

УДК 633.854.78:575:632.9

DOI 10.30679/2587-9847-2023-37-73-76

ВАЛИДАЦИЯ ДНК-МАРКЕРА УСТОЙЧИВОСТИ ПОДСОЛНЕЧНИКА К РАСЕ G ЗАРАЗИХИ НА МАЛЫХ ВЫБОРКАХ

Савиченко Д.Л., Логинова Е.Д., Гучетль С.З. канд. биол. наук.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта» (Краснодар)

Реферат. Проведен анализ генотипического (по ДНК-маркеру) и фенотипического расщепления 57 растений из потомства двух гетерозиготных F₁ гибридов подсолнечника по показателю устойчивости к расе G заразихи. Наблюдаемое расщепление по генотипу достоверно соответствовало теоретически ожидаемым в моногибридных скрещиваниях по моделям 3:1 и 1:2:1. Расщепление по фенотипу полностью совпадало с расщеплением по маркеру модели 3:1. Разработанный маркер позволяет проводить отбор по признаку устойчивости подсолнечника к расе G заразихи.

Ключевые слова. ДНК-маркер, устойчивость, *Helianthus annuus*, *Orobanche cumana*, маркер-вспомогательная селекция

Summary. The genotypic and phenotypic segregation of 57 plants of a progeny of two heterozygous F₁ sunflower hybrids was analyzed (by DNA-marker) by a trait of resistance to a broomrape race G. The observed segregation by a genotype corresponded reliably to the theoretically expected ones in monohybrid crosses due to models 3:1 and 1:2:1. The segregation by a phenotype corresponded completely to the segregation by a marker of a model 3:1. A developed marker allows selecting by a trait of sunflower resistance to the broomrape race G.

Key words. DNA-marker, resistance, *Helianthus annuus*, *Orobanche cumana*, marker-assisted breeding

Введение. Растение паразит – заразиха кумская (*Orobanche cumana* Wallr.) является наибольшей угрозой для урожая подсолнечника. На данный момент самой вирулентной расой заразихи в Краснодарском крае является раса G [1]. Одним из самых эффективных и экологичных способов борьбы является создание устойчивых генотипов подсолнечника [2]. Селекция на устойчивость ведется посредством фитопатологической оценки растений подсолнечника [3]. Такой подход является надежным, однако связан с высокими трудозатратами, недостаточной пропускной способностью и сезонным характером анализов. Применение ДНК-маркеров в селекционном процессе является мощным инструментом повышения его эффективности [4-6].

Ранее нами был разработан кодоминантный ДНК-маркер гена *HaOr7* [7] и показано, что данный ген несут все линии и коммерческие гибриды подсолнечника устойчивые к расе G заразихи [8]. Целью данного исследования являлась валидация разработанного ДНК-маркера в расщепляющихся популяциях на малых выборках.

Объекты и методы исследований. Растительный материал – 57 растений подсолнечника, полученных лабораторией генетики ВНИИМК из потомства двух самоопыленных гибридов F₁. Из них 37 от самоопыления одного растения коммерческого гибрида СИ Честер (Syngenta, Швейцария) и 20 растений от комбинации скрещивания F₁ ВК680 × RG, где ВК680 восприимчивая линия селекции ВНИИМК, а RG линия-донор устойчивости к расе G заразихи. Фитопатологическая оценка растений на устойчивость к

расе G заразили проводилась лабораторией иммунитета по методикам, принятым во ВНИИМК [9,10].

Для экстракции ДНК, в фазе первых настоящих листьев отбирали по 100 мг растительного материала с каждого растения. Выделение и очистка проводилась с помощью набора МагноПрайм® ФИТО (НекстБио, РФ) и автоматической станции 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 10x ПЦР-Буфер-Б для Taq ДНК-полимеразы; 0,2 mM каждого дезоксирибонуклеозидфосфата; по 10 pM 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 °C, затем 35 циклов: денатурация 94 °C – 30 сек, отжиг при 60 °C в течение 40 сек, элонгация – 40 сек при 72 °C, финальная элонгация – 5 мин.

ПЦР проводили с использованием разработанного нами ДНК-маркера устойчивости к расе G заразили, состоящего из двух SCAR маркеров для мультиплексной ПЦР [8].

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).

Математическую обработку результатов фенотипического и генотипического расщеплений проводили с помощью пакета stats для программной среды R версии 4.2.3 с использованием χ^2 -критерия соответствия фактических значений, теоретически ожидаемым в моногибридных скрещиваниях [11]. Визуализацию данных проводили с помощью пакета ggplot2 для R [12].

Обсуждение результатов. Изучали потомство двух гибридных комбинаций в поколении F₂ от скрещивания восприимчивых и устойчивой линий. Для получения объективных результатов ПЦР-анализ проводили в ранней фазе вегетации растений до проведения фитопатологической оценки. Результаты генотипического расщепления по ДНК-маркеру проверяли с помощью χ^2 -критерия по моногибридному скрещиванию (табл. 1).

Таблица 1 – Результаты генотипического расщепления растений поколения F₂

Гибридная комбинация	Всего растений, шт.	Теоретически ожидаемое расщепление	Наблюдаемое расщепление	df	χ^2	P
F ₂ СИ Честер	37	3:1	28:9	1	0,01	0,92
F ₂ СИ Честер	37	1:2:1	12:16:9	2	1,16	0,56
F ₂ ВК680 × RG	20	3:1	14:6	1	0,27	0,61
F ₂ ВК680 × RG	20	1:2:1	4:10:6	2	0,40	0,82

Для изученных гибридных комбинаций χ^2 -критерий достоверно подтверждал соответствие наблюдаемых расщеплений теоретически ожидаемым. В популяции F₂ СИ Честер уровни значимости составили 0,92 для модели 3:1 и 0,56 для модели 1:2:1, а для

популяции F₂ ВК680 × RG – 0,61 и 0,82, соответственно. Таким образом, комбинация скрещивания пригодна для дальнейшего фенотипического анализа.

Каждое проанализированное растение было промаркировано и проведена фитопатологическая оценка на устойчивость к расе G заразики (табл. 2).

Таблица 2 – Результаты фенотипического расщепления растений поколения F₂

Гибридная комбинация	Всего растений, шт.	Теоретически ожидаемое расщепление	Наблюдаемое расщепление	df	χ^2	P
Расщепление по фенотипу						
F ₂ СИ Честер	37	3:1	28:9	1	0,01	0,92
F ₂ ВК680 × RG	20	3:1	14:6	1	0,27	0,61

Количество растений из устойчивого и восприимчивого классов было идентично таковому по наличию и отсутствию гена *HaOr7*, установленного с помощью ДНК-маркера. Таким образом, фенотипическое расщепление полностью повторило генотипическое по модели 3:1, где доминантным классом были растения, несущие ген *HaOr7*.

Для установления связи ДНК-маркера на наличие гена *HaOr7* с устойчивым классом растений, информацию по полученному генотипу и степени поражения, выраженной количеством клубеньков заразики на каждом из растений, внесли в 2 независимых набора данных, и сопоставили в программной среде R с помощью пакета ggplot2 (рис.).

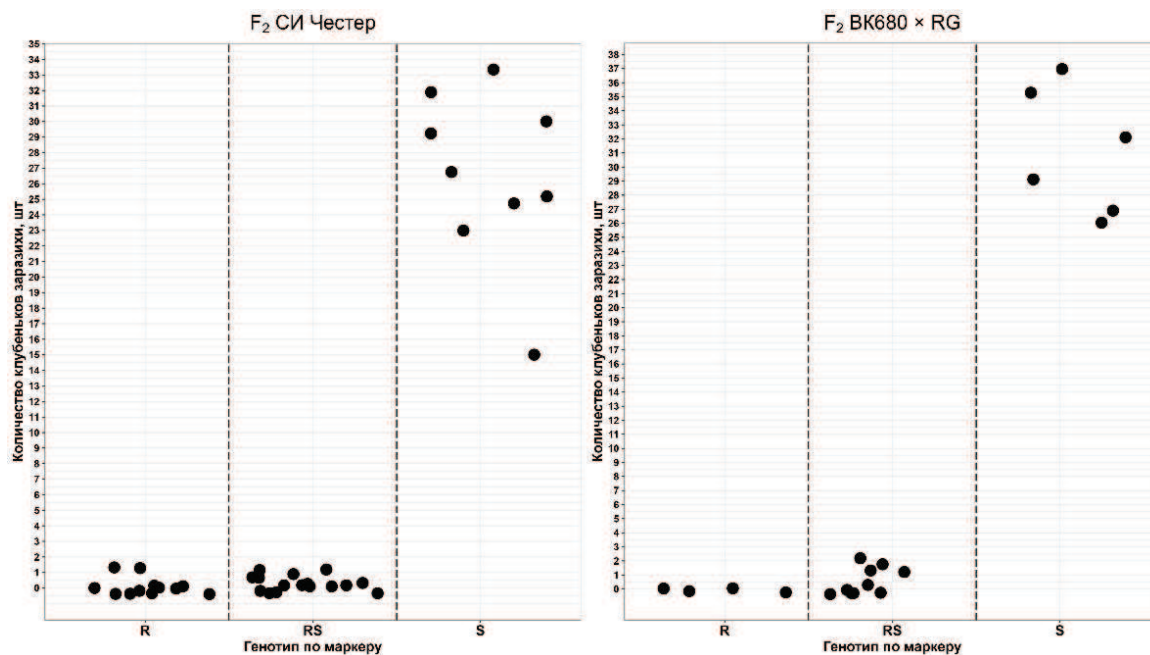


Рис. Степень поражения растений подсолнечника заразихой в зависимости от генотипа. R – гомозигота *HaOr7*, RS – гетерозигота, S – гомозигота дикого типа

Растения, несущие ген *HaOr7*, в том числе гетерозиготные, показали устойчивость к расе G заразики, а восприимчивыми оказались все гомозиготные растения, несущие аллель дикого типа. Исходя из вышеописанного, в совокупности с ранее полученными данными, можно сделать вывод, что доминантный ген *HaOr7* контролирует устойчивость к расе G заразики, что требует дополнительных доказательств. С этой целью нами были получены 3 новые гибридные комбинации восприимчивых и устойчивых линий подсолнечника для увеличения выборки более 100 растений.

Выводы. Проведенная первичная валидация разработанного ДНК-маркера устойчивости подсолнечника к расе G заразихи на малых выборках показала 100 % соответствие генотипа, определенного с помощью маркера, и фенотипа данного признака, что, в совокупности с ранее полученными данными, говорит о перспективности применения разработанного маркера для отбора растений подсолнечника на устойчивость к заразихе. Работа по валидации будет продолжена на увеличенных выборках.

Литература.

1. Антонова Т.С., Арасланова Н.М., Саукова С.Л., Ивевбор М.В. К вопросу о засоренности полей в регионах РФ семенами заразихи (*Orobanche cumana* Wallr.) облигатного паразита подсолнечника // Вестник российской сельскохозяйственной науки. 2022. № 4. С. 29-32.
2. Лукомец В.М., Трунова М.В., Демуринов 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.
3. Антонова Т.С., Стрельников Е.А., Арасланова Н.М., Гучетль С.З., Челюстникова Т.А. Отбор на устойчивость к расе G заразихи из расщепляющихся популяций подсолнечника в искусственных условиях выращивания // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. 2017. № 3 (171). С. 18-22.
4. Dimitrijevic A., Horn R. Sunflower hybrid breeding: from markers to genomic selection [Электронный ресурс] // Front Plant Sci. 2018. Vol. 8. 2238. DOI: 10.3389/fpls.2017.02238.
5. Dimitrijevic A., Imerovski I., Miladinović D., Cvejić S., Jocić S., Zeremski T., Sakac Z. Oleic acid variation and marker-assisted detection of Pervenets mutation in high-and low-oleic sunflower cross // Crop Breed Appl Biotechnol. 2017. Vol.17(3). P. 235-241. DOI: 10.1590/1984-70332017v17n3a36.
6. 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 (2). 152. DOI: 10.3390/genes11020152.
7. Duriez P. A receptor-like kinase enhances sunflower resistance to *Orobanche cumana* / P. Duriez, S. Vautrin, M. Auriac [et al.]. //Nature Plants. 2019. Vol. 5 (12). P. 1211-1215.
8. Савиченко, Д. Л., Гучетль С. З., Логинова Е. Д. Разработка ДНК-маркеров признака устойчивости подсолнечника к расе G заразихи (*Orobanche cumana* Wallr.) // Масличные культуры. 2023. № 1(193). С. 3-13.
9. Антонова Т.С., Стрельников Е.А., Арасланова Н.М., Гучетль С.З., Челюстникова Т.А. Отбор на устойчивость к расе G заразихи из расщепляющихся популяций подсолнечника в искусственных условиях выращивания // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. 2017. № 3 (171). С. 18–22
10. Способ ускорения получения линии-донора устойчивости подсолнечника к заразихе расы G (*orobanche cumana* Wollr.) Патент РФ № 2720915 С1 / Т. С. Антонова, Н. М. Арасланова, С. З. Гучетль, Т. А. Челюстникова; заявл. 26.07.2019; опубл. 14.05.2020, Бюл. № 14. 8 с.
11. Программная среда R для статистических вычислений и графики [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.r-project.org/> (дата обращения: 11.07.2023).
12. Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag : New York. 2016. 268 с.