlade N.B., Gouzy J., Pouilly N., Vear F. Consensus mapping of major resistance genes and independent QTL for quantitative resistance to sunflower downy mildew // Theoretical and Applied Genetics. 2012. № 125 (5). P. 909–920.
11. Molinero-Ruiz M.L., Dominguez J., Melero-Vara J.M. Races of isolates of *Plasmopara halstedii* from Spain and studies on their virulence // Plant Dis. 2000. V. 86. P. 736–740.
12. Rashid K.Y., Desjardins M.L., Kaminski D.A. Diseases of sunflower in Manitoba and Saskatchewan in 2005 // Can. Plant Dis Survey. 2006. V. 86. P. 114–115.
13. Iwebor M., Antonova T., Saukova S. Occurrence and distribution of races 713, 733 and 734 of sunflower downy mildew pathogen in the Russian Federation // Helia. 2018. V. 41 (69). P. 141–151.
14. Şahin E. Ç, Kalenderoğlu A., Aydın Y., Evcı G., Uncuoğlu A. A. SSR markers suitable for marker assisted selection in sunflower for downy mildew resistance // Open Life Sci. 2018. V. 13. P. 319–326.
15. 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. V. 105 (8). P 1124–1136.
16. Radwan O., Bouzidi M. F., Vear F., Philippon J., Tourvieille de Labrouhe D., Nicolas P., Mouzeyar S. Identification of non-TIR-NBS-LRR markers linked to the *PI₅/PI₈* locus for resistance to downy mildew in sunflower // Theoretical and Applied Genetics. 2003. V. 106. P. 1438–1446.
17. Jocić S., Miladinović D., Imerivski I., Dimitrijević A., Cvejić S., Nagl N., Kondić-Špika A. Towards sustainable downy mildew resistance in sunflower // Helia. 2012. V. 35. № 56. P. 61–72.



18. Imerovski I., Dimitrijevic D., Miladinovic A., Jovic S., Dedic B. et al. Identification and validation of breeder-friendly DNA markers for *Pl_{arg}* gene in sunflower // *Molecular Breeding*. 2014. Vol. 34 (3) P. 779–788.

19. Бадьянов Е. В., Рамазанова С.А. Идентификация локусов *Pl₅*, *Pl₆* и *Pl₈* контролирующих устойчивость *Plasmopara halstedii* у линий подсолнечника // Актуальные вопросы селекции, биологии, технологии возделывания и переработки масличных культур: материалы 10-й Всерос. конф. молодых ученых и специалистов ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, 26–28 февраля 2019 г. Краснодар, 2019. С. 12–16.

20. Miller J. F., Gulya T. J. Inheritance of resistance to race 4 of downy mildew derived from interspecific crosses in sunflower // *Crop Sci*. 1991. V. 31. P. 40-43.

21. Ramazanova S.A., Badyanov E.V., Guchetl S.Z. Validation of microsatellite markers to identify *Pl₆*, *Pl₈* and *Pl_{arg}* genes that control resistance to *Plasmopara halstedii* in sunflower // *Caspian Journal of Environmental Sciences* 2021. V. 19 № 5 С. 915–920.

22. Рамазанова С.А., Антонова Т.С., Бадьянов Е.В. и др. Использование SNP-маркеров для идентификации локусов *Pl₅* и *Pl₈*, контролирующих устойчивость подсолнечника к *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni // *Масличные культуры*. Вып. 3 (179). 2019. С. 21–26.

23. Рамазанова С.А., Антонова Т.С. Маркирование локусов использование *Pl₅*, *Pl₆* и *Pl₈*, контролирующих устойчивость к *Plasmopara halstedii* у линий подсолнечника селекции ВНИИМК // *Масличные культуры*. НТБ ВНИИМК. 2018. Вып. 3 (175). С. 19–27.

24. Рамазанова С.А., Бадьянов Е.В., Савиченко В.Г., Иванов С.В., Аверина А.А. Микросателлитные маркеры для идентификации гена *Pl_{arg}*, контролирующего устойчивость к ложной мучнистой росе у подсолнечника // *Эколого-генетические основы селекции и возделывания сельскохозяйственных культур: материалы Международной научно-практической конференции ФГБНУ «Федеральный научный центр риса», 24–27 мая 2022 г. Краснодар, 2022.*

25. 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. Вып. 3 (191). С. 14–23.

26. Гершензон С.М. Основы современной генетики. Киев: Наукова думка, 1979. 508 с.

MARKERS OF *P. HALSTEDII* RESISTANCE GENES IN SUNFLOWER BRED IN V.S. PUSTOVOIT ALL-RUSSIAN RESEARCH INSTITUTE OF OIL CROPS

Badyanov E.V., Ramazanova S.A., Guchetl S.Z.
V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops

Downy mildew caused by the oomycete *Plasmopara halstedii* is one of the most harmful sunflower diseases. Introducing dominant resistance genes to this pathogen into the host plant is the most effective, economical, and environmentally safe method of controlling the pathogen. Microsatellite markers of *Pl₆*, *Pl₈*, and *Pl_{arg}* genes known from literature sources were tested on lines and breeding samples. The four studied molecular markers: ORS328 (locus *Pl₆*), ORS509, ORS662, and ORS822 (locus *Pl_{arg}*), made it possible to identify these genes in the lines and breeding samples of V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops. The markers ORS316, ORS707, and ORS799 (locus *Pl₈*) were found promising for further study. The studied DNA markers may be of special interest in the marker-assisted breeding of sunflower for resistance to downy mildew.

Key words: sunflower, *Plasmopara halstedii*, races, resistance genes, microsatellite markers, MAS.