



УДК 631.523:633.854.78
DOI 10.25230/conf11-2021-19-24

**АПРОБИРОВАНИЕ SSR-МАРКЕРОВ ГЕНОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА,
КОНТРОЛИРУЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ К *P. HALSTEDII*
И ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ДЛЯ ПЦР**

Бадьянов Е.В., Рамазанова С.А.
ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК
Badyanov656@mail.ru

Одним из наиболее вредоносных заболеваний подсолнечника является ложная мучнистая роса. Наиболее эффективная мера защиты от данного заболевания – создание устойчивых сортов и гибридов. Использование молекулярных маркеров, в частности ДНК-маркеров, позволяет контролировать наличие доминантных генов устойчивости на каждом этапе селекции. Проведен подбор оптимальной методики выделения ДНК подсолнечника и оптимальных температурных режимов амплификации для 10 пар праймеров, созданных для маркирования генов *Pl₆*, *Pl₈*, *Pl₁₃*, и *Pl_{Arg}*. Предварительно выявлено 13 аллельных вариантов, пригодных для ДНК-генотипирования *Helianthus annuus* по данным локусам.

Ключевые слова: *Pl*-гены, ДНК-маркеры, подсолнечник, *P. halstedii*, устойчивость.

Введение. Болезни являются основным ограничивающим фактором в производстве подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) и причиной плохой реализации генетического потенциала урожайности данной культуры. Подсолнечник поражается более чем 40 различными болезнями, многие из которых вызывают сильное снижение урожайности. Одно из наиболее вредоносных заболеваний – ложная мучнистая роса (ЛМР), вызываемая оомицетом *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni (син. *Plasmopara helianthi* Novot.). Эта болезнь значительно снижает урожай данной культуры в годы, когда метеорологические условия в период вегетации складываются благоприятно для ее развития [1–3].

Во всем мире описано около 50 патотипов *P. halstedii* [1; 4–5], а у подсолнечника идентифицировано 36 основных генов устойчивости обозначенных как *Pl* [6]. Некоторыми авторами уже проводились исследования количественной, возможно, неспецифической по патотипу, резистентности [7–9], но это непросто использовать в селекции.

Меры защиты от ложной мучнистой росы включают методы возделывания, химические методы и использование устойчивых генотипов. Рекомендуются методы возделывания культуры – это использование здоровых семян для посева, правильный севооборот, оптимальные сроки сева и предотвращение глубокой вспашки поля после уборки подсолнечника. Мерой борьбы с ложной мучнистой росой также является обработка семян препаратами на основе металаксила. Это защищает урожай подсолнечника во время первичного заражения, то есть на ранних стадиях развития. Кроме того, доступны различные химические вещества для послевсходовой обработки, но такая практика поднимает вопрос об экономической и экологической целесообразности [10]. Поэтому борьба с ложной мучнистой росой подсолнечника все еще во многом зависит от результатов селекции и поисков основных генов устойчивости.

Ряд исследований отечественных и зарубежных ученых посвящен разработке маркерных систем на основе ПЦР для идентификации генов устойчивости к ЛМР [5–6; 9; 11]. Но для генетического материала из разных селекционных аллельный полиморфизм одних и тех же локусов может быть не одинаков.



Целью данной работы был подбор оптимального метода выделения ДНК подсолнечника и ее амплификации с праймерами, разработанными для маркирования генов устойчивости к возбудителю ложной мучнистой росы.

Материалы и методы. Объектом исследования служили 14 линий-дифференциаторов устойчивости подсолнечника, входящих в международный тест-набор для идентификации рас *P. halstedii*.

Для выделения ДНК применяли метод, основанный на использовании лизирующего буфера, содержащего гексадецилтриметиламмоний бромид (СТАВ) с модификациями [12–13]. Выделение ДНК проводили как из 5–7 дневных проростков, так и из зеленых листьев. Для зеленых листьев использовалась методика выделения с помощью дополнительной очистки активированным углем [14]. Концентрацию ДНК в полученном препарате определяли визуально по интенсивности свечения пробы объемом 10 мкл в ультрафиолетовом свете в 1 %-ом агарозном геле с добавлением 2 мкл бромистого этидия. Электрофорез растворов ДНК проводили при напряжении 100 V в течение 30 минут в трис-ацетатном буферном растворе (ТАЕ).

Для ПЦР анализа применили 10 праймеров, разработанных для маркирования генов *Pl₆*, *Pl₈*, *Pl₁₃*, и *Pl_{Arg}* [11; 15–17].

Полимеразную цепную реакцию выполняли в реакционной смеси (25 мкл) следующего состава: 67 mM Трис-НСl (рН 8,8); 16,6 mM сульфата аммония; 1,5–3,0 mM MgCl₂; 0,01 % Tween 20; по 0,2 mM дезоксирибонуклеозидфосфатов; по 10 пМ праймеров; 10 нг матричной ДНК и 1 ед. рекомбинантной термостабильной ДНК-полимеразы (НПО «СибЭнзим», Россия). Реакции проводили в термоциклере S1000™ (BioRad, США) при следующих температурных режимах: начальная денатурация при 96 °С в течении 1 мин. 30 сек., далее 34 цикла с последовательной сменой температур: денатурация при 94 °С, в течении 30 сек., отжиг праймера при 55–63 °С – 40 сек., элонгация при 70 °С – 1 мин., и заключительная элонгация при 70 °С в течении 2 мин.

Электрофорез продуктов амплификации проводили в геле, содержащем 2 % агарозы и SB-буфер, с использованием камеры для горизонтального электрофореза SE-2 (Хеликон, Россия) при напряжении 200 В, силе тока 100 мА, в течении 30 минут. Гели окрашивали бромистым этидием. Для визуализации и документирования результатов электрофореза применяли систему цифровой документации видеоизображения BIO-PRINT (Vilber Lourmat, Франция).

Теоретическую температуру отжига вычисляли по следующей формуле [18]:

$$T_m = 2x(A+T) + 4x(G+C),$$

где А, Т, G, С – пуриновые и пиримидиновые основания в праймере.

Данная формула применима для олигонуклеотидов в пределах 18–24 пар оснований.

Результаты и обсуждение. Анализ ДНК методом ПЦР требует проведения предварительных экспериментов по оптимизации методики выделения ДНК, подбору оптимальных температурных режимов амплификации с SSR-праймерами, выявляющими полиморфизм фракций ДНК, оптимизации физико-химических параметров электрофореза.

На электрофореграммах качество ДНК, полученной по каждой из методик, было достаточно высоким, и нами не было замечено сильных различий. Более оптимальной для амплификации было признана ДНК из проростков, так как она не требовала дополнительной очистки с использованием активированного угля. Этот метод выделения более прост, требует меньших временных затрат при том же уровне качества ДНК, что особо полезно при массовых выделениях, и не привязан к сезону активной вегетации подсолнечника, поскольку получить проростки из семенного материала в лабораторных условиях можно в любое время года.

Для всех праймеров вычисляли теоретическую температуру отжига. В таблице показано сравнение теоретических и экспериментальных температур отжига для выбранных праймеров. Известно, что чем выше температура отжига, тем меньше вероятность



неспецифического связывания праймера с матричной ДНК, т. е. снижение температуры отжига ведет к гибридизации праймера с не полностью комплементарной ему последовательностью нуклеотидов. При этом могут появляться дополнительные, невоспроизводимые фракции ДНК. На рисунке представлены продукты амплификации с праймером ORS328 при температурах отжига 55 °С, 60 °С и 63 °С.

Таблица. Оптимизация температуры отжига для ПЦР анализа SSR-локусов ДНК подсолнечника

Название локуса	Теоретическую температуру отжига (°С)	Экспериментальные температуры отжига (°С)	Количество продуцируемых фракций	Количество полиморфных фракций
ORS328	72	55	5	4
		60	5	4
		63*	2	2
ORS371	61	55	2	1
		60	2	1
		63*	2	1
ORS509	62	55*	1	0
		60	0	0
		63	0	0
ORS605	59	55	1	0
		60*	1	0
		63	1	0
ORS610	61	55*	2	1
		60	2	0
		63	2	0
ORS662	64	55	3	2
		60*	3	3
		63	2	1
ORS675	67	55	1	0
		60*	1	0
		63	1	0
ORS716	61	55	2	2
		60*	2	2
		63	2	2
ORS781	69	55	7	6
		60	7	6
		63*	4	4
ORS1182	70	55	1	0
		60	1	0
		63*	1	0

Примечание. * - оптимальная температура отжига для получения фракций ДНК с чёткой визуализацией.

Как видно на рисунке а и б при амплификации с более низкими температурами образуются неспецифические фрагменты ДНК разной длины. Поэтому было установлено, что оптимальной температурой отжига для пары праймеров ORS328 является 63 °С, так как только при такой температуре происходит образование четкой специфической полосы ампликона (рис. с.) Результаты экспериментального подбора температур отжига 10 праймерных пар представлены в таблице. Как видно из таблицы, у четырех из десяти праймеров (ORS509, ORS610, ORS662 и ORS675) теоретические температуры отжига не соответствовали оптимальным, определенным опытным путем.

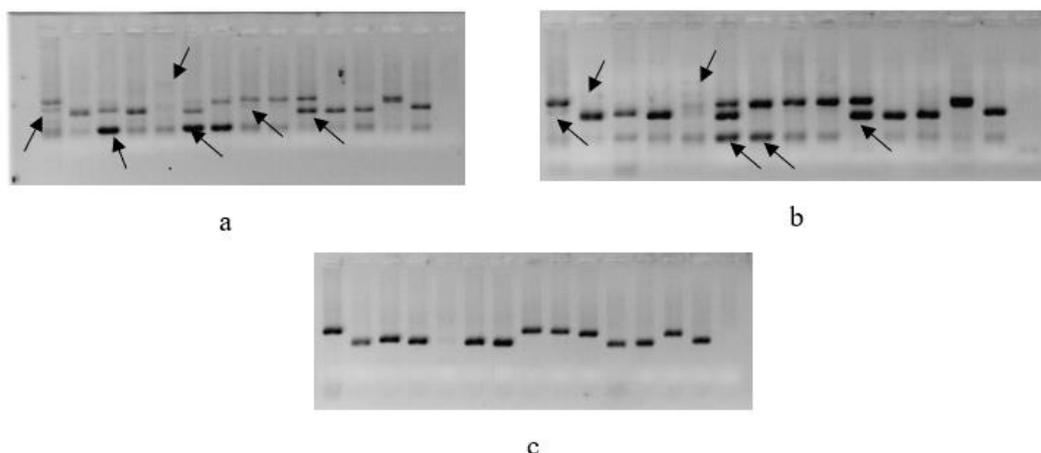


Рисунок – Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК линий-дифференциаторов по локусу ORS328, при температурах отжига: а – 55 °С, б – 60 °С, с – 63 °С. Стрелками обозначены неспецифические фрагменты ДНК

Температура элонгации зависит от типа используемой ДНК-полимеразы и является постоянной в пределах от 70 до 72 °С. В программах для амплификации SSR-праймеров мы использовали температуру 70 °С.

Также, данное исследование показало, что изученные локусы являются полиаллельными. У локуса ORS781 выявлено наибольшее число аллелей 4. У локуса ORS662 обнаружено 3 аллеля. Два локуса ORS328 и ORS716 имеют по 2 аллеля. Локусы ORS371 и ORS610 имеют по 1 аллелю. По локусам ORS509, ORS605 и ORS675 не было выявлено полиморфизма ни у одной из изученных линий.

ПЦР-анализ 14 линий-дифференциаторов, изученных по этим локусам, позволил нам выявить 13 аллельных вариантов – от 0 до 4 аллелей на локус, что, в среднем, составляет 1,3 аллель на один маркер.

Заключение. Был проведен подбор оптимальной методики выделения ДНК подсолнечника и оптимальных температурных режимов амплификации для 10 пар праймеров, созданных для маркирования генов *Pl₆*, *Pl₈*, *Pl₁₃*, и *Pl_{Arg}*. Предварительно выявлено 13 аллельных вариантов, пригодных для ДНК-генотипирования *Helianthus annuus* по данным локусам. Также, было обнаружено отсутствие полиморфизма с праймерами ORS509, ORS605 и ORS675. Таким образом, лишь семь из десяти использованных для ПЦР пар праймеров выявляли полиморфизм фракций амплифицированной ДНК, что говорит об их пригодности для дальнейшей работы по идентификации генов устойчивости к ложной мучнистой росе у подсолнечника.

Литература

1. Viranyi, F., Gulya, T.J., Tourvieille de Labrouhe, D. Recent changes in the pathogenic variability of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) populations from different continents // *Helia*. – 2015. – V. 38. – P. 149–162. doi: 10.1515/helia-2015-0009
2. Spring, O., Spreading and global pathogenic diversity of sunflower downy mildew – Review // *Plant Protect. Sci.* – 2019. – V. 55. – № 3. – P. 149–158. doi:10.17221/32/2019-PPS
3. Ивевбор, М.В., Антонова Т.С., Саукова С.Л., Арасланова Н.М. Ложная мучнистая роса подсолнечника на юге России // *Защита и карантин растений*. – 2019. – №10. – С. 29–33.
4. 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. – Т. 41. – № 69. – P. 141–151.



5. 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.
6. Qi, L L., Ma, G., Talukder, Z.I., Seiler, G.J., Hulke, B.S., Jan, C.C., et al. Molecular mapping of the disease resistance gene and its impact on sunflower breeding // in Proceedings of the 19th International Sunflower Conference, Edirne. – 2016. – P. 20–30.
7. Tourvieille de Labrouhe, D., Serre, F., Walser, P., Roche, S., and Vear, F. Quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus*) // Euphytica. – 2008. – V. 164. – P. 433–444. doi: 10.1007/s10681-008-9698-1
8. Vear, F., Serre, F., Jouan-Dufournel, I., Bert, P.F., Roche, S., Walser, P., et al. Inheritance of quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Euphytica. – 2008. – V. 164. – P. 561–570. doi: 10.1007/s10681-008-9759-5
9. Vincourt P., As-sadi F., Bordat A., Langlade N.B., Gouzy, J., Pouilly N., et al. Consensus mapping of major resistance genes and independent QTL for quantitative resistance to sunflower downy mildew // Theoretical and Applied Genetics. – 2012. – V. 125. – P. 909–920. doi: 10.1007/s00122-012-1882-y
10. Jocić S., Cvejić S., Hladni N., Miladinović D., Miklič V. Development of sunflower genotypes resistant to downy mildew // Helia. – 2010. – V. 33. – № 53. – P. 173–180. doi: 10.2298/HEL1053173J
11. 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
12. 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. – V. 81. – P. 8014–8018.
13. Zolan M.E., Pukkila P.J. Inheritance of DNA methylation in *Corpinus cinereous* // Mol. Cell Biol. – 1986. – T. 6. – № 1. – P. 195–200.
14. Vroh Bi I., Harvengt L., Chandelier A., Mergeai G., Du Jardin P. Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction // Plant Breeding. – 1996. – V. 115 (3). – P. 205–206. doi: 10.1111/j.1439-0523.1996.tb00905.x
15. Mulpuri S., Liu Z., Feng J., Gulya T.J., Jan C.-C. Inheritance and molecular mapping of a downy mildew resistance gene, *Pl₁₃* in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Theoretical and Applied Genetics. – 2009. – V. 119. – P. 795–803. doi: 10.1007/s00122-009-1089-z
16. Şahin E.C., Kalenderoğlu A., Aydın Y., Evci 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. doi: 10.1515/biol-2018-0039
17. Wieckhorst S., Bachlava E., Dußle C.M., Tang S., Gao W., Saski C., Knapp S.J., Schön C.-C., Hahn V., Bauer E. Fine mapping of the sunflower resistance locus *Pl_{Arg}* introduced from the wild species *Helianthus argophyllus* // Theoretical and Applied Genetics. – 2010. – V. 121. – P. 1633–1644. doi: 10.1007/s00122-010-1416-4
18. Сомма М., Кверчи М. Обучающие курсы по теме: Анализ образцов пищевых продуктов на присутствие генетически модифицированных организмов. Сессия 6: Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Практическое руководство // Люксембург. Бюро официальных изданий ЕЭС. – 2006. URL: <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/manual%20RUS/UM%20Rus-S6.pdf> (дата обращения: 15.01.2021). ISBN: 978-92-79-06097-7



**THE TESTING OF SSR MARKERS OF GENES CONTROLLING RESISTANCE
TO *P. HALSTEDII* AND THE SELECTION OF OPTIMAL CONDITIONS FOR PCR**

Badyanov E.V., Ramazanova S.A.

Downy mildew is one of the most harmful diseases of sunflower. The most effective measure of this disease control is the development of resistant varieties and hybrids. The use of molecular markers, in particular DNA markers, allows to control the presence of dominant resistance genes at each stage of breeding. We carried out the selection of the optimal method for the isolation of sunflower DNA and the selection of the optimal temperature regimes of amplification for 10 pairs of primers developed to mark the *Pl₆*, *Pl₈*, *Pl₁₃*, and *Pl_{Arg}* genes. Preliminary, we identified 13 allelic variants that are suitable for DNA genotyping of *Helianthus annuus* by these loci.

Key words: *Pl* genes, DNA markers, sunflower, *P. halstedii*, resistance.