

УДК 631.523:633.854.78

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛОКУСОВ $Pl_5$ , $Pl_6$ И $Pl_8$ , КОНТРОЛИРУЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ К *Plasmopara halstedii* У ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА

**Бадьянов Е.В., Рамазанова С.А.**

350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17

ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

immunity@vniimk.ru

Ложная мучнистая роса – одно из наиболее вредоносных заболеваний подсолнечника. Эффективный метод контроля над возбудителем болезни *Plasmopara halstedii* – введение доминантных генов устойчивости к нему в растение-хозяина. Использование молекулярных ДНК-маркеров позволяет контролировать наличие этих генов на каждом этапе селекции. Апробированы девять STS и три SSR маркера генов  $Pl_5$ ,  $Pl_6$  и  $Pl_8$ , контролирующих устойчивость к расам *P. halstedii* для идентификации этих генов у линий дифференциаторов устойчивости подсолнечника, входящих в международный тест-набор для идентификации рас *P. halstedii*. Был подобран и протестирован праймер HaP3, пригодный для идентификации локуса  $Pl_6$ .

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

**Введение.** Одним из самых вредоносных заболеваний подсолнечника является ложная мучнистая роса, вызываемая оомицетом *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni. При благоприятных для возбудителя условиях, болезнь вызывает значительное сокращение урожая семян подсолнечника и содержания в них масла [1]. Одним из самых эффективных методов контроля над возбудителем болезни является введение доминантных генов устойчивости к нему в растение-хозяина. Устойчивость к *P. halstedii* контролируется генами *Pl*. Они идентифицированы как в культурном, так и в дикорастущем подсолнечнике. В настоящее время всего их насчитывается 28:  $Pl_{1-20}$ ,  $Pl_v$ ,  $Pl_w$ ,  $Pl_{x-z}$ ,  $Mw$ ,  $Mx$  и  $Pl_{ara}$  [2-6]. Перспективными из них представляются кластеры генов  $Pl_5$ ,  $Pl_6$  и  $Pl_8$ . Ген  $Pl_6$  расположен в восьмой группе сцепления LG и контролирует устойчивость к расам 100, 300, 700, 703, 710, 330, 770 и 730. А гены  $Pl_5$  и  $Pl_8$  сцеплены между собой, относятся к тринадцатой группе сцепления на генетической карте SSR-локусов и контролируют устойчивость к 16 расам *P. halstedii* [7].

Цель исследования – поиск ДНК-маркеров для идентификации кластеров генов  $Pl_5$ ,  $Pl_6$  и  $Pl_8$ , контролирующих устойчивость к *P. halstedii*, и создания на их основе системы маркеров с последующим использованием ее в селекционных программах, направленных на создание линий подсолнечника с комплексной устойчивостью к разным расам возбудителя ложной мучнистой росы.

**Материалы и методы.** Объектом исследования послужили 14 линий-дифференциаторов устойчивости подсолнечника, входящих в международный тест-набор для идентификации рас *P. halstedii* (табл. 1).

Для выделения ДНК применяли метод, основанный на использовании лизирующего буфера, содержащего гексадецилтриметиламмоний бромид (СТАВ) с модификациями [8, 9]. 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.

Для ПЦР анализа применили 12 праймеров, разработанных для маркирования генов  $PI_5$ ,  $PI_6$  и  $PI_8$  [7, 9-11]. Полимеразную цепную реакцию и электрофорез выполняли согласно модифицированной нами методике, описанной ранее [8, 12].

**Результаты и обсуждение.** По сообщениям многих авторов, каждая линия-дифференциатор устойчивости из международного тест набора для идентификации рас *P. halstedii* содержит один или несколько генов  $PI$ , которые обеспечивают их устойчивость к определенным расам патогена. В таблице представлены 14 линий подсолнечника, соответствующие им гены и группы сцепления, в которых они картированы на генетической карте SSR-локусов.

**Таблица – Линии-дифференциаторы устойчивости подсолнечника к поражению ложной мучнистой росой, содержащие известные гены  $PI$**

Линия-дифференциатор	$PI$ -ген	Группа сцепления	Литературный источник
RHA-419	$PI_{arg}$	LG1	Dussle et al., 2004
XRQ	$PI_5$	LG13	Bert et al., 2001
83HR4RM	$PI_7$	LG8	Jocić et al., 2012
HIR-34	$PI_4$	не определена	Jocić et al., 2012
PSC8	$PI_2$	LG8	Gascuel et al., 2014
YVQ	$PI_8$	LG13	Gascuel et al., 2014
HA-335	$PI_6$	LG8	Bouzidi et al., 2002
HA-R5	$PI_{13}$	LG1	Mulpuri et al., 2009
HA-R4	$PI_{16}$	LG1	Liu et al., 2012
803-1	$PI_5$	LG13	Gascuel et al., 2014
PM-17	$PI_5$	LG13	Gascuel et al., 2014
DM-2	$PI_5, PI_{11}, PI_{12}$	LG13	Rahim et al., 2002
RHA-274	$PI_2, PI_9, PI_{10}$	LG8	Gulya et al., 1991
RHA-265	$PI_1$	LG8	Gedil et al., 2001; Rahim M., 2002

Для поиска ДНК-маркеров генов устойчивости  $PI_5$ ,  $PI_6$  и  $PI_8$  к *P. halstedii* исследовали молекулярно-генетический полиморфизм 9 STS (Sequence-Tagged Site) и 3 SSR (Simple Sequence Repeat) локусов ДНК. Результаты ПЦР ДНК линий подсолнечника показали, что только с парой праймеров HaP1 не было получено амплифицированных фрагментов. По остальным 11 локусам были подобраны оптимальные параметры реакции амплификации и получен отжиг соответствующих праймеров на матрице. По четырем локусам: ORS 166, Ha-P3, Ha-P5 и Ha-P6 не было выявлено полиморфных фракций ДНК, поэтому эти маркеры были исключены из дальнейшего исследования.

По пяти локусам ORS 37, ORS 1043, Ha-P1, Ha-P2 и Ha-P4 выявлен полиморфизм в виде наличия-отсутствия фрагментов ДНК. В результате ПЦР с праймерами, фланкирующими эти микросателлитные и STS локусы, не было получено фрагментов ДНК, характерных для линии HA-335, в генотипе которой присутствует ген  $PI_6$ , так же, как и для линий XRQ, YVQ, и 803-1, PM-17, DM-2 – носителей кластеров генов  $PI_5/PI_8$ .

Праймер HaP3 – один из трех, разработанных для маркирования локуса  $PI_6$ . Он представляет собой кластер из 13 генов, близко расположенных друг к

другу, относящихся к TIR-NBS-LRR классу R-генов и картированных в группе сцепления LG8 на генетической карте SSR [13]. По данным авторов, эта праймерная пара дает 4 полиморфных фрагмента ДНК длиной от 988 до 1 811 пар нуклеотидов. Из них фракции длиной 988, 1 119 и 1 811 пар нуклеотидов выявлены у линий подсолнечника, устойчивых к расам 100, 300, 700, 703 и 710, а фрагмент длиной 1 406 – у восприимчивого к этим расам образца. В нашем исследовании у линии HA-335 по локусу HaP3 получено 2 фрагмента ДНК в указанном диапазоне длин (рисунок 1, дорожка 7). У линии PM-17 (рисунок 1, дорожка 11) не выявлено амплифицированных фрагментов ДНК, что может свидетельствовать об отсутствии у неё локуса *Pl<sub>8</sub>*. У остальных изученных двенадцати линий получены фрагменты ДНК разных длин, отличающиеся от таковых у линии HA-335 (рис. ).

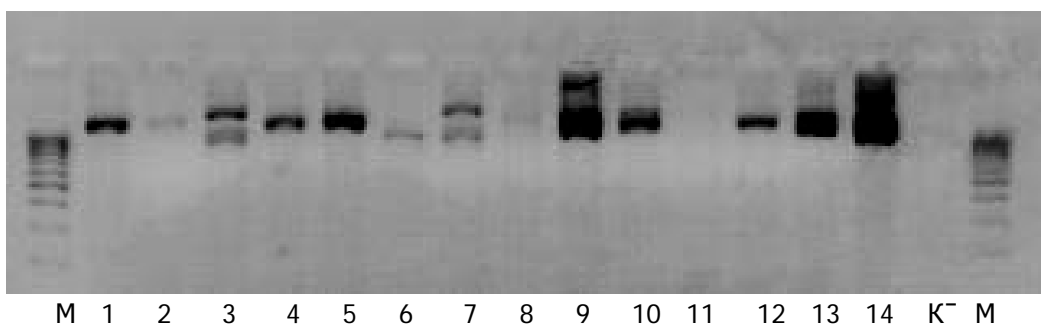


Рисунок – Фореграмма продуктов амплификации ДНК линий дифференциаторов подсолнечника с праймером HaP3

Дорожки: 1 – RHA419, 2 – XRO, 3 – 83HR4RM, 4 – HIR 34, 5 – PSC8, 6 – YVQ, 7 – HA335, 8 – HAR-5, 9 – HAR-4, 10 – 803-1, 11 – PM-17, 12 – DM-2, 13 – RHA274, 14 – RHA265, K<sup>-</sup> – отрицательный контроль, M – маркер молекулярного веса.

**Заключение.** В результате проведенного исследования был подобран и апробирован молекулярный STS-маркер HaP3, пригодный для идентификации локуса *Pl<sub>8</sub>*, контролирующего устойчивость подсолнечника к расам *P. halstedii* 100, 300, 700, 703, 710, 330, 770 и 730. Этот маркер может стать одним из звеньев системы ДНК маркеров для идентификации тесно сцепленных генов и проведения маркер-вспомогательной селекции на устойчивость подсолнечника к возбудителю ложной мучнистой росы.

#### Литература

1. Virányi F., Gulya T.J., Tourvierille 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.
2. Miller J.F. Registration of five oilseed sunflower germplasm restorer lines (RHA373-377) and two nuclear male-sterile populations (nms 274 and 801) // *Crop Sci.* – 1992. – V. 32 – P. 1298.
3. Bertero de Romano A., Romano C., Bulos M., Altieri E., Sala C. A new gene for resistance to downy mildew in sunflower // *Proc. Intern. Symposium "Sunflower Breeding on Resistance to Diseases"*. Russia, Krasnodar – 2010. – June 23-24.
4. Bachlava E, Radwan OE, Abratti G, Tang S, Gao W, Heesacker AF, Bazzalo ME, Zambelli A, Leon AJ, Knapp SJ. Downy mildew (*Pl<sub>8</sub>* and *Pl<sub>14</sub>*) and rust (*RAdv*) re-

- sistance genes reside in close proximity to tandemly duplicated clusters of non-TIR-like NBS-LRR-encoding genes on sunflower chromosomes 1 and 13 // *Theor. Appl. Genet.* – 2011. – V. 122 – P. 1211-1221.
5. Jocić S., Miladinović D., Imerivski I., Dimitrijević A., Cvejić S., Nagl N., Kondić-Špika A. Towards sustainable downy mildew resistance in sunflower // *Helia*. – 2012. – V. 35. – № 56 – P. 61-72.
6. Gascuel Q., Martinez Y., Boniface M.-C., Vear F., Pichon M., Godiard L. The sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii* // *Molecular Plant Pathology*. – 2014. – V. 16 (2). – P. 109–122. doi:10.1111/mpp.12164
7. Radwan O., Bouzid M.F., Vear F., Philippon J., Tourvieille de Labrouhe D., Nicolas P., Mouzeyar S. Identification of non-TIR-NBS-LRR markers linked to the P15/P18 locus for resistance to downy mildew in sunflower // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2003. – V. 106. – P. 1438–1446. doi : 10.1007/s00122-003-1196-1
8. Saghai-Marooif 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.
9. Zolan, M.E. Inheritance of DNA methylation in *Corpinus cinereous* // *Mol. Cell Biol.* – 1986. – T. 6, № 1. – P. 195-200.
10. Panković D., Radovanović N., Jocić S., Satovic Z., Škorić D. Development of Co-Dominant Amplified Polymorphic Sequence Markers for Resistance to Sunflower Downy Mildew Race 730 // *Plant Breeding*. – 2007. – V. 126 (4) – P. 440-444. doi10.1111/j.1439-0523.2007.01376.x.
11. Tang S., Yu J.-K., Slabaugh M.B., Shintani D.K., Knapp, S.J. Simple sequence repeat map of the sunflower genome // *Theoretical and Applied Genetics* – 2002. – V. 105 (8) – P. 1124–1136. doi:10.1007/s00122-002-0989-y
12. Рамазанова С.А., Антонова Т.С. Маркирование локусов  $Pl_5$ ,  $Pl_6$  и  $Pl_8$ , контролирующих устойчивость к *Plasmopara halstedii* у линий подсолнечника селекции ВНИИМК // *Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур*. – 2018. – Вып. 3 (175). – С. 19-27.
13. Bouzidi M.F., Badaoui S., Cambon F., Vear F., Tourvieille de Labrouhe D., Nicolas P., Mouzeyar S. Molecular analysis of a major locus for resistance to downy mildew in sunflower with specific PCR-based markers // *Theoretical and Applied Genetics* – 2002. – V. 104. – P. 592-600.
14. Dussle C.M., Hahn V., Knapp S.J., Bauer E. PI Arg from *Helianthus argophyllus* is unlinked to other known downy mildew resistance genes in sunflower // *Theoretical and Applied Genetics* – 2004. – V. 109 (5). – P. 1083-1086. doi:10.1007/s00122-004-1722-9
15. Bert P.F., Tourvieille de Labrouhe D., Philippon J., Mouzeyar S., Jouan I., Nicolas P., Vear F. Identification of a second linkage group carrying genes controlling resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2001. – V. 103 – P. 992-997.
16. Radwan O, Bouzidi MF, Nicolas P, Mouzeyar S. Development of PCR markers for the  $Pl_5/Pl_8$  locus for resistance to *Plasmopara halstedii* in sunflower, *Helianthus annuus* L. from complete CC-NBS-LRR sequences // *Theoretical and Applied Genetics* – 2004. – V. 10 – P. 176-185.
17. Mulpuri S., Liu Z., Feng J., Gulya T.J., Jan C.-C. Inheritance and molecular mapping of a downy mildew resistance gene, PI 13 in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2009. – V. 119 (5). – P. 795-803. doi:10.1007/s00122-009-1089-z

18. Liu Z., Gulya T.J., Seiler G.J., Vick B.A., Jan C.-C. Molecular mapping of the *Pl16* downy mildew resistance gene from HA-R4 to facilitate marker-assisted selection in sunflower // *Theoretical and Applied Genetics* – 2012. – V. 125. – P. 121-131.

19. Rahim M., Jan C.-C., Gulya T.J. Inheritance of resistance to sunflower downy mildew races 1, 2 and 3 in cultivated sunflower // *Plant Breed* – 2002 – V. 121 – P. 57-60.

20. Gulya T.J., Sackston W.E., Viranyi F., Masirevic S., Rashid K.Y. New Races of the Sunflower Downy Mildew Pathogen (*Plasmopara halstedii*) in Europe and North and South America // *Journal of Phytopathology*. – 1991. – V. 132(4). – P. 303-311. doi:10.1111/j.1439-0434.1991.tb00125.x

21. Gedil M.A., Slabaugh M.B., Berry S., Johnson R., Michelmore R., Miller J., Gulya T., Knapp S.J. Candidate disease resistance genes in sunflower cloned using conserved nucleotide-binding site motifs: Genetic mapping and linkage to the downy mildew resistance gene *Pl<sub>1</sub>* // *Genom* – 2001 – V. 44 (2). – P. 205-212.

### **IDENTIFICATION OF *PL<sub>5</sub>*, *PL<sub>6</sub>* AND *PL<sub>8</sub>* LOCI CONTROLLING RESISTANCE TO *PLASMOPARA HALSTEDII* IN SUNFLOWER LINES**

**Badyanov E.V., Ramazanova S.A.**

Downy mildew is considered one of the most dangerous diseases of sunflower. The effective method to control the pathogen of *Plasmopara halstedii* is introduction of the dominant genes of resistance into a host-plant. Usage of the molecular DNA-markers allows controlling these genes existence at every step of the breeding process. We tested nine STS and three SSR-markers of genes *Pl<sub>5</sub>*, *Pl<sub>6</sub>* and *Pl<sub>8</sub>*, which control resistance to races of *P. halstedii* to identify these genes in sunflower lines-differentiators of resistance. The used lines are included into an international test-set for identification of *P. halstedii* races. We chose and tested a primer HaP3 suitable for identification of a locus *Pl<sub>6</sub>*.

*Keywords:* DNA-markers, MAC, PI genes, *P. halstedii*, resistance, sunflower