

Научная статья

УДК 631.523:633.854.78

DOI: 10.25230/2412-608X-2022-3-191-14–23

Оценка сцепления гена *Pl_{arg}*, контролирующего устойчивость к ложной мучнистой росе у подсолнечника, и микросателлитных локусов ДНК

Светлана Алексеевна Рамазанова
Евгений Витальевич Бадьянов
Виолетта Георгиевна Савиченко
Саида Заурбиевна Гучетль
Евгений Александрович Стрельников

ФГБНУ ВНИИМК

Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17
molecula.genetic@vniimk.ru

Аннотация. Ложная мучнистая роса, вызываемая оомицетом *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni, – одна из наиболее вредоносных болезней подсолнечника. В настоящее время перспективным для использования в селекции является locus *Pl_{arg}*, обеспечивающий устойчивость ко всем известным расам *P. halstedii*. Этот ген интрогрессирован из дикорастущего вида *Helianthus argophyllus*. Микросателлитные маркеры (SSR) позволяют управлять переносом генов, контролирующих устойчивость в селекционном материале. Однако необходима валидация маркера для доказательства его надежности при выявлении генов. Для идентификации гена *Pl_{arg}* подобраны SSR-маркеры ORS 662, ORS 509 и ORS 822. Их валидацию проводили на гибридных комбинациях линий подсолнечника селекции ВНИИМК ВК 776 и ВК 925 с линией подсолнечника RHA 419, являющейся донором гена *Pl_{arg}*. Предварительно было установлено, что эти линии отличаются друг от друга аллельным состоянием этих локусов. Исследование поколения F₁ показало, что все три микросателлитных локуса наследуются кодоминантно. Полученное путем самоопыления поколение F₂ было проанализировано фитопатологическими методами на устойчивость к *P. halstedii*. Анализ расщепления по фенотипу в обеих комбинациях скрещиваний показал, что фактически наблюдаемое расщепление соответствовало теоретически ожидаемой модели 3 : 1 при моногенном наследовании признака. Анализ сцепления гена и микросателлитных локусов показал, что частоты рекомбинации в скрещивании RHA 419 × ВК 776

составили для локуса ORS 662 – 0,11, ORS 509 – 0,23 и ORS 822 – 0,31. А для комбинации RHA 419 × ВК 925 этот показатель составил: для ORS 509 – 0,28, для ORS 662 – 0,34. На основании полученных данных сделан вывод, что для применения в маркер-ассоциированной селекции (МАС) подсолнечника на устойчивость к возбудителю ложной мучнистой росы необходимо использовать три изученных микросателлитных локуса.

Ключевые слова: подсолнечник, *Plasmopara halstedii*, гены устойчивости, микросателлитные маркеры, маркер-ассоциированная селекция (МАС)

Для цитирования: 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.

Благодарности. Работа выполняется при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта № Н-21.1/6.

UDC 631.523:633.854.78

Assessment of linkage between the *Pl_{arg}* gene controlling resistance to downy mildew in sunflower and microsatellite DNA loci

S.A. Ramazanova, leading researcher, PhD in biology
E.V. Badyanov, junior researcher
V.G. Savichenko, junior researcher
S.Z. Guchetl, head of a lab, leading researcher, PhD in biology
E.A. Strelnikov, head of a lab, PhD in biology

V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops
17 Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia
molecula.genetic@vniimk.ru

Abstract. Downy mildew caused by oomycete *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni is one of the most harmful diseases of sunflower. The *Pl_{arg}* locus, which provides resistance to all known races of *P. halstedii*, is currently promising for use in breeding. This gene is introgressed from the wild species *Helianthus argophyllus*. Microsatellite markers (SSRs) make it possible to control the transfer of genes controlling resistance in breeding material. However, validation of the marker is needed to prove its reliability in identifying genes. We selected the SSR markers ORS 662, ORS 509 and ORS 822 to identify the *Pl_{arg}* gene. We conducted their validation on hybrid combinations of sunflower lines of the breeding of V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops VK 776 and VK 925 with sunflower line RHA 419, which is a donor of *Pl_{arg}* gene. It was preliminarily established that these lines differ from each other by the allelic state of these loci. A

study of the F₁ generation showed that all three microsatellite loci are inherited codominantly. The F₂ generation obtained by self-pollination was analyzed by phytopathological methods for resistance to *P. halstedii*. Phenotype splitting analysis of both crossing combinations showed that the actually observed splitting corresponded to the theoretically expected 3 : 1 pattern in monogenic inheritance of the trait. Analysis of linkage of gene and microsatellite loci showed that the recombination frequencies in the RHA 419 × VK 776 cross was 0.11 for the ORS 662 locus, 0.23 for ORS 509 and 0.31 for ORS 822. And for the combination of RHA 419 × VK 925 cross this indicator was: for ORS 509 – 0.28, for ORS 662 – 0.34. Based on the obtained data, we concluded that three studied microsatellite loci should be used in marker-assisted selection (MAS) of sunflower for resistance to downy mildew pathogen.

Key words: sunflower, *Plasmopara halstedii*, gens of resistance, microsatellite markers, marker-associated breeding (MAC)

Acknowledgements. The work is conducting under a financial support of the Kuban Scientific Fund within the scientific project No N-21.1/6.

Введение. Одна из наиболее вредоносных болезней подсолнечника – ложная мучнистая роса, вызываемая оомицетом *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni. Потери урожая в благоприятные для развития болезни годы достигают 90 % [1; 2]. Для борьбы с этой болезнью применяют различные приемы. Это агротехнические методы, такие как севооборот, оптимальная густота посева, фитосанитарные прополки, удаление пораженных корзинок, уборка послеуборочных остатков, зяблевая вспашка [3]. Однако агротехнические приемы являются больше вспомогательной мерой, не давая 100 % гарантии защиты.

Применяют также химические методы защиты от болезни: это обработка семян перед посевом препаратами на основе мефеноксама и опрыскивание в период вегетации фунгицидами группы триазолов и стробилуринов. В последнее время сообщается о том, что оомицет приобрел устойчивость к фунгицидам. Это ограничивает эффективность химических веществ и поднимает вопрос об экономии

ческой целесообразности их использования [4; 5; 6].

Наиболее экологичная стратегия предотвращения потерь урожая подсолнечника, вызванных патогеном, заключается в поиске новых генов устойчивости и введении их в селекционный материал.

Существуют две категории устойчивости подсолнечника к *P. halstedii*. Это качественная устойчивость, вызванная основными генами *Pl*, и количественная, которая контролируется несколькими генами (QTL) [7]. На сегодняшний день у подсолнечника идентифицировано 36 основных генов *Pl*, расположенных в пяти группах сцепления (LG 1, 2, 4, 8 и 13) [8; 9; 10] и трех QTL, расположенных в LG7, LG10 и LG8 [7; 11]. Один или несколько основных генов *Pl*₁, *Pl*₂, *Pl*₅, *Pl*₆, *Pl*₇ и *Pl*₈ обеспечивали устойчивость ко всем расам *P. halstedii* и до начала 2000-х годов широко использовались в селекции на устойчивость. К сожалению, из-за возникновения новых рас устойчивость многих из этих генов была преодолена в полевых условиях [6].

Перспективным является введение в селекционный материал гена *Pl*_{arg}, контролирующего устойчивость ко всем известным на сегодняшний день расам. В литературных источниках сообщается, что ген *Pl*_{arg} был интрогрессирован в культурный подсолнечник из дикорастущего вида *H. argophyllus* в 1989 г. американским исследователем Seifer G.J. [13]. Он путем скрещивания линии культурного подсолнечника HA 89 и *H. argophyllus* получил линию ARG-1575-2, несущую ген *Pl*_{arg}. Затем были получены четыре инбредные линии RHA 419, RHA 420, RHA 443 и RHA 464, несущие этот ген и используемые во многих селекционных программах в течение двух десятилетий. При этом RHA 419 и RHA 420 были получены непосредственно из линии ARG-1575-2, тогда как линии RHA 443 и RHA 464 – из линии RHA 419 [14; 15].

Ген *Pl_{arg}* был картирован в группе сцепления LG 1. Классический генетический анализ, основанный на фенотипировании сегрегирующих популяций, показал, что он не сцеплен с другими генами *Pl₁₄*, *Pl₁₃* и *Pl₁₆*, находящимися в этой же группе сцепления [18]. *Pl_{arg}* является основным локусом *Pl*, по-прежнему эффективен против всех известных рас *P. halstedii* и способен контролировать ложную мучнистую росу в течение длительного периода времени [16; 17]. Введение этого гена в селекционный материал позволит создать линии и гибриды подсолнечника с комплексной устойчивостью к расам патогена. Для значительного сокращения времени и затрат на их создание необходимо использовать методы ранней и точной диагностики носителей гена *Pl_{arg}* в гибридной популяции, а именно молекулярное маркирование данного гена.

В литературе опубликован ряд молекулярных маркеров, сцепленных с локусом *Pl_{arg}* [19; 20; 21]. При разработке молекулярного маркера, как правило, используется ограниченное число генотипов, а степень сцепления с маркируемым геном определяется на основе анализа одной-двух расщепляющихся популяций. Поэтому всегда необходима валидация молекулярных маркеров на широком наборе генотипов перед практическим использованием маркера в селекции.

Цель данной работы – исследовать микросателлитные молекулярные маркеры из литературных источников, сцепленные с геном *Pl_{arg}*, для подтверждения их связи с геном в генотипах селекции ВНИИМК и определить их диагностическую ценность для практического использования в селекции на устойчивость к возбудителю ложной мучнистой росы.

Материалы и методы. Валидацию молекулярных маркеров ORS 662, ORS 509 и ORS 822 проводили на гибридных комбинациях линий подсолнечника RHA 419 × BK 776 и RHA 419 × BK 925.

Скрещивания проводили в условиях теплицы по следующей схеме: ♀ RHA 419

× ♂ BK 776 и ♀ RHA 419 × ♂ BK 925. Корзинку накрывали изолятором из нетканого материала. В течение последующих 4–5 дней кастрировали цветки в фазе выхода тычиночных нитей из венчика в пределах каждого вновь зацветающего пояса. Отцовские растения также изолировали перед цветением. Пыльцу для опыления собирали и наносили на рыльца пестиков материнских растений [22]. Гибриды F₁ выращивали в поле. Затем было проведено самоопыление растений F₁ и получено потомство F₂. Растения поколения F₂ тестировали в лабораторных условиях методом искусственного заражения на устойчивость и восприимчивость к ложной мучнистой росе [23].

Для выделения ДНК использовали фрагменты зеленых листьев подсолнечника. Экстракцию ДНК проводили с использованием набора для выделения DiamondDNA Plant kit (Россия). 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 по три пары праймеров, разработанных для маркирования локуса *Pl_{arg}*: ORS 662 (F: CGGGTTGGATATGGAGTCAA, R: CCTTTACAACGAAGCACAATTC), ORS 509 (F: CAACGAAAAGACAGAATCGAAA, R: CCGGGAATTTTACAAGGTGA) и ORS 822 (F: CAATGCCATC TGTCATCAGCTAC, R: AAACAAACCTTTGGACGA AACTC) [24].

Полимеразную цепную реакцию выполняли в реакционной смеси объемом 25 мкл следующего состава: 67 mM трис-HCl, pH 8,8; 16,6 mM сульфата аммония; 1,5–3,0 mM MgCl₂; 0,01 % Tween 20; 200 μM dNTP; по 0,5 μM 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). Темпера-

турно-временные режимы амплификации описаны ранее [25].

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 геледокументирующей видеосистемы BIO-PRINT (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).

Математическую обработку результатов расщепления проводили с использованием χ^2 -критерия соответствия фактических расщеплений, теоретически ожидаемым в моно- и дигибридных скрещиваниях. Расчет частоты рекомбинации r и ошибку рекомбинации s_p по результатам расщепления в F_2 рассчитывали по методу максимального правдоподобия [26].

Результаты и обсуждение. Для валидации молекулярных маркеров ORS 662, ORS 509 и ORS 822 и определения их диагностической ценности были отобраны устойчивая ко всем расам линия RHA 419 и восприимчивые линии BK 776 и BK 925. Эти линии также отличаются по микросателлитным профилям от линии RHA 419 [25].

Как правило, SSR-маркеры имеют кодоминантное наследование, у гибридов F_1 в микросателлитном профиле присутствуют фрагменты обоих родителей, однако бывают и исключения. Imerovski с соавторами сообщали, что локус ORS 509 имеет доминантное наследование [20]. Однако результаты нашего исследования поколения F_1 показали, что он наследуется кодоминантно так же, как локусы ORS 662 и ORS 822. Так как техника искусст-

венного скрещивания сводится к выполнению двух операций: кастрации цветков материнских линий и опылению их пыльцой, собранной с отцовских особей, не всегда достигается 100%-ная гибридность растений. Анализ ДНК позволяет достоверно определить негибридные растения и исключить их из дальнейшей работы. У полученных нами образцов поколения F_1 по изучаемым локусам выявлены фрагменты обеих родительских линий. На рисунке 1 для примера представлена электрофореграмма продуктов амплификации ДНК с праймером ORS 662. У образцов на дорожках 1–20 выявлены фрагменты обеих родительских линий, представленных на дорожках 21–24 и 25–28. Аналогичный результат получен и с праймерами ORS 509 и ORS 822.

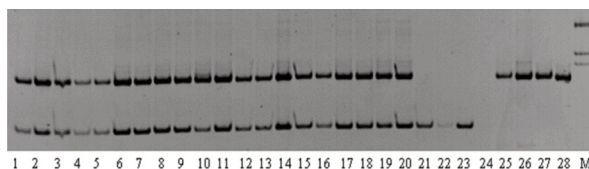


Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК образцов подсолнечника поколения F_1 по локусу ORS 662: дорожки 1–5, 11–15 – RHA 419 × BK 776; 6–10, 16–20 – RHA 419 × BK 925, 21–22 – BK 925, 23 – BK 776, 25–28 RHA 419, M – маркер молекулярного веса 100 bp (ориг.)

На основании полученных результатов из поколения F_1 было отобрано и самоопылено по пять растений для получения поколения F_2 . Анализ расщепления по устойчивости подсолнечника к ложной мучнистой росе для комбинаций скрещиваний RHA 419 × BK 776 и RHA 419 × BK 925, выполненный по результатам фитопатологической оценки, показал, что фактически наблюдаемое расщепление по фенотипу соответствовало теоретически ожидаемой модели 3 : 1 при моногенном наследовании признака. Для комбинации

RHA 419 × BK 776 из 144 растений потомства F₂ пораженных растений было 38. А для комбинации RHA 419 × BK 925 из 102 проанализированных растений пораженных было 18.

Критерий χ^2 , характеризующий соответствие фактических расщеплений теоретически ожидаемым, подтвердил доминантное моногенное наследование устойчивости для обеих комбинаций (табл. 1).

Таблица 1

Наследование признака устойчивости к ложной мучнистой росе в поколении F₂ при скрещивании линий подсолнечника

| Ген <i>Pl_{arg}</i> | Всего растений, шт. | Теоретически ожидаемое соотношение | χ^2 | df | P |
|-----------------------------|---------------------|------------------------------------|----------|----|------|
| RHA 419 × BK 776 | 144 | 3 : 1 | 0,156 | 1 | 0,21 |
| RHA 41 × BK 925 | 102 | 3 : 1 | 3,794 | 1 | 0,34 |

Эти результаты согласуются с данными Wiecekhorst с соавторами (2010), которые определили, что локус *Pl_{arg}* контролируется одним геном и наследуется доминантно [18]. Это является как преимуществом, так и недостатком, поскольку устойчивость, обусловленная такими генами, быстро преодолевается.

Далее был проведен гибридологический анализ поколения F₂ для трех SSR-локусов. Результаты по оценке наследования SSR-локусов для комбинации скрещивания RHA 419 × BK 776 представлены в таблице 2.

Таблица 2

Наследование SSR-локусов ДНК ORS 509, ORS 662 и ORS 822 в F₂ при скрещивании линий RHA 419 и BK 776

| Локус | Всего растений, шт. | Теоретически ожидаемое соотношение | χ^2 | df | P |
|---------|---------------------|------------------------------------|----------|----|-------|
| ORS 509 | 106 | 1 : 2 : 1 | 38,2 | 2 | <0,05 |
| ORS 662 | 113 | 1 : 2 : 1 | 14,9 | 2 | <0,05 |
| ORS 822 | 141 | 1 : 2 : 1 | 15,6 | 2 | <0,05 |

Как видно из таблицы 2, все локусы показали несоответствие фактического

расщепления ожидаемому соотношению 1 : 2 : 1. В литературе описаны многочисленные примеры такого искажения расщепления. Такое явление наблюдается в 7–13 % случаев при внутривидовых скрещиваниях. А в скрещиваниях культурных форм с дикорастущими видами встречается значительно чаще – от 23 до 90 %. Например, Imerovski с соавторами (2016) сообщали об искажении расщепления при скрещивании линий с другими генами устойчивости подсолнечника, происходящими из диких видов, например, гена устойчивости к заразихе *or_{ab-vl-8}*. В скрещиваниях восприимчивых линий подсолнечника с линией AB-VL-8, происходящей из многолетнего дикорастущего вида *H. divaricatus*, несоответствие расщепления было в пользу аллелей от восприимчивой родительской линии либо наблюдался избыток гетерозигот. Согласно предположениям авторов, это происходит из-за того, что ген устойчивости лежит в области искажения сегрегации [27]. При картировании гена *Pl_{arg}* в скрещиваниях восприимчивой линии с другим донором гена, интрогрессированным из *H. argophyllus*, – линией Arg 1575-2, Dužble (2004) с соавторами отмечали похожее искажение расщепления. Из 126 растений поколения F₂ было получено 16 гомозиготных устойчивых, 82 гетерозиготных и 28 гомозиготных восприимчивых, и χ^2 был равен 13,6 [19].

Линия RHA 419, использованная в нашем исследовании, получена в результате скрещивания RHA 373 × Arg 1575-2. И, несмотря на отсутствие соответствия фактических расщеплений теоретически ожидаемым в поколении F₂, мы сделали тест на совместное наследование гена *Pl_{arg}* с изучаемыми SSR-локусами. На рисунке 2 показаны электрофореграммы продуктов амплификации ДНК образцов подсолнечника поколения F₂ (RHA 419 × BK 776), полученные с праймерами ORS 509 и ORS 662. По локусу ORS 509 изученные образцы распределились в пять классов. Это устойчивые и восприимчивые растения, имеющие фракцию размером 195 п.н. такую же, как у линии RHA

419 (рис. 2а, дорожки 7, 12–15 и 17), восприимчивые растения с фракцией 189 п.н., как у линии ВК 776 (рис. 2а, дорожки 3, 5, 6, 8–10, 16 и 18). Растения, имеющие фракции обоих родителей, были как среди устойчивых, так и восприимчивых (рис. 2а, дорожки 4, 11). Не было выявлено устойчивых растений с фрагментом ДНК, как у восприимчивой линии ВК 776. По локусу ORS 662 были выявлены четыре класса. В отличие от локуса ORS 509 не обнаружено восприимчивых растений с генотипом, как у линии RHA 419. Но среди устойчивых и восприимчивых также были растения, имеющие фракции обоих родителей. По локусу ORS 822 мы наблюдали шесть классов. Это устойчивые и восприимчивые растения, имеющие такую же фракцию, как у линии RHA 419, восприимчивые растения с фракцией, как у линии ВК 776. Растения, имеющие фракции обоих родителей, были как среди устойчивых, так и восприимчивых. Были выявлены устойчивые растения с фрагментом, как у восприимчивой линии ВК 776. Для отбора устойчивых гетерозиготных растений данные маркеры не применимы. Но их можно использовать для отбора гомозиготных устойчивых растений из расщепляющейся популяции.

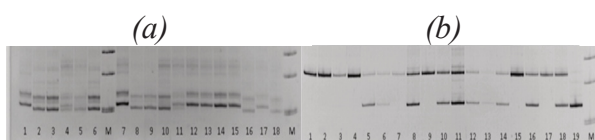


Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК образцов подсолнечника поколения F₂ (RHA 419 × BK 776) в полиакриламидном геле: (а) по локусу ORS 509, дорожки: 1 – RHA 419, 2 – BK 776, 3–18 – образцы подсолнечника поколения F₂; (б) по локусу ORS 662, дорожки 1–18 – образцы подсолнечника поколения F₂, 19 – BK 776, М – маркер молекулярного веса 100 bp (ориг.)

В таблице 3 представлены данные по оценке совместного наследования гена

Pl_{arg} с SSR-локусами в потомстве F₂ (RHA 419 × BK 776). Показаны значения χ^2 , а также вероятность нулевой гипотезы о независимом наследовании (P) между анализируемыми генами. Тест на совместное наследование показал сцепленное наследование гена *Pl_{arg}* с локусами ДНК ORS 662, ORS 509 и ORS 822.

Таблица 3

Значения χ^2 между геном *Pl_{arg}* и SSR-локусами в потомстве F₂ (RHA 419 × BK 776)

| Пара локусов | Всего растений, шт. | Фактически наблюдаемое соотношение, шт. | Теоретически ожидаемое соотношение | χ^2 | df | P |
|----------------------------------|---------------------|---|------------------------------------|----------|----|-------|
| <i>Pl_{arg}</i> –ORS 662 | 113 | 46:33:0:0:12:22 | 3:6:3:1:2:1 | 89 | 5 | <0,01 |
| <i>Pl_{arg}</i> –ORS 509 | 106 | 16:31:24:0:5:30 | 3:6:3:1:2:1 | 98 | 5 | <0,01 |
| <i>Pl_{arg}</i> –ORS 822 | 141 | 35:68:1:13:9:15 | 3:6:3:1:2:1 | 42 | 5 | <0,05 |

Была выполнена оценка частоты рекомбинации между парами локусов *Pl_{arg}* – ORS 662, *Pl_{arg}* – ORS 509 и *Pl_{arg}* – ORS 822. Значения частот рекомбинации, представленные в таблице 4, подтвердили сцепление этих локусов. Частота рекомбинации между парами локусов *Pl_{arg}* – ORS 662 составила 0,11 ± 0,03, *Pl_{arg}* – ORS 509 – 0,23 ± 0,04 и *Pl_{arg}* – ORS 822 – 0,31 ± 0,05 (табл. 4).

Таблица 4

Значения частот рекомбинации между геном *Pl_{arg}* и локусами ORS 509, ORS 662 и ORS 822 в F₂ (RHA 419 × BK 776)

| Пара локусов | r | S _p |
|----------------------------------|------|----------------|
| <i>Pl_{arg}</i> –ORS 509 | 0,23 | 0,04 |
| <i>Pl_{arg}</i> –ORS 662 | 0,11 | 0,03 |
| <i>Pl_{arg}</i> –ORS 822 | 0,31 | 0,05 |

На следующем этапе работы выполнили тест на совместное наследование гена *Pl_{arg}* с SSR-локусами в потомстве F₂ (RHA 419 × BK 925). Анализ расщепления ДНК-локусов в поколении F₂ для гибридной комбинации проводили только по двум локусам: ORS 509 и ORS 662. Искажения расщепления в данной комбинации не наблюдалось. Критерий χ^2 по этим локусам составил 3,7 и 4,6 соответственно при P равном 0,25 (табл. 5).

Таблица 5

Наследование SSR-локусов ДНК ORS 509 и ORS 662 в потомстве F₂ при скрещивании линий RHA 419 и BK 925

| Локус | Всего растений, шт. | Теоретически ожидаемое соотношение | χ^2 | df | P |
|---------|---------------------|------------------------------------|----------|----|------|
| ORS 509 | 106 | 1 : 2 : 1 | 3,7 | 2 | 0,25 |
| ORS 662 | 102 | 1 : 2 : 1 | 4,6 | 2 | 0,10 |

Значения χ^2 между геном Pl_{arg} и SSR-локусами в поколении F₂ для гибридной комбинации RHA 419 × BK 925 показаны в таблице 6.

Таблица 6

Значения χ^2 между геном Pl_{arg} и SSR-локусами в потомстве F₂ (RHA 419 × BK 925)

| Пара локусов | Всего растений, шт. | Фактически наблюдаемое соотношение, шт. | Теоретически ожидаемое соотношение | χ^2 | df | P |
|--------------------|---------------------|---|------------------------------------|----------|----|-------|
| Pl_{arg} –ORS509 | 106 | 18:45:20:0:5:12 | 3:6:3:1:2:1 | 14,7 | 5 | <0,01 |
| Pl_{arg} –ORS662 | 102 | 17:45:22:0:8:10 | 3:6:3:1:2:1 | 12,1 | 5 | <0,02 |

Тест на совместное наследование показал сцепленное наследование гена устойчивости с локусами ORS 509 и ORS 662. Частота рекомбинации составила $0,28 \pm 0,05$ для пары Pl_{arg} – ORS 509 и $0,34 \pm 0,05$ для пары Pl_{arg} – ORS 662 (табл. 7)

Таблица 7

Значения частот рекомбинации между геном Pl_{arg} и локусами ORS 509 и ORS 662 в потомстве F₂ (RHA 419 × BK 925)

| Пара локусов | r | s _p |
|----------------------|------|----------------|
| Pl_{arg} – ORS 509 | 0,28 | 0,05 |
| Pl_{arg} – ORS 662 | 0,34 | 0,05 |

Результаты нашего исследования показали, что частоты рекомбинации между геном Pl_{arg} и изученными локусами в обеих комбинациях скрещиваний отличались. Причем, если по локусу ORS 509 различия небольшие (0,23 и 0,28), то по ORS 662 они значительнее (0,11 и 0,34). А в исследовании DuBle с соавторами частота рекомбинации по локусу ORS 662

составила 1,9 [19]. В связи с этим мы считаем, что в практической селекции на устойчивость к *P. halstedii* необходимо применение нескольких молекулярных маркеров.

Многие авторы отмечают, что на оценку расстояния между локусами могут оказать влияние ошибки фенотипирования, потому что идентификация восприимчивого фенотипа как устойчивого при классификации приводит к увеличению класса рекомбинантных генотипов и искажает дистанции на генетической карте [18; 19]. А также на оценку расстояния между генами оказывает влияние еще и искажение расщепления в поколении F₂ у SSR-локусов. Такие данные показывают, что диагностическую ценность молекулярных маркеров необходимо проводить на большем количестве гибридных комбинаций.

Заключение. Таким образом, апробация молекулярных маркеров ORS 509, ORS 662 и ORS 822 гена Pl_{arg} с использованием гибридных комбинаций линий подсолнечника RHA 419 × BK 776 и RHA 419 × BK 925 показала, что маркерные аллели в реципиентных линиях BK 776 и BK 925 отличались от аллелей линии RHA 419. Изученные микросателлитные локусы наследуются кодоминантно. Ген устойчивости и SSR-локусы наследуются сцеплено. С точки зрения практического их использования в маркерной селекции предпочтительно применять все три локуса ORS 509, ORS 662 и ORS 822, чтобы минимизировать ошибки при отборе устойчивых растений.

Список литературы

1. Markell S.G., Humann R.H., Gilley M., Gulya T.J. [et al.]. Downy mildew pathogen // Compendium of sunflower diseases and pests. American Phytopathology Press, 2016. – P. 115–117.
2. 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. – Vol. 131. – P. 47–51. DOI: 10.1023/A:1023063726185.

3. Пересыпкин В.Ф. Болезни сельскохозяйственных культур. Том 2: Болезни технических культур и картофеля. – Киев: Урожай, 1990. – 248 с.

4. 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.

5. Albourie J.M., Tourvieille J., Tourvieille de Labrouhe D. Resistance to metalaxyl in isolates of the sunflower pathogen *Plasmopara halstedii* // *European Journal of Plant Pathology*. – 1998. – Vol. 104. – P. 2335–2342. DOI: 10.1023/A:1008691123239.

6. Gulya T.J., Draper M., Harbour J., Holen C., Knodel J., Lamey A., Mason P. Metalaxyl resistance in sunflower downy mildew in North America // In: *Proceedings of 21st sunflower research workshop*. Fargo, North Dakota. – 1998. – P. 118–123.

7. 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. 433–444. DOI: 10.1007/s10681-008-9698-1.

8. 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*. ISA, Edirne. – 2016(b). – P. 20–30.

9. 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 *Pl₈* and marker-assisted gene pyramiding in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Mol. Genet. Genomics*. – 2017. – Vol. 292 (3). – P. 551–563. DOI: 10.1007/s00438-017-1290-8.

10. 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. DOI: 10.3389/fpls.2018.01780.

11. 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. – No 125 (5). – P. 909–920. DOI: 10.1007/s00122-012-1882-y.

12. 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. – Vol. 38. – P. 149–162. DOI: 10.1515/helia-2015-0009.

13. Seifer G.J. Registration of 13 downy mildew tolerant interspecific sunflower germplasm lines derived from wild annual species // *Crop Science*. – 1991. – No 31 (6). – P. 1714–1716. DOI: 10.2135/cropsci1991.0011183x003100060093x.

14. Mille J.F., Gulya T.J., Seiler G.J. Registration of Five Fertility Restorer Sunflower Germplasms // *Crop science*. – 2002. – No 42 (3). – P. 983–989. DOI: 10.2135/cropsci2002.9890.

15. Hulke B.S., Miller J.F., Gulya T.J., Vick B.A. Registration of the oilseed sunflower genetic stocks HA 458, HA 459, and HA 460 possessing genes for resistance to downy mildew // *Journal of Plant Registrations*. – 2010. – No 4. – P. 93–97.

16. Brahm L., Röcher T., Friedt W. PCR-based markers facilitating marker assisted selection in sunflower for resistance to downy mildew // *Crop Science*. – 2000. – No 40 (3). – P. 149–158. DOI: 10.2135/cropsci2000.403676x.

17. Gascuel Q., Martinez Y., Boniface M.C., Vear F., Pichon M., Godiard L. The sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii* // *Molecular Plant Pathology*. – 2015. – No 16. – P. 109–122. DOI: 10.1111/mpp.12164.

18. Wieckhorst S., Bachlava E., Duple C., Tang S., Gao W., Sasaki C., Knapp S., Schön C.C., Hahn V., Bauer E. Fine mapping of the sunflower resistance locus *Pl_{ARG}* introduced from the wild species *Helianthus argophyllus* // *Theor. Appl. Genet*. – 2010. – Vol. 121. – P. 1633–1644. DOI: 10.1007/s00122-010-1416-4.

19. 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. – Vol. 109. – P. 1083–1086. DOI: 10.1007/s00122-004-1722-9.

20. Imerovski I., Dimitrijevic D., Miladinovic A., Jocic 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. DOI: 10.1007/s11032-014-0074-7.

21. Solodenko A. Validation of microsatellite markers of *Pl* resistance genes to downy mildew of sunflower // *Helia*. – 2018. – Vol. 41 (68). – P. 73–82. DOI: 10.1515/helia-2017-0026.

22. Волгин В.В., Обыдало А.Д. Сравнительная эффективность способов стерилизации пыльцы цветков подсолнечника // Масличные культуры. – 2014. – Вып. 1 (157–158). – С. 10–15.

23. 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. – Vol. 41 (69). – P. 141–151. DOI: 10.1515/helia-2018-0015.

24. Tang S., Yu J.K., Slabaugh M.B., Shintani K., Knapp J. Simple sequence repeat map of the sunflower genome // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2002. – Vol. 105. – P. 1124–1136. DOI: 10.1007/s00122-002-0989-y.

25. Рамазанова С.А., Бадьянов Е.В., Гучетль С.З. Молекулярные маркеры генов *Pl₆*, *Pl₁₃* и *Pl_{arg}* для использования в селекции подсолнечника на устойчивость к ложной мучнистой росе // Масличные культуры. – 2020. – Вып. 3 (183). – С. 20–26.

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

27. Imerovski I., Dimitrijevic A., Miladinovic D., Dedic B., Jovic S., Kocis Tubic N., Cvejic S. Mapping of a new gene for resistance to broomrape races higher than F // *Euphytica*. – 2016. – Vol. 209. – P. 281–289. DOI: 10.1007/s10681-015-1597-7.

References

1. Markell S.G., Humann R.H., Gilley M., Gulya T.J. [et al.]. Downy mildew pathogen // *Compendium of sunflower diseases and pests*. American Phytopathology Press, 2016. – P. 115–117.

2. 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. – Vol. 131. – P. 47–51. DOI: 10.1023/A:1023063726185.

3. Peresyupkin V.F. Бolezni sel'skokhozyaystvennykh kul'tur. Tom 2: Бolezni tekhnicheskikh kul'tur i kartofelya. – Kiev: Urozhay, 1990. – 248 s.

4. Iwebor M.V., Antonova T.S., Saukova S.L., Araslanova N.M. Lozhnaya muchnistaya rosa podsolnechnika na yuge Rossii // *Zashchita i karantin rasteniy*. – 2019. – № 10. – S. 29–33.

5. Albourie J.M., Tourvieille J., Tourvieille de Labrouhe D. Resistance to metalaxyl in isolates of the sunflower pathogen *Plasmopara halstedii* // *European Journal of Plant Pathology*. – 1998. – Vol. 104. – P. 2335–2342. DOI: 10.1023/A:1008691123239.

6. Gulya T.J., Draper M., Harbour J., Holen C., Knodel J., Lamey A., Mason P. Metalaxyl resistance in sunflower downy mildew in North America // In: *Proceedings of 21st sunflower research workshop*. Fargo, North Dakota. – 1998. – P. 118–123.

7. 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. 433–444. DOI: 10.1007/s10681-008-9698-1.

8. 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*. ISA, Edirne. – 2016(b). – P. 20–30.

9. 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 *Pl₈* and marker-assisted gene pyramiding in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Mol. Genet. Genomics*. – 2017. – Vol. 292 (3). – P. 551–563. DOI: 10.1007/s00438-017-1290-8.

10. 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. DOI: 10.3389/fpls.2018.01780.

11. 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. – No 125 (5). – P. 909–920. DOI: 10.1007/s00122-012-1882-y.

12. Viranyi F., Gulya T.J., Tourvieille de Labrouhe D. Recent changes in the pathogenic variability of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) populations from different con-

tinents // *Helia*. – 2015. – Vol. 38. – P. 149–162. DOI: 10.1515/helia-2015-0009.

13. *Seifer G.J.* Registration of 13 downy mildew tolerant interspecific sunflower germplasm lines derived from wild annual species // *Crop Science*. – 1991. – No 31 (6). – P. 1714–1716. DOI: 10.2135/cropsci1991.0011183x003100060093x.

14. *Mille J.F., Gulya T.J., Seiler G.J.* Registration of Five Fertility Restorer Sunflower Germplasms // *Crop science*. – 2002. – No 42 (3). – P. 983–989. DOI: 10.2135/cropsci2002.9890.

15. *Hulke B.S., Miller J.F., Gulya T.J., Vick B.A.* Registration of the oilseed sunflower genetic stocks HA 458, HA 459, and HA 460 possessing genes for resistance to downy mildew // *Journal of Plant Registrations*. – 2010. – No 4. – P. 93–97.

16. *Brahm L., Röcher T., Friedt W.* PCR-based markers facilitating marker assisted selection in sunflower for resistance to downy mildew // *Crop Science*. – 2000. – No 40 (3). – P. 149–158. DOI: 10.2135/cropsci2000.403676x.

17. *Gascuel Q., Martinez Y., Boniface M.C., Vear F., Pichon M., Godiard L.* The sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii* // *Molecular Plant Pathology*. – 2015. – No 16. – P. 109–122. DOI: 10.1111/mpp.12164.

18. *Wieckhorst S., Bachlava E., Duple C., Tang S., Gao W., Sasaki C., Knapp S., Schön C.C., Hahn V., Bauer E.* Fine mapping of the sunflower resistance locus *Pl_{ARG}* introduced from the wild species *Helianthus argophyllus* // *Theor. Appl. Genet.* – 2010. – Vol. 121. – P. 1633–1644. DOI: 10.1007/s00122-010-1416-4.

19. *Duflé 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. – Vol. 109. – P. 1083–1086. DOI: 10.1007/s00122-004-1722-9.

20. *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. DOI: 10.1007/s11032-014-0074-7.

21. *Solodenko A.* Validation of microsatellite markers of *Pl* resistance genes to downy mildew of sunflower // *Helia*. – 2018. – Vol. 41 (68). – P. 73–82. DOI: 10.1515/helia-2017-0026.

22. *Volgin V.V., Obydalo A.D.* Sravnitel'naya effektivnost' sposobov sterilizatsii pyl'tsy

tsvetkov podsolnechnika // *Maslichnye kul'tury*. – 2014. – Vyp. 1 (157–158). – S. 10–15.

23. *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. – Vol. 41 (69). – P. 141–151. DOI: 10.1515/helia-2018-0015.

24. *Tang S., Yu J.K., Slabaugh M.B., Shintani K., Knapp J.* Simple sequence repeat map of the sunflower genome // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2002. – Vol. 105. – P. 1124–1136. DOI: 10.1007/s00122-002-0989-y.

25. *Ramazanov S.A., Bad'yanov E.V., Guchetl' S.Z.* Molekulyarnye markery genov *Pl₁₆*, *Pl₁₃* i *Pl_{arg}* dlya ispol'zovaniya v selektsii podsolnechnika na ustoychivost' k lozhnoy muchnistoy rose // *Maslichnye kul'tury*. – 2020. – Vyp. 3 (183). – S. 20–26.

26. *Gershenson S.M.* Osnovy sovremennoy genetiki. – Kiev: Naukova dumka, 1979. – 508 s.

27. *Imerovski I., Dimitrijevic A., Miladinovic D., Dedic B., Jovic S., Kocis Tubic N., Cvejic S.* Mapping of a new gene for resistance to broomrape races higher than F // *Euphytica*. – 2016. – Vol. 209. – P. 281–289. DOI: 10.1007/s10681-015-1597-7.

Сведения об авторах

С.А. Рамазанова, вед. науч. сотр., канд. биол. наук

Е.В. Бадьянов, мл. науч. сотр.

В.Г. Савиченко, мл. науч. сотр.

С.З. Гучетль, зав. лаб., вед. науч. сотр., канд. биол. наук

Е.А. Стрельников, зав. лаб., канд. биол. наук

Получено/Received

29.09.2022

Получено после рецензии/Manuscript peer-reviewed

30.09.2022

Получено после доработки/Manuscript revised

03.10.2022

Принято/Accepted

12.10.2022

Manuscript on-line

30.11.2022