

Научная статья

УДК 633.854.78:575:632.9

DOI: 10.25230/2412-608X-2023-1-193-3-13

Разработка ДНК-маркеров признака устойчивости подсолнечника к расе G заразики (*Orobanche cumana* Wallr.)

Дмитрий Леонидович Савиченко
Саида Заурбиевна Гучетль
Елизавета Дмитриевна Логинова

ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17
d_savichenko@mail.ru

Аннотация. Заразики кумская (*Orobanche cumana* Wallr.) – облигатный паразит, способный вызвать значительное снижение урожая подсолнечника. Наиболее распространенной и вирулентной расой заразики в Российской Федерации является раса G. Экологичным и экономически выгодным способом борьбы с ней является выращивание генетически устойчивых сортов и гибридов подсолнечника. Применение ДНК-маркеров при отборе устойчивых растений значительно повышает эффективность селекционного процесса. Для маркирования устойчивости подсолнечника к расе G заразики с помощью биоинформатических подходов были разработаны новые ДНК-маркеры – четыре SCAR (sequence characterized amplified region) и 10 SSR (simple sequence repeat). Маркеры были проверены на 20 линиях и гибридах подсолнечника. По результатам проверки были поэтапно исключены из исследования все SSR- и два SCAR-маркера. SCAR-маркер RORS1 характеризовался наличием амплифицированного фрагмента ДНК длиной ≈ 168 п.н. и показал ассоциацию с признаком устойчивости, а SORS1 с длиной фрагмента ≈ 322 п.н. – связь с восприимчивым фенотипом. Из них была составлена маркерная система для мультиплексной ПЦР, которая позволила различать устойчивые и восприимчивые линии и гибриды, кроме линии ВК678 и гибридов F₁, полученных с использованием ее в качестве родительской. Для устранения недостатков маркерной системы были сконструированы семь SCAR-маркеров, аналогичных SORS1. По результатам оценки был отобран маркер SORS9, характеризующийся наличием амплифицированного фрагмента ДНК длиной ≈ 217 п.н. у восприимчивых геноти-

пов. Новая система маркеров RORS1/SORS9 для мультиплексной ПЦР была валидирована на 70 линиях и гибридах подсолнечника. Восприимчивые линии и гибриды характеризовались амплификацией только маркера SORS9, устойчивые линии – только маркера RORS1, а устойчивые гибриды – обоих маркеров. Разработанная маркерная система позволила отличить все восприимчивые линии и гибриды от устойчивых генотипов подсолнечника.

Ключевые слова: подсолнечник, заразики кумская, ДНК-маркер, маркер-вспомогательная селекция, устойчивость

Для цитирования: Савиченко Д.Л., Гучетль С.З., Логинова Е.Д. Разработка ДНК-маркеров признака устойчивости подсолнечника к расе G заразики (*Orobanche cumana* Wallr.) // Масличные культуры. Вып. 1 (193). С. 3–13.

UDC 633.854.78:575:632.9

Development of DNA-markers of a trait of sunflower resistance to a broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) race G

Savichenko D.L., junior researcher

Guchetl S.Z., head of the lab., leading researcher, PhD in biology

Loginova E.D., laboratory assistant

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

Abstract. Broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) is an obligatory parasite which is able to decrease significantly sunflower yields. The race G is the most spread and virulence broomrape race in the Russian Federation. Cultivation of genetically resistance sunflower varieties and hybrids is the most ecologic and economically efficient method to control this parasite plant. Usage of DNA-markers when selecting the resistant plants increases significantly the effectiveness of a breeding process. To mark the sunflower resistance to broomrape race G, using bioinformative approaches, we developed new DNA-markers: four SCAR (sequence characterized amplified region) and ten SSR (simple sequence repeat). These markers were tested on 20 lines and hybrids of sunflower. Due to the results of this testing, all SSR- and two SCAR-markers were eliminated by steps. SCAR-marker RORS1 was characterized with the presence of an amplified DNA fragment with a length ≈ 168 bps and showed association with a trait of resistance, and SORS1 with a fragment length ≈ 322 bps had a relation with a susceptible phenotype. These markers composed a marker system for a multiplex PCR,

which allowed distinguishing resistant and susceptible lines and hybrids, except a line VK678 and F₁ hybrids developed using this line as parental one. To eliminate faults of the marker system, seven SCAR-markers analogous to SORS1 were created. Due to estimation result, we selected a marker SORS9 characterized with the presence an amplified DNA fragment with a length \approx 217 bps in susceptible phenotypes. The new system of markers RORS1/SORS9 for a multiplex PCR was validated on 70 sunflower lines and hybrids. The susceptible lines and hybrids were characterized with amplification of only marker SORS9, resistant lines – only marker RORS1, and resistant hybrids – both markers. The developed marker system allowed distinguishing all susceptible lines and hybrids from the resistant sunflower genotypes.

Key words: sunflower, broomrape, *Orobanche cumana*, DNA-marker, marker-associated breeding, resistance

Введение: Подсолнечник является важной масличной и кондитерской культурой, четвертой по популярности в мире после пальмы, сои и рапса. Его масло содержит ненасыщенные жирные кислоты, фитостеролы и витамин Е, который, как известно, снижает уровень липидов низкой плотности, повышает иммунитет и защищает от сердечно-сосудистых заболеваний [1]. Существуют биотические факторы, ограничивающие выращивание подсолнечника, и одним из них является облигатный паразит – заразиха кумская (*Orobanche cumana* Wallr.). Сильное поражение этим паразитом способно полностью уничтожить урожай. Популяции заразихи обычно подразделяют на расы в зависимости от их вирулентности. К настоящему времени в мире известно о восьми расах (А, В, С, D, Е, F, G и H) [2]. Исследования расового состава заразихи с 25 полей шести регионов Российской Федерации (Самарская, Оренбургская, Воронежская, Белгородская области, Ставропольский и Краснодарский края) показали, что на большинстве полей доминирует раса G заразихи, на некоторых преобладают менее вирулентные – Е и F. А наиболее вирулентный биотип (H) выявлен на полях практически всех иссле-

дованных регионов [3]. Для снижения негативных последствий, вызываемых паразитом, применяются различные дорогостоящие агротехнологические приемы, в особенности обработка посевов гербицидами [4]. Возделывание же устойчивых сортов и гибридов подсолнечника отечественного происхождения позволит более экономно и экологически безопасно противодействовать заразице. На данный момент отбор генотипов подсолнечника по признаку устойчивости к заразице проводится только по результатам фенотипической оценки на инфекционном фоне [5]. Этот процесс характеризуется высокой трудозатратностью и недостаточно высокой пропускной способностью. Использование молекулярных маркеров позволит осуществлять отбор генотипов, содержащих ген устойчивости, в том числе при комбинировании разных генов и интрогрессии в другой селекционный материал, без обязательной массовой фитопатологической оценки. Разработка и дальнейшее использование маркерных систем для ускоренной селекции подсолнечника активно применяется во многих странах [6; 7; 8; 9]. Для разработки молекулярных маркеров устойчивости к заразице зарубежными учеными выполнен ряд исследований по поиску местоположения генов устойчивости подсолнечника к разным ее расам. Расоспецифичный ген, контролирующий устойчивость к расе Е – *Or₅*, картирован в теломерной области хромосомы 3 на 7,5 сМ выше маркера ORS1036 [10]. В той же хромосоме позже был локализован ген устойчивости к расе выше F – *or_{ab-vl-8}* [11]. Несмотря на близкое расположение к гену *Or₅*, доказано, что эти гены различны. Позже I. Imerovski *et al.* картировали до 23 значимых QTL (Quantitative trait loci) устойчивости в геноме подсолнечника. Два основных QTL – *or3.1* и *or3.2* – располагались в хромосоме 3. QTL *or3.1* был расположен в геномной области, где был картирован предшествующий ген устойчивости к за-

разике *Or5*, в то время как QTL *or3.2* впервые был идентифицирован в нижней области той же хромосомы [12]. Также один ген устойчивости к расе F *HaOr7* картирован на хромосоме 7 [13]. По некоторым данным, этот ген также может контролировать устойчивость к расам выше F [14]. Ген устойчивости к расе G *OrDeb2*, интрогрессированный в культурный подсолнечник от *H. debilis* subsp. *tardiflorus*, картирован в верхней половине хромосомы 4 [15]. На данный момент неизвестна локализация и не маркировано большинство генов устойчивости к расам заразики у подсолнечника, возделываемого на территории РФ. Авторами данной работы было исключено расположение гена, контролирующего устойчивость к расе G заразики подсолнечника у устойчивых линий ВНИИМК, в непосредственной близости к гену *orab-vl-8* на хромосоме 3 [16]. Поскольку на полях РФ все еще преобладает раса G заразики, актуальна разработка системы маркеров признака устойчивости подсолнечника к этой расе для осуществления маркер-вспомогательной селекции.

Материалы и методы. Материал исследования – 66 известных устойчивых и восприимчивых к расе G заразики линий и гибридов селекции ВНИИМК, две линии-дифференциатора к расе F заразики LC1093 и P96 и два устойчивых коммерческих гибрида иностранной селекции СИ Честер (Syngenta, Швейцария) и P64LC108 (Pioneer Hi-Bred International, Inc., США) (рис. 1).

Для разработки ДНК-маркеров использовались нуклеотидные последовательности из баз генетических данных RefSeq (Reference Sequence) и GenBank® [17]. Поиск микросателлитных локусов был проведен с помощью программного обеспечения GMATA [18]. Дизайн пар праймеров проводился с помощью онлайн-ресурса Primer-BLAST [19; 20] с *in silico* проверкой специфичности отжига на репрезентативном геноме подсолнечника HanXRQr2.0-SUNRISE [21; 22]. Для анализа биоинформатических данных использовалось программное обеспечение

UGENE (Унипро, РФ) [23]. Визуализация результатов исследования проводилась с помощью пакета R ggplot2 [24] с использованием программного обеспечения R версии 4.2.2 [25].

Выделение и очистка ДНК из растительного материала проводилась методом СТАВ с некоторыми модификациями [26], Diamond DNA Plant kit (Алтайбиотех, РФ) а также набором МагноПрайм® ФИТО (НекстБио, РФ) при помощи автоматической станции экстракции и очистки нуклеиновых кислот Auto-pure 96 (Allsheng, КНР). Качество выделенной ДНК определяли с помощью микроспектрофотометра Nano-300 (Allsheng, КНР).

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 2,5 мкл 10xПЦР-Буфер-Б для Taq ДНК-полимеразы; 2,5 mM MgCl₂; 0,2 mM каждого дезоксирибонуклеозидфосфата; по 10 пМ каждого праймера; 10–30 нг матричной ДНК и 1 ед. SynTaq ДНК-полимеразы (Синтол, РФ). ПЦР проводилась в амплификаторе нуклеиновых кислот MiniAmp™ (Thermo Fisher Scientific, США). Условия амплификации: начальная денатурация – 3 мин 94 °С, затем 35 циклов: денатурация 94 °С – 30 сек, отжиг при 60 °С в течение 40 сек, элонгация – 40 сек при 72 °С, финальная элонгация – 5 мин. Для ПЦР анализа использовали два типа праймеров: SCAR (sequence characterized amplified region) и SSR (simple sequence repeat).

Электрофорез продуктов амплификации проводили в агарозном геле (1,5 % агароза, 1xSB-буфер) с использованием камеры для горизонтального электрофореза SE.2 (Хеликон, РФ) в течение 1 ч при силе тока 50–58 mA и напряжении 80–100 V. Окрашивание продуктов ПЦР осуществляли бромистым этидием. Результаты электрофореза документировали при помощи гель-документирующей видеосистемы GenoSens 2200 (Clinx, КНР). Размер фрагментов ДНК определяли с использованием программного обеспечения Image Lab Software (Bio-Rad, США) относительно маркера молекулярного веса 100–1000 п.н. (Синтол, РФ).

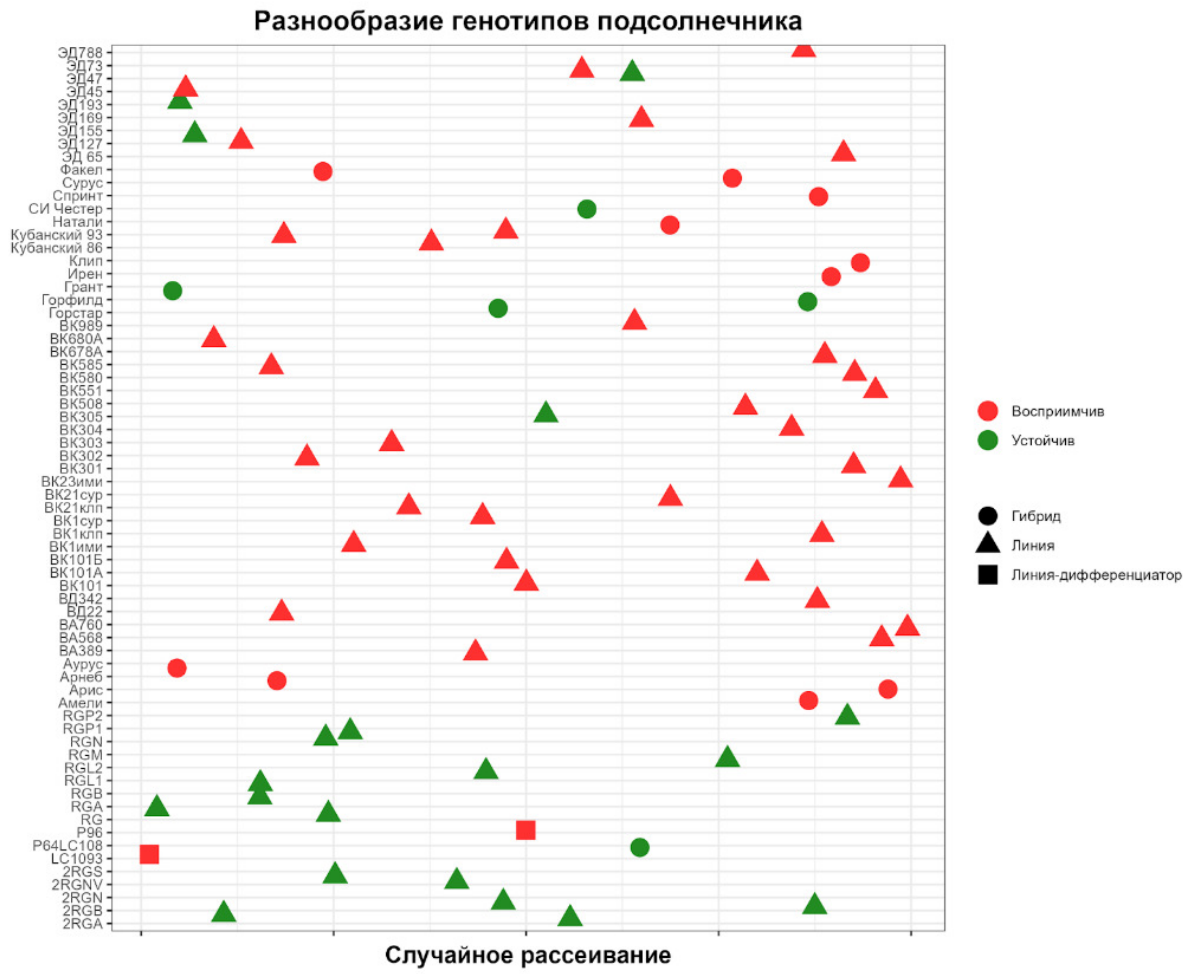


Рисунок 1 – Разнообразие генотипов подсолнечника, используемых в исследовании

Результаты и обсуждение. В наших предыдущих исследованиях по маркированию гена устойчивости подсолнечника к расе G заразики было сделано предположение о расположении этого гена в нижней части третьей группы сцепления [16]. Для проверки данного предположения были разработаны новые ДНК-маркеры микросателлитных локусов этого региона генома подсолнечника. Также для проверки связи гена *HaOr7* [13] с устойчивостью к расе G (РФ) заразики нами были разработаны SCAR-маркеры на основе последовательностей Genbank®: MN219479, MN219480, MF374791, MF374792 [17]. В общей сложности сконструировано 10 SSR- и четыре SCAR-маркера.

Для анализа ассоциации маркеров с признаком устойчивости использовали 20 генотипов подсолнечника: один устойчивый коммерческий гибрид, 10 устойчивых и девять восприимчивых линий селекции ВНИИМК (табл. 1).

Таблица 1

Результаты ПЦР с разработанными ДНК-маркерами

Фенотип	Название образца	Маркер				
		SSR11	SSR27	RORS1	SORS1	SORS2
Устойчивый	СИ Честер	247*	179/191	+++	+	+
	RGP1	253	191	+	-***	-
	RGB	247	191	+	-	-
	RGP2	253	179	+	-	-
	2RGNV	253	179	+	-	-
	RGA	247	179	+	-	-
	RGL1	253	197	+	-	-
	RG	253	197	+	-	-
	RGN	247	191	+	-	-
	RGM	247	191	+	-	-
Восприимчивый	RGL2	253	179	+	-	-
	BK680	247	191	-	+	+
	Ky686	247	191	-	+	+
	BA760	253	191	-	+	+
	Ky693	253	179	-	+	+
	BK585	247	197	-	+	+
	BK508	253	191	-	+	+
	BK551	253	191	-	+	+
BK580	247	179	-	+	+	
BK678	253	179	-	+	+	

*длина амплифицированного фрагмента ДНК

**наличие специфического ПЦР-продукта

***отсутствие ПЦР-продукта

В ходе анализа маркеры оценивали на способность к стабильной амплификации, отсутствие неспецифичной гибридизации с ДНК-матрицей и амплификации нецелевого продукта ПЦР, и ассоциацию с признаком. По результатам анализа десяти SSR-маркеров шесть были исключены из исследования по причине отсутствия целевого ПЦР продукта, два – из-за отсутствия полиморфизма длин фрагментов. Таким образом, из 10 SSR-маркеров для дальнейших исследований было отобрано два – SSR11 и SSR27. Из четырех SCAR маркеров один показал отсутствие амплификации и был забракован.

Маркер SSR11 показал наличие двух аллелей микросателлитного локуса, показавших случайное распределение на выборке из 20 различающихся по устойчивости генотипов подсолнечника. Маркер SSR27 характеризовался наличием трех аллелей, также показавших случайное распределение. Таким образом, оба маркера не показали ассоциации с признаком устойчивости к расе G заразики.

SCAR-маркер SORS2 демонстрировал ассоциацию с признаком на изучаемых генотипах, однако оказался непригоден для дальнейшей работы из-за амплификации неспецифичного ПЦР-продукта при анализе устойчивых линий. Маркер SORS1 показал отсутствие продуктов амплификации у всех устойчивых генотипов, кроме гибрида F₁, у которого наблюдалось наличие амплифицированного фрагмента ДНК, как и у всех восприимчивых линий. Маркер RORS1 демонстрировал наличие ПЦР-продукта у всех устойчивых и его отсутствие у восприимчивых генотипов подсолнечника (табл. 1). Длины амплифицированных фрагментов для маркера SORS1 соответствовали ожидаемым и составили ≈ 322 п.н., а для RORS1 ≈ 168 п.н., что позволяет эффективно разделять их в агарозном геле.

Пары праймеров были проверены *in silico* [27] и показали совместимость по температурному режиму, а также отсут-

ствию вторичных структур, что позволило создать из них маркерную систему для мультиплексной ПЦР. Данная система была проверена на 29 генотипах подсолнечника (рис. 2).

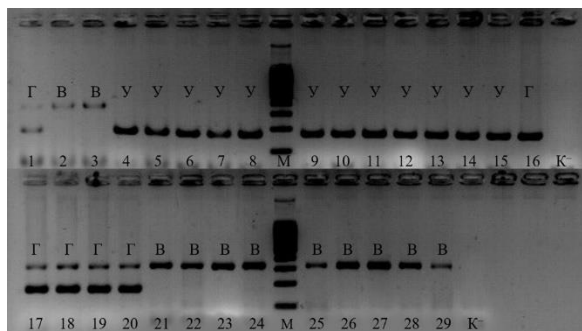


Рисунок 2 – Электрофоретические спектры амплифицированных фрагментов ДНК мультиплексной ПЦР с маркерами RORS1/SORS1.

Дорожки: 1 – СИ Честер; 2 – ВК680; 3 – Ку686; 4 – RGP1; 5 – RGB; 6 – RGP2; 7 – 2RGNV; 8 – RGA; 9 – RGL1; 10 – RG; 11 – RGN; 12 – RGM; 13 – RGL2; 14 – 2RGB; 15 – 2RGA; 16 – F₁ ВК678 × RGM; 17 – F₁ ВК680 × RGP1; 18 – F₁ ВК680 × RGM; 19 – F₁ ВК680 × RGL2; 20 – F₁ ВК680 × RGL1; 21 – ВА760; 22 – Ку693; 23 – ВК585; 24 – ВК508; 25 – ВК551; 26 – ВК304; 27 – ВК580; 28 – ВА389; 29 – ВА568; М – маркер молекулярного веса; К – отрицательный контроль; Г – гибридное растение; У – устойчивая линия; В – восприимчивая линия

Разработанная система маркеров RORS1 и SORS1 для мультиплексной ПЦР продемонстрировала кодоминантный характер наследования и полную ассоциацию с целевым признаком. Исключение составил гибрид материнской восприимчивой линии ВК678 и устойчивой линии RGM (рис. 2, № 16). У этого гибрида на электрофореграмме отсутствовал фрагмент ДНК, характерный для восприимчивого фенотипа. Для последующего анализа были взяты следующие генотипы: линия ВК678 и два гибрида – F₁ (ВК678 × RGB) и F₁ (ВК678 × RGP2). В качестве положительного контроля использовали гибридную комбинацию F₁ (ВК680 × RGP1). Проведены

две ПЦР: отдельно с маркером SORS1 и мультиплексом RORS1/SORS1 (рис. 3).

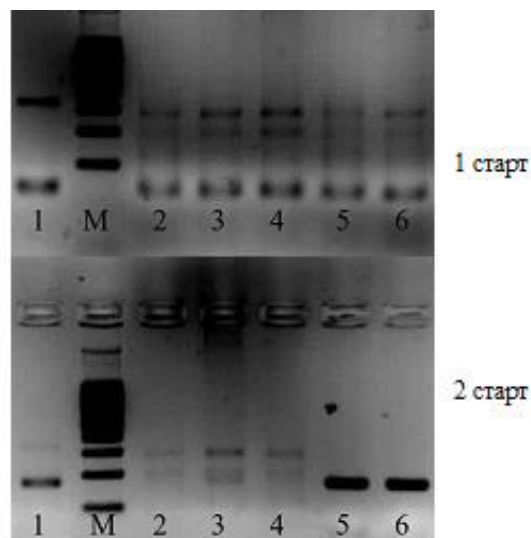


Рисунок 3 – Электрофоретические спектры амплифицированных фрагментов ДНК: 1 старт – с маркером SORS1; 2 старт – с маркерами RORS1/SORS1.

Дорожки: 1 – F₁ (ВК680 × RGP1); М – маркер молекулярного веса; 2–4 – ВК678; 5 – F₁ (ВК678 × RGB); 6 – F₁ (ВК678 × RGP1)

В ходе обеих реакций контрольная гибридная комбинация F₁ (ВК678 × RGP1) повторно показала ожидаемые результаты: с маркером SORS1 получен один ПЦР продукт длиной ≈ 322 п.н., а в мультиплексной реакции RORS1/SORS1 получены два фрагмента ДНК размером ≈ 168 и 322 п.н. соответственно. У линии ВК678 использование маркера SORS1 привело к образованию двух неспецифичных продуктов длиной ≈ 300 и 200 п.н. Данный эффект наблюдался в обеих ПЦР с маркером SORS1 только у линии ВК678 и гибридов F₁ (ВК678 × RGB) и F₁ (ВК678 × RGP1). В мультиплексной ПЦР у этих гибридов амплифицировались фрагменты ДНК длиной ≈ 168 п.н., соответствующие специфичному ПЦР-продукту маркера RORS1 и характеризующие родительские линии RGB и RGP2, а также отсутствовали неспецифичные продукты ПЦР. Таким

образом, появление неспецифичных продуктов ПЦР наблюдалось у линии ВК678 и у гибридов, где она являлась родительской формой, только при отсутствии специфичной гибридизации праймеров маркера RORS1 с ДНК-матрицей. Это ограничило использование разработанной мультиплексной системы RORS1/SORS1 при анализе гибридов с линией ВК678.

Для устранения данного недостатка были *in silico* разработаны семь SCAR-маркеров аллеля дикого типа, альтернативных маркеру SORS1, с учетом совместимости с маркером RORS1 для постановки мультиплексной ПЦР. Новые маркеры были проверены на 30 линиях и гибридах подсолнечника селекции ВНИИМК, включая ВК678. В результате был отобран маркер SORS9. Он продемонстрировал стабильную амплификацию фрагмента ДНК с ожидаемым размером ≈ 217 п.н. у восприимчивых генотипов и отсутствие неспецифичного ПЦР-продукта в реакциях с устойчивыми линиями. Возможность постановки мультиплексной ПЦР с маркерами RORS1/SORS9 была проверена на 13 линиях и гибридах селекции ВНИИМК (рис. 4).

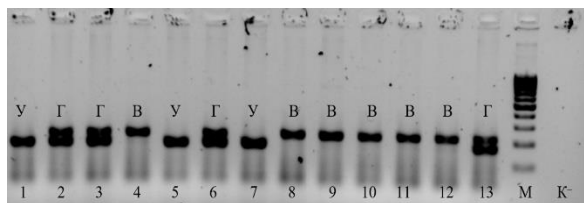


Рисунок 4 – Электрофоретические спектры амплифицированных фрагментов ДНК мультиплексной ПЦР с маркерами RORS1/SORS9. Дорожки: 1 – RGM; 2 – F₁ (ВК680 × RGM); 3 – F₁ (ВК680 × RGP1); 4 – ВК678; 5 – RGB; 6 – F₁ (ВК678 × RGP1); 7 – RG; 8 – ВК304; 9 – ВК551; 10 – ВА389; 11 – ВА568; 12 – ВК508; 13 – F₁ (ВК678 × RGM); М – маркер молекулярного веса; К – отрицательный контроль

Результаты анализа 13 генотипов подсолнечника с помощью мультиплексной

ПЦР с маркерами RORS1/SORS9 показали полное соответствие ожидаемых *in silico* и полученных ПЦР-продуктов – RORS1 ≈ 168 п.н. и SORS9 ≈ 217 п.н. Гибридные растения подсолнечника, полученные от скрещивания восприимчивого и устойчивого растений, характеризовались наличием обоих фрагментов.

Для последующей валидации разработанной системы маркеров был проведен анализ по наличию/отсутствию ПЦР-продуктов каждого маркера мультиплексной системы на 70 генотипах подсолнечника: 57 устойчивых и восприимчивых к расе G заразики линий, в том числе двух линиях-дифференциаторах к расе F заразики, пяти устойчивых и 10 восприимчивых гибридов (рис. 5).

Все устойчивые к расе G заразики линии подсолнечника характеризовались наличием ПЦР-продукта длиной ≈ 168 п.н., специфичного маркеру RORS1, и отсутствием фрагмента ДНК длиной ≈ 217 п.н., специфичного маркеру SORS9. Все восприимчивые линии, в том числе две линии-дифференциатора к расе F, а также восприимчивые гибриды показали наличие специфичного ПЦР-продукта только маркера SORS9. Устойчивые гибриды характеризовались наличием обоих фрагментов ДНК маркеров RORS1 и SORS9.

Характеристика разработанных маркеров RORS1 и SORS9 представлена в таблице 2.

Таблица 2

Характеристика разработанных маркеров RORS1 и SORS9

Название маркера	Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Длина амплифицируемого фрагмента ДНК, п.н.
RORS1	RORS1 F	ACCATCTTTGCT TCCTATGGCA	168
	RORS1 R	CGTCAACCTTCT ATGTCGCT	
SORS9	SORS9 F	AGTGCATTTCGC AATCTTCGC	217
	SORS9 R	TGCCATCCTCAT CATTAAGGG	

**Анализ ассоциации маркерной системы
с признаком устойчивости подсолнечника к расе G зарази**

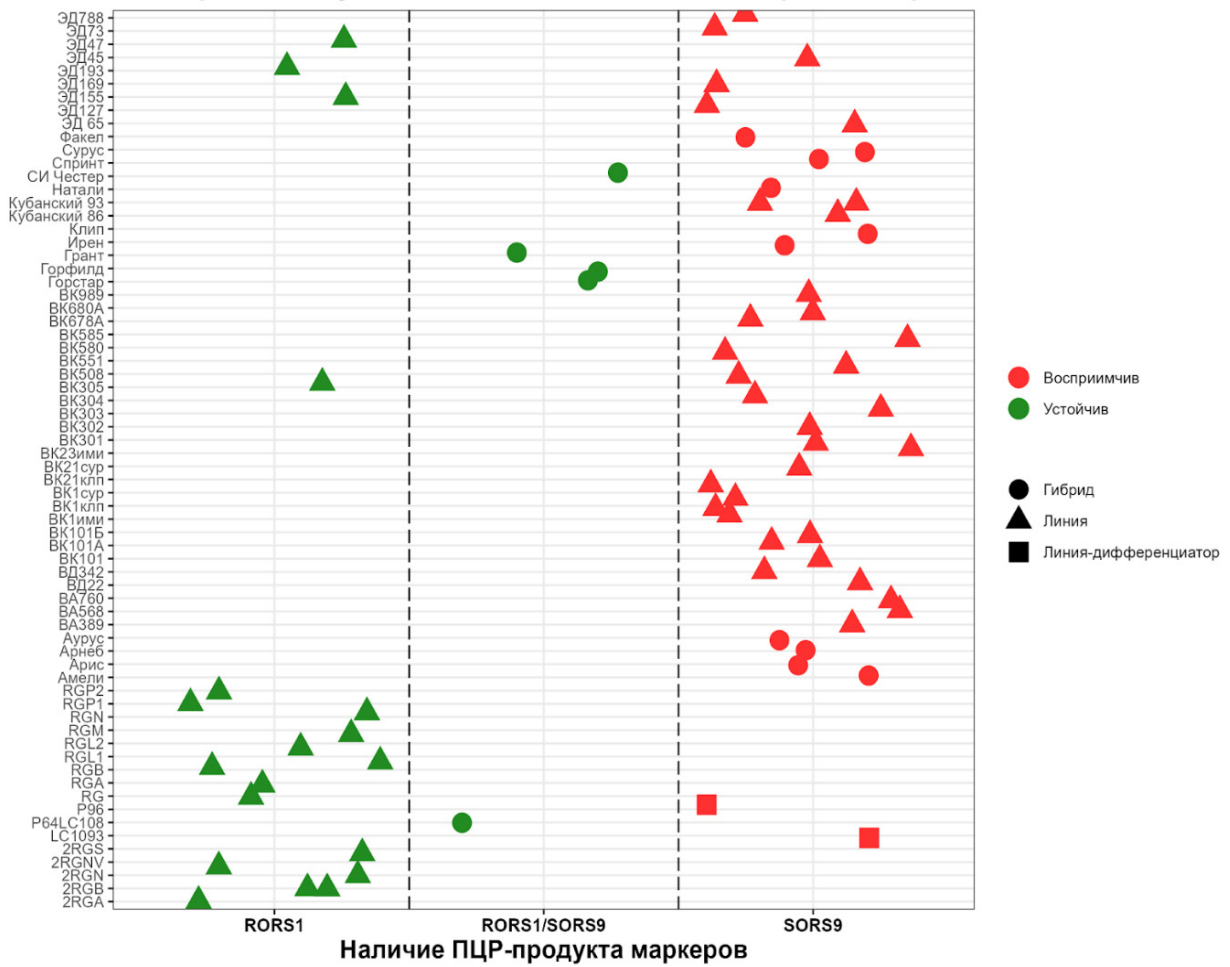


Рисунок 5 – Результаты анализа ассоциации маркерной системы RORS1/SORS9 с признаком устойчивости подсолнечника к расе G зарази

Результаты наших исследований позволяют сделать вывод, что ген устойчивости к расе G заразики у подсолнечника, возделываемого на территории РФ, локализуется на хромосоме 7 и является идентичным гену устойчивости к расе F *HaOr7*, описанному Duriez *et al.* [13]. Однако на данный момент не были опубликованы ДНК-маркеры данного гена, что впервые в мире было сделано в нашей работе. В исследовании Martín-Sanz *et al.* сообщалось, что этот ген также может контролировать устойчивость к расам выше F [14], что и было подтверждено с помощью разработанных нами маркеров. Для дальнейшей валидации маркерной системы получены семена самоопыленных гибридов, которые участвовали в данном исследовании. Будет проведен анализ сцепления маркерных фрагментов ДНК с целевым признаком в расщепляющихся популяциях F₂.

Заключение. Разработаны надежные SCAR маркеры RORS1 и SORS9 и создана маркерная система для мультиплексной ПЦР на наличие/отсутствие признака устойчивости к расе G заразики в растениях подсолнечника. По результатам анализа 70 генотипов подсолнечника, отличающихся по устойчивости к расе G заразики, установлено, что разработанная маркерная система позволяет различать устойчивые и восприимчивые линии подсолнечника, а также гибриды F₁. Для дальнейшей валидации маркерной системы будет проведен анализ расщепляющихся популяций F₂.

Список литературы

1. Staughton J. The amazing benefits of sunflower oil // Oilseeds Focus. – 2019. – V. 5. – I. 2. – P. 40–41.
2. Cvejić S., Radanović A., Dedić B., Jocković M., Jocić S., Miladinović D. Genetic and genomic tools in sunflower breeding for broomrape resistance // Genes. – 2020. – Vol. 11. – No. 2. – P. 152.
3. Антонова Т.С., Арасланова Н.М., Саукова С.Л., Ивевор М.В. К вопросу о засоренности полей в регионах РФ семенами заразики (*Orobanche cumanica* Wallr.) – облигатного пара-

зита подсолнечника // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2022. – № 4. – С. 29–32. DOI: 10.31857/2500-2082/2022/4/29-32.

4. Лукомец В.М., Трунова М.В., Демурич Я.Н. Современные тренды селекционно-генетического улучшения сортов и гибридов подсолнечника во ВНИИМК // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2021. – Т. 25. – № 4. – С. 388–393.

5. Антонова Т.С., Стрельников Е.А., Арасланова Н.М., Гучетль С.З., Челюстникова Т.А. Отбор на устойчивость к расе G заразики из расщепляющихся популяций подсолнечника в искусственных условиях выращивания // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2017. – Вып. 3 (171). – С. 18–22.

6. Davar R., Darvishzadeh R., Ahmad M. [et al.]. QTL mapping of partial resistance to basal stem rot in sunflower using recombinant inbred lines // Phytopathol. Mediterr. – 2010. – V. 49. – I. 3. – P. 330–341.

7. Dimitrijevic A., Horn R. Sunflower hybrid breeding: from markers to genomic selection // Front Plant Sci. – 2018. – V. 8. – P. 2238. DOI: 10.3389/fpls.2017.02238.

8. Dimitrijević A., Imerovski I., Miladinović D. [et al.]. Oleic acid variation and marker-assisted detection of Pervenets mutation in high-and low-oleic sunflower cross // Crop Breed. Appl. Biotechnol. – 2017. – V. 17. – I. 3. – P. 235–241. DOI: 10.1590/1984-70332017v17n3a36.

9. Rauf S., Warburton M., Naeem A., Kainat W. Validated markers for sunflower (*Helianthus annuus* L.) breeding // OCL. – 2020. – V. 27. – P. 47.

10. Tang S., Heesacker A., Kishore V.K., Fernandez A., Sadik E.S., Cole G., Knapp S.J. Genetic mapping of the *Or₅* gene for resistance to *Orobanche* race E in sunflower // Crop Science. – 2003. – Vol. 43. – No. 3. – P. 1021–1028.

11. Imerovski I., Dimitrijević A., Miladinović D., Dedić B., Jocić S., Tubić N.K., Cvejić S. Mapping of a new gene for resistance to broomrape races higher than F // Euphytica. – 2016. – Vol. 209. – P. 281–289.

12. Imerovski I., Dedić B., Cvejić S., Miladinović D., Jocić S., Owens G.L., Rieseberg L.H. BSA-seq mapping reveals major QTL for broomrape resistance in four sunflower lines // Molecular Breeding. – 2019. – Vol. 39. – P. 1–15.

13. Duriez P., Vautrin S., Auriac M.C., Bazerque J., Boniface M.C., Callot C. [et al.]. A receptor-like kinase enhances sunflower resistance to *Orobanche cumanica* // Nature Plants. – 2019. – Vol. 5. – No. 12. – P. 1211–1215.

14. Martín-Sanz A., Pérez-Vich B., Rueda S., Fernández-Martínez J.M., Velasco L. Character-

rization of post-haustorial resistance to sunflower broomrape // *Crop Science*. – 2020. – Vol. 60. – No. 3. – P. 1188–1198. DOI: 10.1002/csc2.20002.

15. *Fernández-Aparicio M., Del Moral L., Muños S., Velasco L., Pérez-Vich B.* Genetic and physiological characterization of sunflower resistance provided by the wild-derived *Or_{Deb2}* gene against highly virulent races of *Orobanche cumana* Wallr. // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2022. – Vol. 135. – No. 2. – P. 501–525.

16. *Гучетль С.З., Савиченко Д.Л.* Анализ сцепления гена устойчивости к расе G заразики с микросателлитными локусами у линии-донора подсолнечника селекции ВНИИМК RGP1 // *Масличные культуры*. – 2021. – Вып. 2 (186). – С. 3–9.

17. База данных открытого доступа GenBank: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

18. *Wang X., Wang L.* GMATA: an integrated software package for genome-scale SSR mining, marker development and viewing // *Frontiers in Plant Science*. – 2016. – Vol. 7. – P. 1350. DOI: 10.3389/fpls.2016.01350.

19. Онлайн-ресурс Primer-BLAST: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>.

20. *Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I.* [et al.]. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // *BMC Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 13. – No. 134. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.

21. *Badouin H., Gouzy J., Grassa C.J.* [et al.]. The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution // *Nature*. – 2017. – Vol. 546. – No. 7656. – P. 148–152. DOI: 10.1038/nature22380.

22. Референсный геном подсолнечника: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_002127325.2.

23. *Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.* Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 28. – No. 8. – P. 1166–1167. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091.

24. *Wickham H.* Elegant graphics for data analysis (ggplot2) // *Applied Spatial Data Analysis R*. – 2009. – P. 65–90.

25. Программная среда R для статистических вычислений и графики: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.r-project.org/>

26. *Boom R., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M.* [et al.]. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // *Journal of clinical microbiology*. – 1990. – Vol. 28. – No. 3. – P. 495–503.

27. Онлайн-ресурс Multiple Primer Analyzer: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.thermofisher.com/nl/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>.

References

1. Staughton J. The amazing benefits of sunflower oil // *Oilseeds Focus*. – 2019. – V. 5. – I. 2. – P. 40–41.

2. *Cvejić S., Radanović A., Dedić B., Jocković M., Jocić S., Miladinović D.* Genetic and genomic tools in sunflower breeding for broomrape resistance // *Genes*. – 2020. – Vol. 11. – No. 2. – P. 152.

3. *Antonova T.S., Araslanova N.M., Saukova S.L., Ivebor M.V.* K voprosu o zasorenosti poley v regionakh RF semenami zaraziki (Orobanche cumana Wallr.) – obligatnogo parazita podsolnechnika // *Vestnik rossiyskoy sel'skokhozyaystvennoy nauki*. – 2022. – № 4. – S. 29–32. DOI: 10.31857/2500-2082/2022/4/29-32.

4. *Lukomets V.M., Trunova M.V., Demurin Ya.N.* Sovremennye trendy selektsionno-geneticheskogo uluchsheniya sortov i gibridov podsolnechnika vo VNIIMK // *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii*. – 2021. – T. 25. – № 4. – S. 388–393.

5. *Antonova T.S., Strelnikov E.A., Araslanova N.M., Guchetl' S.Z., Chelyustnikova T.A.* Otkor na ustoychivost' k rase G zaraziki iz rassheplyayushchikhsya populyatsiy podsolnechnika v iskusstvennykh usloviyakh vyrashchivaniya // *Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK*. – 2017. – Vyp. 3 (171). – S. 18–22.

6. *Davar R., Darvishzadeh R., Ahmad M.* [et al.]. QTL mapping of partial resistance to basal stem rot in sunflower using recombinant inbred lines // *Phytopathol. Mediterr.* – 2010. – V. 49. – I. 3. – P. 330–341.

7. *Dimitrijevic A., Horn R.* Sunflower hybrid breeding: from markers to genomic selection // *Front Plant Sci*. – 2018. – V. 8. – P. 2238. DOI: 10.3389/fpls.2017.02238.

8. *Dimitrijević A., Imerovski I., Miladinović D.* [et al.]. Oleic acid variation and marker-assisted detection of Pervenets mutation in high- and low-oleic sunflower cross // *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* – 2017. – V. 17. – I. 3. – P. 235–241. DOI: 10.1590/1984-70332017v17n3a36.

9. *Rauf S., Warburton M., Naeem A., Kainat W.* Validated markers for sunflower (*Helianthus annuus* L.) breeding // *OCL*. – 2020. – V. 27. – P. 47.

10. Tang S., Heesacker A., Kishore V.K., Fernandez A., Sadik E.S., Cole G., Knapp S.J. Genetic mapping of the Or5 gene for resistance to Orobanchaceae race E in sunflower // *Crop Science*. – 2003. – Vol. 43. – No. 3. – P. 1021–1028.
11. Imerovski I., Dimitrijević A., Miladinović D., Dedić B., Jocić S., Tubić N.K., Cvejić S. Mapping of a new gene for resistance to broomrape races higher than F // *Euphytica*. – 2016. – Vol. 209. – P. 281–289.
12. Imerovski I., Dedić B., Cvejić S., Miladinović D., Jocić S., Owens G.L., Rieseberg L.H. BSA-seq mapping reveals major QTL for broomrape resistance in four sunflower lines // *Molecular Breeding*. – 2019. – Vol. 39. – P. 1–15.
13. Duriez P., Vautrin S., Auriac M.C., Bazerque J., Boniface M.C., Callot C. [et al.]. A receptor-like kinase enhances sunflower resistance to Orobanchaceae cumana // *Nature Plants*. – 2019. – Vol. 5. – No. 12. – P. 1211–1215.
14. Martín-Sanz A., Pérez-Vich B., Rueda S., Fernández-Martínez J.M., Velasco L. Characterization of post-haustorial resistance to sunflower broomrape // *Crop Science*. – 2020. – Vol. 60. – No. 3. – P. 1188–1198. DOI: 10.1002/csc2.20002.
15. Fernández-Aparicio M., Del Moral L., Muños S., Velasco L., Pérez-Vich B. Genetic and physiological characterization of sunflower resistance provided by the wild-derived OrDeb2 gene against highly virulent races of Orobanchaceae cumana Wallr. // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2022. – Vol. 135. – No. 2. – P. 501–525.
16. Guchetl' S.Z., Savichenko D.L. Analiz stsepleniya gena ustoychivosti k rase G zarazikh s mikrosatelitnymi lokusami u linii-donora podsolnechnika selektsii VNIIMK RGP1 // *Maslichnye kul'tury*. – 2021. – Vyp. 2 (186). – S. 3–9.
17. Baza dannykh otkrytogo dostupa GenBank: [Elektronnyy resurs]. – Rezhim dostupa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
18. Wang X., Wang L. GMATA: an integrated software package for genome-scale SSR mining, marker development and viewing // *Frontiers in Plant Science*. – 2016. – Vol. 7. – P. 1350. DOI: 10.3389/fpls.2016.01350.
19. Onlayn-resurs Primer-BLAST: [Elektronnyy resurs]. – Rezhim dostupa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>.
20. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I. [et al.]. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // *BMC Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 13. – No. 134. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.
21. Badouin H., Gouzy J., Grassa C.J. [et al.]. The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution // *Nature*. – 2017. – Vol. 546. – No. 7656. – P. 148–152. DOI: 10.1038/nature22380.
22. Referensnyy genom podsolnechnika: [Elektronnyy resurs]. – Rezhim dostupa: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_002127325.2.
23. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 28. – No. 8. – P. 1166–1167. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091.
24. Wickham H. Elegant graphics for data analysis (ggplot2) // *Applied Spatial Data Analysis R*. – 2009. – P. 65–90.
25. Programmnyaya sreda R dlya statisticheskikh vychisleniy i grafiki: [Elektronnyy resurs]. – Rezhim dostupa: <https://www.r-project.org/>
26. Boom R., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M. [et al.]. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // *Journal of clinical microbiology*. – 1990. – Vol. 28. – No. 3. – P. 495–503.
27. Onlayn-resurs Multiple Primer Analyzer: [Elektronnyy resurs]. – Rezhim dostupa: <https://www.thermofisher.com/nl/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>.

Сведения об авторах

Д.Л. Савиченко, млад. науч. сотр.

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

Е.Д. Логинова, лаборант-исследователь

Получено/Received

06.03.2023

Получено после рецензии/Manuscript peer-reviewed

09.03.2023

Получено после доработки/Manuscript revised

14.03.2023

Принято/Accepted

23.03.2023

Manuscript on-line

30.05.2023