На правах рукописи

САВИЧЕНКО ДМИТРИЙ ЛЕОНИДОВИЧ

ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ПОДСОЛНЕЧНИКА К РАСЕ G_{RU} ЗАРАЗИХИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ И РАЗРАБОТКА ДНК-МАРКЕРОВ ДАННОГО ПРИЗНАКА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В СЕЛЕКЦИИ

Специальность: 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений

АВТОРЕФЕРАТ
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в лаборатории молекулярно-генетических исследований отдела биологических исследований Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта»

Научный руководитель	**Гучетль Саида Заурбиевна**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярно-генетических исследований отдела биологических исследований, ФГБНУ «Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта»
Официальные оппоненты:	**Анисимова Ирина Николаевна**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела генетики, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»
	Черноок Анастасия Геннадьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией спидбридинга в селекции сельскохозяйственных культур, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»
Ведущая организация	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр риса»

Защита состоится «29» декабря 2026 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета 35.2.030.08 на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», по адресу: 127434, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 19, тел: 8 (499) 976-17-14.

Юридический адрес для отправки почтовой корреспонденции (отзывов): 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке имени Н.И. Железнова ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» и на сайте Университета: www.timacad.ru

Автореферат разослан «__» _____2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор с.-х. наук — Вертикова Елена Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы. Подсолнечник *Helianthus annuus* L. является одной из важнейших масличных культур в мире и имеет ключевое значения для агропромышленного комплекса Российской Федерации. Современное производство подсолнечника зависит от устойчивости возделываемых сортов и гибридов подсолнечника к биотическим факторам, лимитирующим реализацию их потенциала. Одним из самых опасных вредоносных объектов для культуры является заразиха кумская *Orobanche cumana* Wallr. – облигатный паразит подсолнечника, поражение которым может приводить к сильному снижению продуктивности вплоть до полной потери урожая. В настоящее время на территории Российской Федерации преобладает высоковирулентная раса G заразихи (G_{RU}). Наиболее эффективной стратегией борьбы с заразихой является применение комплекса мер, где одним из ключевых элементов выступает генетическая устойчивость к паразиту. Вместе с тем, по мере появления новых вирулентных рас, ранее созданные устойчивые генотипы и элементы контроля заразихи теряют актуальность, что делает необходимым непрерывный поиск новых средств снижения вредоносности патогена. Большое число исследований посвящено поиску генов устойчивости, их молекулярно-генетической идентификации и интрогрессии в селекционный материал. Особую практическую значимость имеет применение ДНК-маркеров в селекции подсолнечника, которые позволят проводить идентификацию аллельного состояния генов устойчивости, исследования признака и отбор независимо от условий выращивания растений, в том числе при ускоренной селекции в климатических камерах. Однако для эффективного применения этого подхода необходимы надежные, технологичные и валидированные ДНК-маркеры. Несмотря на ранее выполненные исследования признака устойчивости подсолнечника к расе G_{RU} заразихи и характера его наследования, отсутствуют ДНК-маркеры, которые могли бы быть использованы как в практической селекции, так и при изучении данного признака с применением молекулярно-генетических методов. В связи с этим разработка и валидация ДНК-маркера, ассоциированного с признаком устойчивости подсолнечника к расе G_{RU} заразихи является актуальной задачей.

Цель исследования: Изучить молекулярно-генетический контроль устойчивости подсолнечника к расе G_{RU} заразихи, разработать ДНК-маркеры, провести анализ их ассоциации с признаком, оценить применимость маркеров в условиях реального селекционного процесса.

Задачи исследования:

1. Провести анализ ассоциации микросателлитных локусов, расположенных в предполагаемой, по литературным данным, области

локализации гена и ранее ассоциированных с устойчивостью подсолнечника к заразихе;

2. Разработать новые ДНК-маркеры, провести анализ их ассоциации с признаком устойчивости подсолнечника к расе G_{RU} заразихи и валидацию перспективных маркеров на различающихся по устойчивости линиях, гибридах и расщепляющихся популяциях F_2;

3. Апробировать разработанные ДНК-маркеры в реальном селекционном процессе;

4. Изучить влияние аллельного состояния гена устойчивости, определенного с помощью ДНК-маркеров, и генетического фона на фенотипическое проявление устойчивости подсолнечника к расе G_{RU} заразихи;

5. Оценить распространенность маркированного гена устойчивости у возделываемых в РФ коммерческих гибридов подсолнечника, отнесенных к разным группам устойчивости к заразихе.

Научная новизна исследования. Впервые разработаны внутригенные кодоминантные ДНК-маркеры гена *HaOr7* подсолнечника, как для классической ПЦР (Патент № 2830955 C1, 2024), так и для ПЦР в реальном времени (Патент № 2851468 C1, 2025). На молекулярно-генетическом уровне экспериментально подтверждена роль данного гена как главной детерминанты устойчивости к расе G заразихи, распространенной в Российской Федерации (G_{RU}). Установлены особенности проявления неполного доминирования гена *HaOr7*, которое выражается в снижении доли полностью устойчивых гетерозиготных растений и увеличении числа клубеньков заразихи у пораженных. Обнаружено влияние генетического фона на проявление устойчивости. Впервые проведен молекулярно-генетический скрининг коммерческих гибридов подсолнечника по аллельному состоянию гена *HaOr7* и определено, что данный ген присутствует почти у всех гибридов подсолнечника, устойчивых к расе G_{RU} заразихи.

Теоретическая значимость работы. На молекулярно-генетическом уровне подтверждена роль гена *HaOr7* как ключевой детерминанты устойчивости подсолнечника к заразихе расы G_{RU} в настоящее время. Полученные результаты расширяют представления о проявлении устойчивости, контролируемой геном *HaOr7*, показывая, что различия между гомо- и гетерозиготами затрагивают как долю полностью устойчивых растений, так и количество клубеньков заразихи у пораженных. Установленная зависимость устойчивости от комбинации скрещивания подчеркивает значимость взаимодействия гена *HaOr7* с генетическим фоном. Выявленное преобладание гена *HaOr7* среди коммерческих гибридов свидетельствует о ключевой роли данного гена в обеспечении устойчивости к расе G_{RU} заразихи в агроценозах подсолнечника. Результаты исследования вносят вклад в понимание

молекулярно-генетических основ устойчивости подсолнечника к расе G_{RU} заразихи, расширяют представления о проявлении устойчивости.

Практическая значимость работы. Созданные внутригенные кодоминантные маркерные системы для классической ПЦР и ПЦР в реальном времени позволяют идентифицировать аллели гена *HaOr7* и различать гетеро- и гомозиготные растения. Это открывает возможности для проведения маркер-вспомогательного отбора по признаку устойчивости подсолнечника к расе G_{RU} заразихи на различных стадиях онтогенеза, в том числе до прорастания семян, что расширяет возможности селекционного процесса и позволяет ограничить фитопатологическую оценку заключительными этапами отбора. Разработанные маркеры успешно интегрированы в процесс создания устойчивых линий, гибридов и гомозиготных по целевому гену сортов кондитерского и масличного направления, расширяя возможности маркер-вспомогательной селекции подсолнечника в Российской Федерации.

Методология и методы исследования. Методология исследования основана на сочетании классических и современных фитопатологических, молекулярно-генетических, биоинформатических и статистических подходов. В работе использованы следующие методы:

– методы фитопатологической оценки (оценка устойчивости подсолнечника к расе G_{RU} заразихи в условиях защищенного грунта на искусственно созданном зараженном фоне; ранняя диагностика по А. Я. Панченко);

– методы молекулярно-генетического анализа (выделение геномной ДНК ЦТАБ-методом с модификациями и с использованием набора «МагноПрайм ФИТО» на автоматической станции Auto-pure 96; апробация, оптимизация и валидация SSR-, аллель-специфичных и TaqMan-маркеров; классическая ПЦР, мультиплексная ПЦР, ПЦР в реальном времени; визуализация продуктов амплификации методом электрофореза агарозном геле);

– биоинформатические методы (анализ нуклеотидных последовательностей по данным баз RefSeq и GenBank (NCBI); выравнивание последовательностей и анализ их специфичности с помощью BLAST, Primer-BLAST и UGENE; *in silico* разработка и оценка SSR-, аллель-специфичных и TaqMan-маркеров);

– статистические методы (анализ данных в программной среде R: критерий χ^2 Пирсона для оценки расщепления и ассоциации маркеров с признаком; критерий Шапиро–Уилка, критерий Краскела–Уоллиса, критерий Манна–Уитни; применение общих линейных моделей с отрицательным биномиальным распределением, ZINB- и Hurdle-моделей).

Положения, выносимые на защиту:

1. С использованием разработанных внутригенных кодоминантных маркеров установлено, что ген *HaOr7*, локализованный на 7-й хромосоме генома подсолнечника, идентичен ранее описанному гену Or_7 и контролирует устойчивость к расе G_{RU} заразихи, преобладающей на территории Российской Федерации.

2. Вклад аллельного состояния гена *HaOr7* в формирование устойчивости подсолнечника к расе G_{RU} заразихи при дополнительном влиянии генетического фона выражается как в вероятности полной устойчивости, так и в количестве клубеньков у пораженных растений.

3. Выявленное наличие гена *HaOr7* практически во всех исследованных устойчивых коммерческих гибридах свидетельствует о потенциальной уязвимости производства подсолнечника перед появлением новых патотипов заразихи.

Апробация результатов. Основные результаты диссертационного исследования были представлены на 5-ом Международном симпозиуме по заразихе на подсолнечнике (г. Анталья, Турция, 2023); 13-й Международной научно-практической конференции молодых ученых «Совершенствование способов управления технологическими процессами в садоводстве и виноградарстве» (г. Краснодар, 2023); 11-й Международной научно-практической конференции «Защита растений от вредных организмов» (г. Краснодар 2023); «Российско-китайской конференции по молекулярной селекции сельскохозяйственных культур» (г. Харбин, Китай, 2024); Международной научно-практической конференции «Инновационное развитие агропромышленного комплекса: новые подходы и актуальные исследования» (г. Краснодар, пос. Белозерный, 2024); 3-й Международной научно-практической конференции «Рядом с Н. И. Вавиловым – научные школы России по обеспечению продовольственной и экологической безопасности страны», (Москва, 2024); 1-й Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Конференция научных инновационных исследований сельского хозяйства» – к 125-летию со дня рождения академика П. П. Лукьяненко», (г. Краснодар, 2026); 6-ом Международном симпозиуме по заразихе на подсолнечнике (г. Нови-Сад, Сербия, 2026).

Публикации результатов исследования. По материалам диссертации опубликовано 17 работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, включенных в перечень ВАК РФ, 3 работы в изданиях, индексируемых в международной базе данных Scopus, 8 публикаций в других научных изданиях и материалах конференций. Получено 2 патента на изобретения.

Работа выполнена в рамках тем:

– FGRU-2019-0002 Создание и адаптация систем молекулярной идентификации патогенов и сортолинейного материала масличных культур, маркирование их селекционно ценных признаков;

– PNIR-25-1-0006 Разработка систем молекулярных маркеров и применение маркер-вспомогательного отбора для технологии создания сортов и гибридов подсолнечника, устойчивых к расам заразихи (*Orobanche cumana* Wallr.).

Личный вклад автора. Результаты исследования получены лично соискателем или при его непосредственном участии. Соискателем были проанализированы литературные данные по тематике проводимого исследования, проведены биоинформатические и лабораторные эксперименты, статистическая обработка и анализ полученных результатов. Совместно с научным руководителем осуществлялась постановка целей, задач и планирование эксперимента.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 170 страницах, состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, предложения для селекционной практики, список используемых терминов и сокращений, список опубликованных работ, список литературы, приложения. Работа содержит 19 таблиц и 22 рисунка, 6 приложений, список литературы содержит 290 источников, в том числе 240 на английском языке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В совокупности в исследовании использовано 153 константных генотипа подсолнечника, отличающихся по фенотипической устойчивости к расе G_{RU} заразихи, включая 59 инбредных линий селекции ФНЦ ВНИИМК, две линии-дифференциатора к расе F заразихи, 21 гибрид селекции ФНЦ ВНИИМК и 71 гибрид иных селекционных компаний. Проанализировано 603 растения F_2, полученных из 12 комбинаций скрещивания, а также 273 растения F_5 RG × СПК плюс селекции ФНЦ ВНИИМК.

Оценка устойчивости подсолнечника к заразихе проведена в лаборатории иммунитета ФНЦ ВНИИМК в условиях защищенного грунта на искусственно созданном зараженном фоне, сформированном семенами заразихи с преобладанием расы G_{RU}. В основе оценки лежал метод ранней диагностики А. Я. Панченко (1973). В качестве контроля использован сорт ВНИИМК 8883 улучшенный, восприимчивый ко всем расам заразихи. Учет количества клубеньков и побегов заразихи на корневой системе подсолнечника выполнен через 25–27 дней после появления всходов.

Дизайн ДНК-маркеров осуществлен на основе анализа нуклеотидных последовательностей, полученных из баз данных RefSeq и GenBank (NCBI) с использованием программных инструментов BLAST, Primer-BLAST, UGENE и Multiple Primer Analyzer.

ДНК выделена из листьев и зародышей семян методом ЦТАБ с модификациями или с использованием набора «МагноПрайм ФИТО» на станции Auto-pure 96. Генотипирование проведено методом мультиплексной классической ПЦР с электрофоретическим разделением продуктов в агарозном геле и методом ПЦР в реальном времени с зондами TaqMan на приборе QuantStudio 5.

Данные анализировали в программной среде R. Распределение растений по генотипу и ассоциацию маркеров с признаком устойчивости оценивали по критерию χ^2. Для сравнения количества прикрепленных клубеньков на корнях растений подсолнечника применены критерии Краскела–Уоллиса и Манна–Уитни, модели с отрицательным биномиальным распределением, ZINB- и Hurdle-модели. Проверка моделей выполнена с помощью пакета DHARMa, попарные сравнения маргинальных средних выполнены в emmeans. Визуализацию данных выполнено с помощью ggplot2. Во всех статистических тестах пороговый уровень значимости принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ ассоциации микросателлитных локусов из предполагаемой области локализации гена с устойчивостью к расе G_{RU} заразихи

Результаты ранее проведенных в ФНЦ ВНИИМК исследований, свидетельствуют о моногенном контроле признака устойчивости к расе G_{RU} заразихи у линий подсолнечника. Однако также отмечено неполное доминирование гена устойчивости, названного *Or*$_7$. Согласно данным, представленным в зарубежных источниках, микросателлитный локус ORS683 из устойчивости к расе заразихи с вирулентностью выше F, который был предварительно обозначен как *or*$_{ab\text{-}vl\text{-}8}$. Генетическое расстояние между ними составило 1,5 сантиморгана (сМ). Исходя из этого была проверена гипотеза о возможной локализации гена устойчивости к расе G_{RU} заразихи также в верхней части 3-ей группы сцепления.

На выборке из 6 устойчивых и 3 восприимчивых родительских линий подсолнечника были определены полиморфные, по длине амплифицированного фрагмента, маркеры ORS683, ORS1112, ORS1080, ORS657, ORS202, ORS1040, был обнаружен по локусам RTS 05 и RTS 40. Для гибридологического анализа

были выбраны восприимчивая к заразихе расы G_{RU} линия подсолнечника ВК678 и устойчивая линия RGP1 и маркеры ORS683, ORS1112 и ORS1040, которые показали различия между этими линиями.

Анализ по критерию χ^2 показал, что наблюдаемое распределение генотипов растений F_2 по микросателлитным локусам статистически значимо не отличается от ожидаемых частот по моделям 3:1 и 1:2:1. Полученные результаты позволили провести тест на их совместное наследование с геном устойчивости к расе G_{RU} заразихи *Or7* (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты анализа сцепления гена *Or7* с SSR-локусами в F_2 от скрещивания ВК678 × RGP1 по критерию χ^2

Пары локусов	Всего растений, шт.	Фактически наблюдаемое соотношение, шт.	Теоретически ожидаемое соотношение	χ^2	df	P
Or7–ORS683	100	23:35:12:7:12:11	3:6:3:1:2:1	7,28	5	0,20
Or7 – ORS1112	89	18:39:8:8:9:7	3:6:3:1:2:1	7,42	5	0,19
Or7 – ORS1040	102	45:25:22:10	9:3:3:1	6,97	3	0,07

Результаты теста на совместное наследование указали на независимое наследование гена устойчивости и микросателлитных локусов ДНК ORS683, ORS1040 и ORS1112. Таким образом, ген устойчивости к расе G_{RU} заразихи не находится в достаточной близости к локусам, которые анализировались в этом исследовании.

Разработка новых ДНК-маркеров и исследование их ассоциации с признаком устойчивости

Анализ литературных источников показал, что в недавнее (на момент проведения исследования) время был идентифицирован и секвенирован ген устойчивости *HaOr7*. Данный ген кодирует рецептороподобную киназу с лейциновыми повторами (LRR-RLK) и контролирует устойчивость подсолнечника к заразихе расы F_{GV} (Duriez et al., 2019). Поскольку в опубликованном исследовании не изучалась устойчивость к другим расам заразихи, было выдвинуто предположение о возможной связи данного гена с устойчивостью подсолнечника и к расе G_{RU} заразихи. Для экспериментальной проверки предположения были *in silico* разработаны новые аллель-специфичные маркеры RORS1, RORS2, SORS1–SORS9 на наличие/отсутствие последовательности ДНК для устойчивого и восприимчивого аллелей на основе данных из базы генетической информации Genbank и референсного генома подсолнечника HanXRQr2.0-SUNRISE.

В результате проверки разработанных ДНК-маркеров отобраны маркеры RORS1 и SORS9, которые показали стабильную и аллель-специфичную амплификацию: RORS1 характеризовался амплификацией фрагмента ДНК размером 168 п.н. у устойчивых генотипов, а SORS9 фрагментом 217 п.н. у восприимчивых. Для повышения эффективности генотипирования была создана мультиплексная система ДНК-маркеров RORS1/SORS9 (рисунок 1).

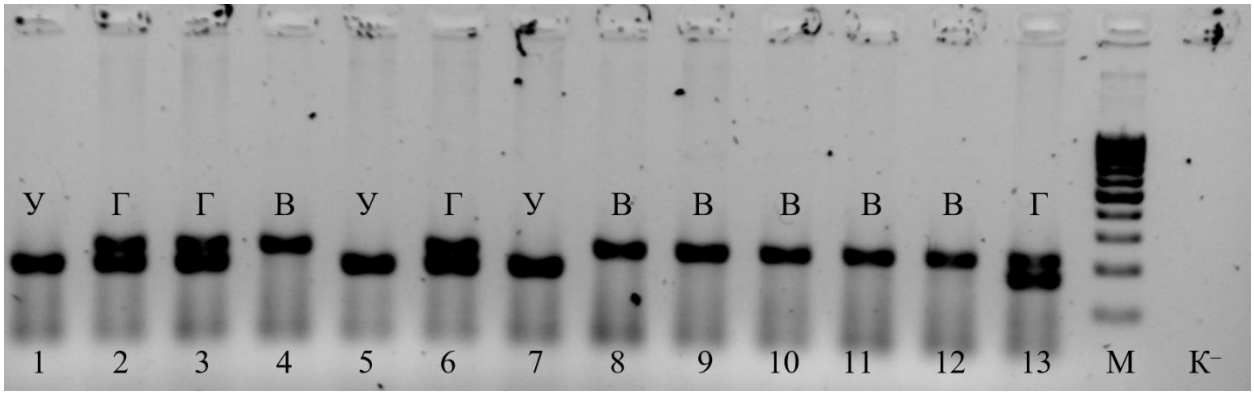


Рисунок 1 – Амплифицированные фрагменты ДНК мультиплексной ПЦР с маркерами RORS1/SORS9, разделенные в агарозном геле. Г – гибрид; У – устойчивая линия; В – восприимчивая линия; М – маркер молекулярного веса; $К^-$ – отрицательный контроль.

Валидация разработанной системы маркеров проведена на 70 генотипах подсолнечника включающих: 66 устойчивых и восприимчивых к расе G_{RU} заразихи линий и гибридов селекции ВНИИМК, две линии-дифференциатора к расе F заразихи, и два устойчивых гибрида иностранной селекции.

Установлено полное соответствие между аллельным состоянием гена *HaOr7*, определенным с помощью системы маркеров RORS1/SORS9, и известной устойчивостью к заразихе у изученных генотипов подсолнечника. Все устойчивые линии были охарактеризованы как гомозиготы по устойчивому аллелю, а все восприимчивые линии и гибриды, в том числе две линии-дифференциатора к расе F, как гомозиготы по восприимчивому аллелю. Устойчивые гибриды показали гетерозиготный генотип.

Валидация маркерной системы на расщепляющихся популяциях подсолнечника

Для установления связи между системой ДНК-маркеров аллельного состояния гена *HaOr7* и устойчивостью подсолнечника к расе G_{RU} заразихи, был проведен фитопатологический анализ более 200 растений из двух расщепляющихся популяций – F_2 ВК680 × RGL1 и F_2 ВК680 × RGM.

Для комбинации скрещивания ВК680 × RGL1 выборка составила 103, а для комбинации скрещивания RGM × ВК680 – 101 растение F_2, которые были

оценены на устойчивость к расе G_{RU} заразихи и генотипированы с помощью маркерной системы RORS1/SORS9.

По результатам фенотипической оценки все растения были отнесены к трем группам устойчивости – устойчивые (0 клубеньков заразихи), промежуточно-устойчивые (1–6 клубеньков) и восприимчивые (≥ 7 клубеньков). Распределение растений подсолнечника как по фенотипическим группам, так и по генотипическим классам показало согласованность с теоретически ожидаемой моделью 1:2:1. Анализ соответствия полученных результатов показал, что растения, несущие устойчивый аллель гена *HaOr7*, характеризовались меньшим количеством клубеньков заразихи, в то время как все восприимчивые гомозиготы (S) показали восприимчивый фенотип.

Дополнительно были изучены 37 растений F_2 устойчивого к расе G заразихи гибрида иностранной селекции СИ Честер (Syngenta) и 20 растений F_2 ВК680 × RG, где донором устойчивости была линия RG, гомозиготная по устойчивому аллелю гена *HaOr7*. Для каждого растения была проведена нумерация, фитопатологическая оценка устойчивости к расе G_{RU} заразихи, а также генотипирование с помощью маркерной системы RORS1/SORS9. Информацию о генотипе каждого индивидуального растения по маркерной системе и количестве клубеньков заразихи внесена в 2 независимых набора данных и проведен визуальный анализ этого распределения (рисунок 2).

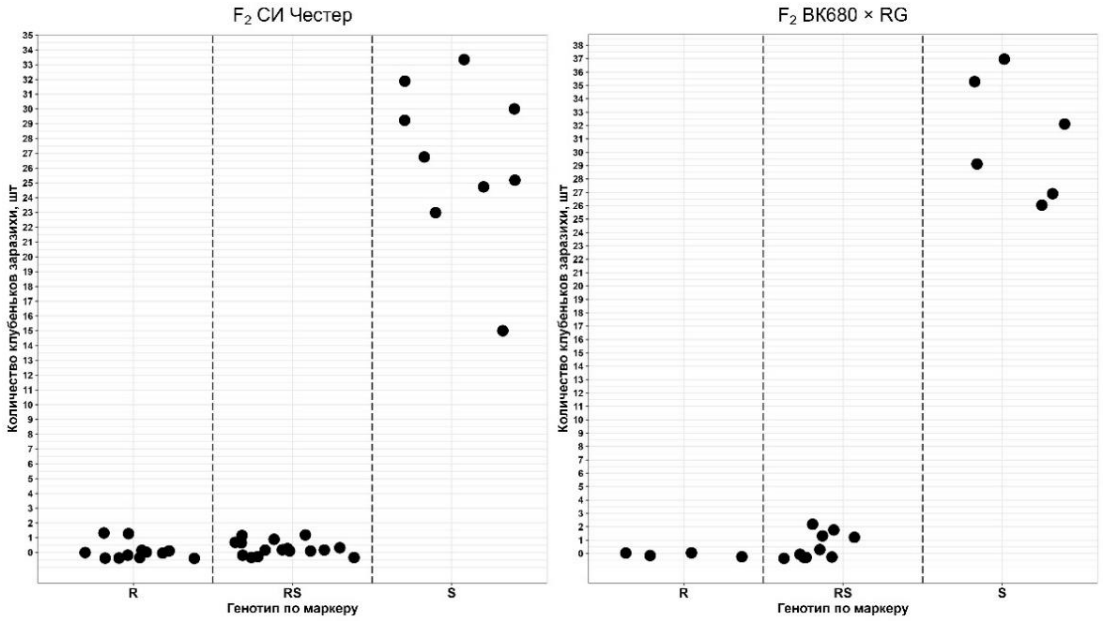


Рисунок 2 – Количество клубеньков заразихи на корнях индивидуальных растений подсолнечника. R – устойчивая гомозигота *HaOr7*, RS – гетерозигота, S – восприимчивая гомозигота

Восприимчивые гомозиготы характеризовались большим количеством клубеньков заразихи. Для установления статистической значимости

наблюдаемых различий проведены попарные сравнения генотипических классов (таблица 2)

Таблица 2 – Попарные сравнения разных генотипических групп по количеству клубеньков заразихи на корнях индивидуальных растений подсолнечника

Сравниваемый генотип 1	Сравниваемый генотип 2	Статистическая значимость попарных сравнений (P)
R	RS	0,33
R	S	$2{,}1 \times 10^{-6}$
RS	S	$1{,}3 \times 10^{-7}$

S – восприимчивая гомозигота; R – устойчивая гомозигота; RS – гетерозигота.

Выявлены статистически значимые различия между классом восприимчивых гомозигот и двумя другими классами. В свою очередь не было установлено различий между устойчивыми гомозиготами и гетерозиготами. Однако, отсутствие значимых различий могло быть связано с размером выборки.

Проведенная валидация разработанной кодоминантной системы аллель-специфичных маркеров аллелей гена *HaOr7* для мультиплексной ПЦР показала связь между генотипом по маркерной системе RORS1/SORS9 и количеством клубеньков заразихи на корнях подсолнечника. Установлена ассоциация гена *HaOr7* с устойчивостью подсолнечника к расе G_{RU} заразихи.

Разработка аллель-специфичного ДНК-маркера для ПЦР в реальном времени, валидация и сравнительный анализ двух маркерных систем

Разработанная маркерная система, ассоциированная с устойчивостью подсолнечника к расе G_{RU} заразихи позволяет проводить маркер-вспомогательный отбор, однако, необходимость проведения гель-электрофореза ограничивает эффективность ее применения в массовой оценке селекционного материала. По этой причине был разработан экспериментальный ДНК-маркер для ПЦР в реальном времени, который включал пару общих праймеров и два аллель-специфичных зонда – для устойчивого (Or7-1) и восприимчивого (LOC110867090) аллелей гена *HaOr7*. Зонды содержали на 5′-конце флуорофоры FAM для устойчивого аллеля и ROX для восприимчивого, а также гасители флуоресценции на 3′-конце BHQ1 и BHQ2 соответственно.

Для валидации разработанного маркера для ПЦР в реальном времени и согласованности результатов с маркерной системой для мультиплексной классической ПЦР был проведен анализ 80 генотипов подсолнечника селекции ФНЦ ВНИИМК, включающих: 11 устойчивых и 10 восприимчивых к расе G_{RU} заразихи гибридов; 59 контрастных по устойчивости линий. В том числе 2 линии-дифференциатора к расе F заразихи – LC1093 и P96. Всего было проанализировано 82 образца подсолнечника.

Обе маркерные системы показали 100 % согласованность результатов. Все 26 устойчивых линий определены как гомозиготы по устойчивому аллелю *HaOr7*. Среди 11 устойчивых гибридов 3 были устойчивыми гомозиготами, а 8 гетерозиготами, что согласуется с генотипами их родительских линий. Все 35 восприимчивых линий и 10 гибридов были восприимчивыми гомозиготами. Таким образом, обе системы позволили разделить исследованный селекционный материал по устойчивости к G_{RU} заразихи.

Дальнейшая валидация обеих маркерных систем проведена на выборках растений F_2 двух гибридных комбинаций – 48 растений ВК508 × ВК305 и 50 растений ВК305 × ВК678-S. Линия ВК305 устойчива к расе G_{RU} заразихи, а ВК508 и ВК678-S восприимчивы. Анализ 98 растений показал полную согласованность результатов по маркерным системам, а распределение в F_2 обеих гибридных комбинаций соответствовали теоретически ожидаемым по модели 1:2:1.

Для оценки влияния генотипа и комбинации скрещивания на количество клубеньков на корнях заразихи, исходя из характера данных, была использована модель с завышением нулей и отрицательным биномиальным распределением (ZINB), включавшая оба фактора и их взаимодействие. Симуляционная проверка с помощью пакета DHARMa не выявила нарушений предпосылок модели. Для каждого сочетания уровней факторов рассчитаны маргинальные средние количества клубеньков, полученные после обратного преобразования из логарифмической шкалы, проведены их попарные сравнения с поправкой Шидака и группировка по наличию статистически значимых различий (таблица 3).

Таблица 3 – Множественные сравнения средних значений количества клубеньков для комбинаций факторов

Комбинация скрещивания (Фактор А)	Генотип по маркеру (Фактор А)	Оценка маргинального среднего (EMM) шт. (exp(β))	Стандартная ошибка среднего (SE)	Группа
ВК508 × ВК305	R	0,12	0,11	a*
ВК508 × ВК305	RS	0,46	0,14	a
ВК305 × ВК678-S	RS	2,39	0,33	b
ВК305 × ВК678-S	R	2,67	0,54	b
ВК508 × ВК305	S	20,62	2,29	c
ВК305 × ВК678-S	S	37,10	4,37	d

*Одинаковые буквы означают отсутствие статистически значимых различий между группами

В двух комбинациях скрещивания классы устойчивых гомозигот и гетерозигот показали значимо меньшее количество клубеньков заразихи, чем класс восприимчивых гомозигот. Не было установлено различий между устойчивыми гомозиготами и гетерозиготами внутри комбинации скрещивания, что может быть связано с недостаточностью объема выборки. Комбинация скрещивания ВК508 × ВК305 показала статистически значимо меньшее количество клубеньков во всех генотипических классах, чем комбинация ВК305 × ВК678-S, что свидетельствует о влиянии генетического фона на признак устойчивости. Данный эффект следует учитывать при создании линий и подборе родительских пар, и проводить финальную оценку перспективного материала на зараженном фоне.

Для апробации разработанных маркерных систем в практической селекции проанализированы 137 растений F_2 из пяти гибридных комбинаций. Согласованность результатов обеих маркерных систем составила 100 %. Маркер-вспомогательный отбор гомозиготных по устойчивому аллелю гену *HaOr7* растений позволил сократить объем селекционного материала последующей оценки по другим селекционно-ценным признакам. В результате проведенной работы созданы пять новых линий подсолнечника, сочетающих устойчивость к заразихе с измененным жирнокислотным составом масла семян или устойчивостью к возбудителю ложной мучнистой росы.

По совокупности проведенных исследований установлено, что ранее изученный с помощью классического гибридологического анализа ген устойчивости к заразихе *Or*$_7$ соответствует идентифицированному с помощью молекулярно-генетических методов гену *HaOr7*. Разработанные маркерные системы показали полную согласованность результатов и эффективность в практической селекции.

Эффективность разработанных маркерных систем для создания гомозиготного по гену устойчивости сорта подсолнечника

При создании сортов-популяций кондитерского подсолнечника необходимо сохранять высокий уровень внутрисортового полиморфизма, поэтому закрепление гена устойчивости проводят при свободном цветении без этапов самоопыления. Фенотипическая оценка на зараженном фоне направлена на выявление и исключение восприимчивых растений, но не позволяет проводить отбор устойчивых гомозигот. В результате с каждым этапом отбора эффективность элиминации восприимчивых растений снижается. Кодоминантные маркерные системы позволяют отбирать гомозиготные по устойчивому аллелю растения.

Для оценки эффективности такого отбора были изучены 273 растения популяции F_5 RG × СПК плюс на искусственном зараженном фоне. В результате

генотипирования выявлены: 151 устойчивых гомозигот, 111 гетерозигот и 11 восприимчивых гомозигот, а среднее количество клубеньков заразихи на корнях составило 0,32, 1,80 и 25,54, соответственно. Восприимчивым контролем выступил сорт «ВНИИМК 8883 улучшенный» с поражением 26,88 клубеньков (рисунок 3).

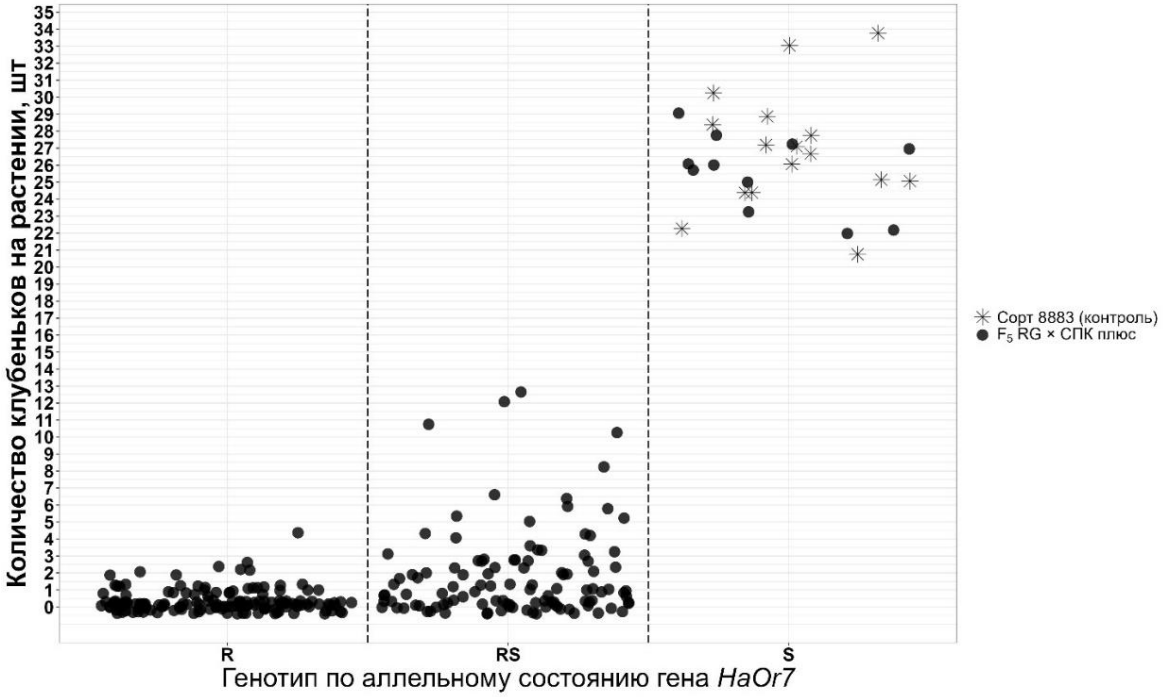


Рисунок 3 – Распределение растений в зависимости от фенотипа и генотипа по аллелям гена *HaOr7*; R – гомозигота по устойчивому аллелю, S – гомозигота по восприимчивому аллелю, RS – гетерозигота

Все генотипические классы статистически значимо (P <0,001) отличались по количеству клубеньков заразихи на растение по результатам попарных сравнений по критерию Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. Визуальный анализ распределений позволил сделать предположение, что выявленные различия между классом устойчивых гомозигот и гетерозигот обусловлены как долей полностью устойчивых растений, так и количеством клубеньков у пораженных. Для оценки этих компонент использована двухкомпонентная Hurdle-модель с отрицательным биномиальным распределением. Симуляционная проверка не выявила нарушений в предпосылках модели. Устойчивые гомозиготы характеризовались большей вероятностью полного отсутствия поражения заразихой (75 %) в отличие от гетерозигот (41 %), а также меньшим количеством клубеньков у пораженных растений – 1,3 и 3,1, соответственно. Различия по обеим компонентам были статистически значимыми (P <0,001) (рисунок 4).

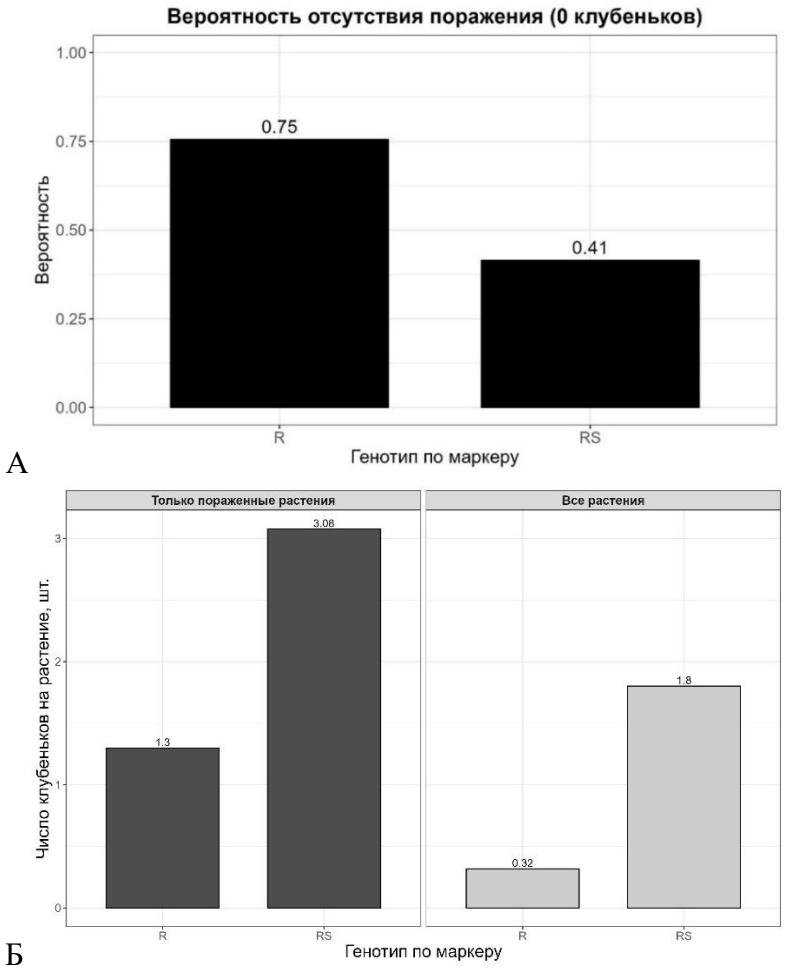


Рисунок 4 – Различия в степени поражения устойчивых гомозигот (R) и гетерозигот (RS) расой G_{RU} заразихи. А – вероятность появления растений с полной устойчивостью. Б – среднее количество клубеньков заразихи на корнях только пораженных растений и всех растений, включая полностью устойчивые

Несмотря на статистическую значимость, такие различия между генотипическими классами не позволяют надежно различать устойчивое гомозиготное и гетерозиготное растения. Так, среди 160 полностью устойчивых растений 46 (28,8 %) были гетерозиготными. Разработанные маркерные системы позволили провести отбор полностью устойчивых и гомозиготных по устойчивому аллелю гена *HaOr7* растений для создания нового сорта кондитерского подсолнечника. Маркер-вспомогательный отбор показал свою эффективность в селекции сортов подсолнечника на устойчивость к расе G_{RU} заразихи.

Анализ распространенности гена *HaOr7* среди коммерческих гибридов подсолнечника, возделываемых на территории РФ, и оценка его стратегической роли в обеспечении устойчивости к расе G_{RU} заразихи

Для изучения распространенности устойчивого аллеля гена *HaOr7* проанализирован 71 коммерческий гибрид 12 оригинаторов. Сведения об устойчивости к заразихе получены преимущественно из официальных источников селекционных организаций, прямая фенотипическая оценка не проводилась.

Результаты обеих маркерных систем совпали у 67 гибридов. У четырех гибридов система для классической ПЦР выявила гетерозиготное состояние, в то время как ДНК-маркер для ПЦР в реальном времени не выявлял восприимчивый аллель. Это говорит о наличии нескольких вариантов восприимчивого аллеля в генофонде подсолнечника, а также о необходимости предварительной оценки селекционного материала перед включением в маркер-вспомогательный отбор.

Сопоставление результатов генотипирования с заявленной оригинаторами устойчивостью показало, что почти все гибриды с устойчивостью к расам заразихи выше E, несли устойчивый аллель *HaOr7* в гомозиготном или гетерозиготном состоянии. В классе восприимчивых гомозигот 24 из 25 гибридов принадлежали к группе с устойчивостью к расам A–E. Исключением из этой закономерности был только гибрид П64ЛЕ25, который согласно описанию оригинатора несет только ген Or_{SII}, контролирующий постгаусториальную устойчивость подсолнечника к заразихе. Обе группы гибридов, заявленные как устойчивые к расе G и G+, включали как устойчивые гомозиготы так и гетерозиготы, поэтому различия между ними нельзя объяснить только аллельным состоянием гена *HaOr7*, что согласуется с выявленным в настоящем исследовании влиянием генетического фона на признак.

Таким образом, результаты скрининга коммерческих гибридов подсолнечника указывают на его ключевую роль в обеспечении генетической устойчивости к высоковирулентным расам заразихи и потенциальную уязвимость производства подсолнечника перед появлением новых патотипов паразита.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что ген *HaOr7*, локализованный на 7-й хромосоме генома подсолнечника, кодирующий рецептороподобную киназу с лейцин-богатыми повторами, идентичен ранее описанному гену Or_7 и контролирует устойчивость подсолнечника к расе G_{RU} заразихи, преобладающей на территории Российской Федерации;

2. Разработаны две внутригенные маркерные системы аллелей гена *HaOr7* для классической ПЦР и ПЦР в реальном времени. На выборке из 80 линий и

гибридов и популяциях F_2 установлена статистически значимая ассоциация аллельного состояния *HaOr7* с устойчивостью к расе G_{RU} заразихи ($P < 0,001$), а также согласованность результатов обеих систем.

3. Показано, что оценка фенотипической устойчивости не позволяет надежно различать гомо- и гетерозиготы по устойчивому аллелю *HaOr7*, что имеет важное значение при селекции сортов, размножаемых в условиях свободного цветения. Внедрение маркер-вспомогательного отбора в практическую селекцию позволило получить пять устойчивых линий и сорт кондитерского подсолнечника, гомозиготные по устойчивому аллелю *HaOr7*.

4. Уточнены особенности формирования устойчивости подсолнечника к расе G_{RU} заразихи. Установлено влияние аллельного состояния гена *HaOr7* как на вероятность полной устойчивости, так и на количество клубеньков у пораженных растений. Выявлен дополнительный вклад генетического фона в формирование устойчивости.

5. Устойчивый аллель гена *HaOr7* выявлен у 46 из 47 изученных коммерческих гибридов подсолнечника, заявленных как устойчивые к расам заразихи с вирулентностью выше расы E, и отсутствует во всех 24 восприимчивых, что указывает на широкое использование данного гена в селекции и потенциальную уязвимость современных гибридов к появлению новых вирулентных патотипов паразита.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ СЕЛЕКЦИОННОЙ ПРАКТИКИ

1. Использовать разработанные ДНК-маркеры гена *HaOr7* в селекции подсолнечника на устойчивость к расе G_{RU} заразихе, с обязательным применением при создании сортов в условиях свободного цветения. При вовлечении нового селекционного материала учитывать возможное разнообразие восприимчивых аллелей гена.

2. При создании устойчивых сортов, линий и гибридов подсолнечника учитывать и влияние аллельного состояния гена *HaOr7* и генетического фона на проявление устойчивости. Маркер-вспомогательный отбор дополнять финальной фитопатологической оценкой перспективного материала на искусственном зараженном фоне.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. **Савиченко, Д.Л.** Применение ДНК-маркеров в селекции сортов подсолнечника на устойчивость к заразихе (*Orobanche cumana* Wallr.) / Д.Л. Савиченко, В.И. Хатнянский, С.З. Гучетль [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2024. – Т. 38. – № 10. – С. 18-24. – DOI 10.53859/02352451_2024_38_10_18. – EDN HYSEDZ.

2. **Савиченко, Д.Л.** Разработка ДНК-маркеров признака устойчивости подсолнечника к расе G заразихи (*Orobanche cumana* Wallr.) / Д.Л. Савиченко, С.З. Гучетль, Е.Д. Логинова // Масличные культуры. – 2023. – № 1(193). – С. 3-13. – DOI 10.25230/2412-608X-2023-1-193-3-13. – EDN VPRVGY.

3. Гучетль, С.З. Анализ сцепления гена устойчивости к расе G заразихи с микросателлитными локусами у линии-донора подсолнечника селекции ВНИИМК RGP1 / С.З. Гучетль, **Д.Л. Савиченко** // Масличные культуры. – 2021. – № 2(186). – С. 3-9. – DOI 10.25230/2412-608X-2021-2-186-3-9.

4. **Савиченко, Д. Л.** Поиск и анализ нуклеотидных последовательностей в геноме подсолнечника, ассоциированных с генами устойчивости к расам заразихи *Orobanche cumana* Wallr / Д.Л. Савиченко, С.З. Гучетль, А.В. Головатская // Масличные культуры. – 2020. – № 3(183). – С. 11-19. – DOI 10.25230/2412-608X-2020-3-183-11-19. – EDN YYHGON.

Работы, опубликованные в изданиях, индексируемых в Международных цитатно-аналитических базах данных:

1. **Savichenko, D.**, Guchetl S., Loginova E. DNA marker for the *HaOr7* gene conferring resistance to the G_{RU} race of broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower / D. Savichenko, S. Guchetl, E. Loginova // Helia. – 2024. – Т. 47. – №. 80. – С. 36-51.

2. Demurin, Y. Allelic Interaction of *OR7* Gene of Broomrape Resistance in Sunflower / Y. Demurin, Y. Chebanova, O. Rubanova, S. Guchetl, **D. Savichenko**, I. Kirov // Helia. – 2024. – Vol. 47, no. 81. – P. 21-31.

3. Guchetl, S. Z. The search for the location of the sunflower resistance gene to race G of broomrape on the linkage map in the lines of breeding of VNIIMK / S.Z. Guchetl, **D.L. Savichenko**, S.A. Ramazanova // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Yekaterinburg, 15-16 октября 2020 года. – IOP Publishing Ltd: IOP Publishing Ltd, 2021. – Т. 699. – №. 1. – С. 012008. – DOI 10.1088/1755-1315/699/1/012008. – EDN GIJZQN.

Патенты на изобретения

1. Патент № 2830955 C1 Российская Федерация, МПК A01H 1/04, C12Q 1/68. Система внутригенных ДНК-маркеров для детекции в растениях

подсолнечника доминантного и рецессивного аллелей гена *HaOr7*, контролирующего устойчивость к расе G заразихи (*Orobanche cumana* Wallr.) : № 2023122373 : заявл. 28.08.2023 : опубл. 27.11.2024 / **Д. Л. Савиченко**, С. З. Гучетль, Е. Д. Логинова ; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта». – EDN CIHGEV.

2. Патент № 2851468 C1 Российская Федерация, МПК C12Q 1/6895. Внутригенный ДНК-маркер для ПЦР в реальном времени, предназначенный для идентификации аллелей гена *HaOr7*, контролирующего устойчивость подсолнечника к расе G заразихи (*Orobanche cumana* Wallr.) : заявл. 13.05.2025 : опубл. 24.11.2025 / **Д. Л. Савиченко**, С. З. Гучетль, Е. Д. Логинова; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта». – EDN OVDPUD.

Публикации в материалах конференций и статьи из базы РИНЦ

1. **Savichenko, D.** DNA marker for marker-assisted selection for sunflower resistance to race G of broomrape / D. Savichenko, S. Guchetl, Y. Demurin, Yu. Chebanova, O. Rubanova // Proceedings of 5th International Symposium on Broomrape in Sunflower, Antalya, Turkey, 1-3 November 2023; [editor Yalcin Kaya]. – Antalya, Turkey : Trakya University, 2023. – P. 27

2. **Savichenko, D**. Population structure at the *HaOr7* gene reveals the key role of marker-assisted selection in breeding broomrape-resistant open-pollinated sunflower varieties / D. Savichenko, S. Guchetl, Y. Demurin // Book of abstracts of 6th International Symposium on Broomrape in Sunflower & 1st Meeting on Sunflower Biotic and Abiotic Stress (ORO-STRESS 2026), Novi Sad, Serbia, June 15-18, 2026 ; [editor Sandra Cvejić]. – Novi Sad : Institute of Field and Vegetable Crops, 2026. – P. 32-33

3. **Савиченко, Д.Л.** Разработка и внедрение ДНК-маркеров в селекцию подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) во ВНИИМК / Д.Л. Савиченко, Е.Д. Логинова, С.З. Гучетль // Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки сельскохозяйственных культур : Сборник материалов 12-й Международной конференции молодых ученых и специалистов, Краснодар, 0-03 марта 2023 года. – Краснодар: Федеральный научный центр "Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта", 2023. – С. 246-252. – DOI 10.25230/conf12-2023-246-252.

4. **Савиченко, Д.Л.** Валидация ДНК-маркера устойчивости подсолнечника к расе G заразихи на малых выборках / Д.Л. Савиченко, Е.Д. Логинова, С.З. Гучетль // Научные труды Северо-Кавказского федерального

научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. – 2023. – Т. 37. – С. 73-76. – DOI 10.30679/2587-9847-2023-37-73-76.

5. **Савиченко, Д.Л.** ДНК-маркер устойчивости подсолнечника к расе G заразихи (*Orobanche cumana* Wallr.) / Д.Л. Савиченко, Е.Д. Логинова, С.З. Гучетль // Защита растений от вредных организмов : Материалы XI международной научно-практической конференции, Краснодар, 19–23 июня 2023 года. Том Выпуск 11. – Краснодар: Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, 2023. – С. 340-342.

6. **Савиченко, Д. Л.** Аллельное состояние гена *HaOr7* в коммерческих гибридах подсолнечника / Д.Л. Савиченко, Е.Д. Логинова, С.З. Гучетль // Инновационное развитие агропромышленного комплекса: новые подходы и актуальные исследования : Материалы Международной научно-практической конференции в рамках мероприятий «Десятилетия науки и технологий в Российской Федерации», 300-летия Российской академии наук, Краснодар, 24-25 апреля 2024 года. – Краснодар: ИП Копыльцова П.И, 2024. – С. 305-309. – DOI 10.33775/conf-2024-305-309.

7. Гучетль, С.З. Молекулярно-генетическое маркирование некоторых селекционно-ценных признаков у подсолнечника *Helianthus annuus* L / С.З. Гучетль, С.А. Рамазанова, **Д.Л. Савиченко**, Е.В. Бадьянов // Инновационное развитие агропромышленного комплекса: новые подходы и актуальные исследования : Материалы Международной научно-практической конференции в рамках мероприятий «Десятилетия науки и технологий в Российской Федерации», 300-летия Российской академии наук, Краснодар, 24-25 апреля 2024 года. – Краснодар: ИП Копыльцова П.И, 2024. – С. 84-88. – DOI 10.33775/conf-2024-84-88.

8. Гучетль, С.З. Молекулярно-генетическое маркирование генов устойчивости подсолнечника *Helianthus annuus* L. к паразитическим организмам / С.З. Гучетль, Е.В. Бадьянов, **Д.Л. Савиченко** // Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам : Тезисы докладов V Международной научно-практической конференции, Санкт-Петербург–Пушкин, 22–24 октября 2025 года. – Санкт-Петербург: Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 2025. – С. 9.