Поиск и анализ нуклеотидных последовательностей в геноме подсолнечника, ассоциированных с генами устойчивости к расам заразики *Orobanche cumana* Wallr.

Д.Л. Савиченко,

млад. науч. сотрудник

С.З. Гучетль,

зав. лабораторией, канд. биол. наук

А.В. Головатская,

лаборант-исследователь

ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

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

E-mail: d_savichenko@mail.ru

Для цитирования: Савиченко Д.Л., Гучетль С.З., Головатская А.В. Поиск и анализ нуклеотидных последовательностей в геноме подсолнечника, ассоциированных с генами устойчивости к расам заразики *Orobanche cumana* Wallr. // Масличные культуры. – 2020. – Вып. 3 (183). – С. 11–19.

Ключевые слова: подсолнечник, заразика, устойчивость, ДНК, маркеры, ПЦР.

Исследование линий, устойчивых к расе G заразики, созданных на центральной экспериментальной базе ВНИИМК, показало генетический контроль устойчивости как моногенный с неполным доминированием. Целью работы являлся поиск и анализ молекулярных маркеров для генов устойчивости к расе G заразики на основе применения методов ПЦР. Материалом исследования служили созданные во ВНИИМК шесть линий-доноров, устойчивых к расе G заразики: RGP1, RGP2, RGB, RGL1, RGL2, RGA, а также восприимчивые линии ВК 101, ВК 678, ВК 680. Выделение ДНК проводилось из листьев молодых растений с использованием СТАВ-буфера. Для ПЦР анализа использовали 17 пар праймеров двух типов: SCAR (sequence characterized amplified region) и SSR (simple sequence repeat). Условия амплификации рекомендованные авторами маркеров с экспериментальным подбором температуры гибридизации праймеров. В рамках исследования используемые в работе SSR и SCAR локусы с помощью инструмента BLAST были сопоставлены со сборкой HanXRQr1.0. По этим данным состав-

лена физическая карта положения локусов. При оценке шести устойчивых и трех восприимчивых родительских линий полиморфизм по длине локуса ДНК показали семь маркеров, а по наличию/отсутствию амплифицированного фрагмента – два маркера. У маркеров ORS 683 и ORS 1112 была отмечена связь полиморфизма локусов с восприимчивостью растений родительских линий к заразики. У ORS 683 это выражалось наличием аллеля длиной 364 п.н., а у ORS 1112 – отсутствием аллеля длиной 375 п.н. Данные маркеры отмечены как основные для гибридологического анализа в F₁ и F₂ с выбранными парами для скрещиваний. Дополнительные маркеры будут подобраны индивидуально на основании полученных данных по полиморфизму локусов. Таким образом, в результате исследования была составлена физическая карта для дальнейшего подбора маркеров, выбраны гибридные комбинации и маркеры из числа изученных для гибридологического анализа.

UDC 633.854.78:575:632.9

Search and analysis of nuclear sequences in sunflower genome associated with genes of resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) races.

D.L. Savichenko, researcher

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

A.V. Golovatskaya, laboratory assistant

V.S. Pustovoi All-Russian Research Institute of Oil Crops (VNIIMK)

17, Filatova Str., Krasnodar, 350038, Russia

E-mail: d_savichenko@mail.ru

Key words: sunflower, broomrape, resistance, DNA, markers, PCR.

Studying of sunflower lines resistant to broomrape race G, bred in V.S. Pustovoi All-Russian Research Institute of Oil Crops (VNIIMK), Krasnodar showed the genetic control of resistance is monogenic with incomplete dominance. The purpose of the research was to seek and analyze molecular markers for the genes of resistance to broomrape race G using PCR-methods. In our research we used six developed in VNIIMK lines-donors resistant to broomrape race G: RGP1, RGP2, RGB, RGL1, RGL2, RGA, and susceptible lines VK 101, VK 678, VK 680. We extracted DNA from the leaves of young sunflower plants using STAB-buffer. For PCR-analysis we used 17 pairs of primers of two types: SCAR (sequence characterized amplified region) and SSR (simple sequence repeat). Conditions of amplification are as recommended by authors of markers with experimental selection of a temperature for primers hybridization. Within the research we balanced involved into work SSR- and

SCAR-loci using BLAST and a set of HanXRQr1.0. Due to these data we composed a physical map of loci location. After assessment of six resistant and three susceptible parental lines, seven markers demonstrated polymorphism by a length of locus DNA and two ones – by presence/absence of amplified fragment. For markers ORS 683 and ORS 1112 we observed a relation between loci polymorphism and susceptibility of parental lines to broomrape. This was certified with a presence of an allele of 364 n.p. length in ORS 683 and an absence of an allele of 375 n.p. length in ORS 1112. These markers were noted as primary ones for hybridological analysis in F₁ и F₂ with selected pairs for crossing. Additional markers will be selected individually using obtained data on loci polymorphism. Thus, as a result of the research we created a physical map for the further markers selection, found hybrid combinations and markers from the studied ones for hybridological analysis.

Введение. Подсолнечник (*Helianthus annuus* L.) является одной из важнейших масличных культур в мире. Посевы подсолнечника подвержены влиянию многих биотических лимитирующих факторов, среди которых одним из самых вредоносных является паразитический сорняк – зарази́ха (*Orobanchе cumanа* Wallr.).

Зарази́ха кумская встречается во многих странах Европы и Азии, особенно в Центральной и Восточной Европе, Испании, Турции, Китае, Израиле, Иране и Казахстане [1; 2]. В среднем потери урожая подсолнечника, вызванные зарази́хой, могут превышать 50 % при выращивании восприимчивых гибридов [3; 4; 5]. В настоящее время обнаружено восемь рас, обозначенных буквами от А до Н [6; 7; 8]. Сегрегация *O. cumanа* по вирулентности впервые была описана в СССР как разница между способностью зарази́хи поражать разные генотипы подсолнечника. Расы были описаны как А и комплекс рас В [9]. Генетическая резистентность устойчивого к этим расам материала в конечном итоге стала неэффективной, так как появилась новая раса С, сильно повлиявшая на производство подсолнечника [10]. В южных регионах Российской Федерации сообщается о расах F, G и Н зарази́хи [11]. В Казахстане были выявлены

расы С и G [9]. Присутствие расы Н наблюдалось на северо-востоке Украины, наряду с биотипом с вирулентностью выше, чем раса Н [12]. Существует значительная разница в распределении вирулентности, так как наиболее вирулентные расы обычно встречаются в районах вблизи Черного моря [13]. Раса Е является доминирующей в области, зараженной *O. cumanа* в Сербии, а раса F была обнаружена локально [14; 15].

Использование устойчивых сортов и гибридов подсолнечника считается наиболее экологичным подходом к борьбе с паразитом. Селекция генотипов, устойчивых к зарази́хе включает использование доступных и эффективных источников резистентности, перенос генов устойчивости в существующий селекционный материал и практические процедуры оценки для обеспечения достаточного качества отбора. Данный процесс должен вестись непрерывно, так как появление устойчивости к новой расе приводит к ее преодолению и появлению более агрессивной расы. У подсолнечника в отношении *O. cumanа* описаны как качественно, так и количественно наследуемые гены резистентности. Качественная устойчивость к зарази́хе контролируется главными генами и зависит от расы [7]. Учитывая, что гены устойчивости быстро преодолеваются, необходимо искать новые источники устойчивости и комбинировать имеющиеся гены [16].

Гены устойчивости к зарази́хе обозначаются как *Or*. А. Вранчану и соавторы [17] идентифицировали пять единичных доминантных генов (*Or*₁ – *Or*₅) для устойчивости к пяти расам (А – Е) зарази́хи. Они определили набор из пяти линий-дифференциаторов, устойчивых к пяти последовательным расам. Появление расы F привело к идентификации устойчивых генотипов, контролируемых одним доминантным геном *Or*₆ [18; 19], двумя рецессивными генами *or*₆*or*₇ [20; 21] и двумя частично доминантными генами *Or*₆*Or*₇ [22]. Таким образом, разница в

способе наследования обусловлена различным происхождением генетического материала. Ранее в селекционных программах подсолнечника использовались доминантные гены устойчивости к зарази-хе, вплоть до обнаружения рецессивной устойчивости. Рецессивные гены могут повлиять на более длительную устойчи-вость к соответствующему паразиту, но приводят к необходимости включения генов устойчивости в обе родительские линии для развития резистентного гибри-да [20]. Большинство моделей, которые пытаются объяснить устойчивость, пред-полагает, что доминантная устойчивость является активным процессом, когда рас-тение синтезирует соединения, мешаю-щие паразиту. И наоборот, рецессивная резистентность может быть результатом того, что в растительных клетках отсутст-вуют некоторые факторы, необходимые для жизненного цикла патогена [16].

Точное определение локализации гена устойчивости необходимо для выявления маркеров, которые могут быть использо-ваны в маркер-ассоциированной селекции (МАС). Ген *Or₅*, контролирующий устой-чивость к расе Е зарази-хи, был картиро-ван в теломерной области хромосомы 3 [23; 24; 25]. Кроме того, обнаружены пять QTL для устойчивости к расе Е и шесть QTL для устойчивости к расе F в семи разных хромосомах [19]. Фенотипическая дисперсия устойчивости к расе Е главным образом объяснялась основным QTL *or3.1* на хромосоме 3, связанным с признаком устойчивости или восприимчивости. Ближайшим маркером к гену устойчи-вости к расе выше F, предварительно обо-значенным как *or_{ab-vl-8}*, был ORS683 с генетическим расстоянием 1,5 сМ на хромосоме 3 [2]. Хотя этот ген был кар-тирован на той же хромосоме, что и *Or₅*, авторы доказали, что два гена устойчи-вости различны. В то время как ген *Or₅* на-ходится в верхнем конце хромосомы 3 с ближайшим микросателлитным маркером ORS1036, находящимся на 7,5 сМ ниже по карте, *or_{ab-vl-8}* картирован в нижней

области хромосомы 3. Позже, I. Imerovski et al. [26] картировали два основных QTL на хромосоме 3. Обозначили QTL *or3.1* и QTL *or3.2*. QTL *or3.1* был расположен в геномной области, где картирован преды-дущий ген устойчивости к зарази-хе *Or₅*, в то время как QTL *or3.2* был идентифици-рован в нижней области той же хромосо-мы. Авторы провели четыре различных скрещивания с четырьмя различными ис-точниками устойчивости к зарази-хе и смогли идентифицировать основной QTL. Обнаружено, что во всех скрещиваниях QTL устойчивости находились в 3-й хро-мосоме. Были картированы от 2 до 23 значимых QTL в геноме подсолнечника. Ген устойчивости к расе F *O. cuman*a был картирован на хромосоме 7 [27].

Для развития селекционной програм-мы по подсолнечнику необходим поиск генов устойчивости к новым расам и под-бор ДНК-маркеров к ним для развития маркер-ассоциированной селекции. Дан-ные маркеры ускорят и упростят отбор по интересующему признаку. В связи с этим цель работы – поиск молекулярных мар-керов для генов, контролирующих устой-чивость к расе G зарази-хи в материале подсолнечника отечественной селекции на основе применения методов ПЦР с из-вестными SSR и SCAR праймерами.

Для достижения цели необходимо ре-шить следующие задачи:

- поиск молекулярных маркеров, сцеп-ленных с геном устойчивости *Or₇* к расе G зарази-хи *O. cuman*a в линиях подсол-нечника селекции ВНИИМК;
- оценка коллекции линий подсолнеч-ника ВНИИМК, устойчивых и восприим-чивых к расе G зарази-хи по международной классификации, методом полимеразной цепной реакции амплифи-кации ДНК по SSR- и SCAR-маркерам, сцепленным с разной частотой рекомби-нации с *Or₇*;
- определение пар гибридизации для получения потомства F₁ и F₂ для даль-нейшего гибридологического анализа.

Материалы и методы. Материалом исследования служили шесть линий-доноров, устойчивых к расе G зарази-хи:

RGP1, RGP2, RGB, RGL1, RGL2, RGA, которые были созданы на центральной экспериментальной базе ВНИИМК с использованием источников разного происхождения, резистентных к расе G и всем предыдущим [28], а также линии ВК 101, ВК 678, ВК 680, селекции ВНИИМК восприимчивые к расе G заразики.

Выделение и очистка ДНК.

ДНК подсолнечника выделили из верхушечных листьев молодых побегов вегетирующих растений. Отборы проводились из пяти индивидуальных растений каждого образца. Выделение ДНК производилось по методу M. Saghai-Marooft et al. [29]. Для получения качественных образцов на одном из этапов использовали активированный уголь [30]. Навеску 0,2 г растительной ткани гомогенизировали с использованием гомогенизатора Speed Mill plus (Analytic Jena, Германия). Концентрацию ДНК в полученном препарате определяли по интенсивности свечения пробы объемом 10 мкл в ультрафиолетовом свете после разгонки в 1%-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий.

Проведение реакции.

Для проведения полимеразной цепной реакции использовали 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 67 мМ трис-HCl, pH 8,8; 16,6 мМ сульфата аммония; 1,5–3,0 мМ MgCl₂; 0,01 % Tween 20; по 0,2 мМ дезоксирибонуклеозидфосфатов; по 10 пМ праймеров; 10 нг матричной ДНК и 1 ед. рекомбинантной термостабильной ДНК полимеразы (Сибэнзим, Россия). Для амплификации использовали термоциклер S1000TM (BioRad, США). Условия амплификации: начальная денатурация – 2 мин 96 °C, затем 30 циклов при соблюдении температурно-временного режима: денатурация при 94 °C – 30 сек, отжиг при 60 °C в течение 40 сек, элонгация – 1 мин при 70 °C, финальная элонгация – 2 мин.

Для ПЦР анализа использовали два типа праймеров:

- SCAR (sequence characterized amplified region) [24];

- SSR (simple sequence repeat) [25].

В общей сложности испытанию подверглись 17 пар праймеров. Нуклеотидные последовательности праймеров, фланкирующих ДНК-локусы, синтезированы фирмой «Синтол» (Россия).

Визуализация продуктов ПЦР.

Электрофорез продуктов амплификации проводили в агарозном геле (2 % агароза, 1xSB-буфер) с использованием камеры для горизонтального электрофореза (SE.2, Хеликон, Россия) в течение 1–1,5 ч при силе тока 50–58 мА и напряжении 80–100, а также в полиакриламидном геле (8 %, 1xТБЕ) с использованием камеры VE-20 для вертикального электрофореза (Хеликон, Россия) в течение 2,5–3 ч при силе тока 40–50 мА и напряжении 200–230. Реакционную смесь (10–12 мкл) наносили на гель вместе с красителем бромфеноловым синим. Последующее окрашивание осуществляли бромистым этидием. Результаты электрофореза документировали при помощи гель-документирующей видеосистемы BIO-PRINT (Vilber Lourmat, Франция). Размер фрагментов ДНК определяли с использованием программного обеспечения Bio-Capture (Vilber Lourmat, Франция) относительно маркера длины фрагментов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder Thermo Scientific (Сибэнзим, Россия).

Результаты и обсуждение. Проведенный ранее анализ наследования признака устойчивости к расе G заразики показал, что у линий устойчивость контролируется одним геном с неполным доминированием [31]. Для локализации гена используется анализ сцепления с молекулярным маркером. Для этой цели зарубежными исследователями были составлены молекулярно-генетические карты групп сцепления генома подсолнечника [25; 32]. На их основании проводился подбор генетических маркеров к гену *Or₇* [32] (рис. 1).

Рисунок 1 – Молекулярно-генетическая карта LG3 подсолнечника.

Микросателлитные маркерные локусы, амплифицированные полимеразной цепной реакцией и локализованные рядом с геном *or_{ab-vl-8}*

Картирование, основанное на анализе сцепления, показывает лишь относительные расстояния между исследуемыми локусами, однако на данный момент проведена сборка репрезентативного генома *H. annuus* – HanXRQr1.0, включающего в себя физическую карту группы сцепления на основании данных полногеномного секвенирования методом дробовика [33; 34]. С помощью инструмента Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®) можно осуществлять поиск и сопоставление нуклеотидных последовательностей со сборкой репрезентативного генома, оценивать генетические расстояния изучаемых локусов в п.н., а в дальнейшем осуществлять поиск генов-кандидатов в искомой области [35].

В рамках исследования используемые в работе SSR и SCAR локусы были сопоставлены со сборкой HanXRQr1.0. По этим данным составлена физическая карта положения локусов (рис. 2).

Рисунок 2 – Положение SSR и SCAR локусов, предположительно сцепленных с геном *Or₇* в LG3 *H. annuus*

Локусы гибридизации для праймеров ORS 1036, RTS 05, ORS 1021 и ORS 777 не обнаружены в LG3, что может говорить об их положении в других группах или об отсутствии части последовательности в сборке репрезентативного генома HanXRQr1.0. Положения локусов на физической карте распределились на две условные группы, которые совпадали с составленной ранее молекулярно-генетической картой [32]. В верхней части LG3 располагается группа локусов, находящихся выше предполагаемого нахождения гена *or_{ab-vl-8}* на молекулярно-генетической карте, а в нижней части – группа, помещенная ниже данного гена. Также локусы верхней группы располагаются плотнее по отношению друг к другу, в отличие от локусов нижней группы, что тоже отмечено на молекулярно-генетической карте (рис. 1).

Таким образом, физическая карта локусов гибридизации может быть эффективным инструментом для более точного анализа и подбора маркеров. При появлении новых версий сборки генома карта будет актуализироваться.

Изучаемые линии подсолнечника были проанализированы на наличие полиморфизма по длине и наличие амплифицированных фрагментов ДНК при ПЦР с

используемыми праймерами (таблица).

Таблица

Аmplифицированные фрагменты ДНК, полученные при проведении ПЦП с SSR- и SCAR-праймерами на ДНК родительских линий подсолнечника

Маркер	Генотип								
	RGL1	RGL2	RGB	RGA	RGP1	RGP2	BK678	BK680	BK101
ORS 665	294	294	294	294	294	294	294	294	294
ORS 485	324	324	324	324	324	324	324	324	324
ORS 683	400	400	400	400	400	400	364	364	364
ORS 1080	369	369	369	379	379	379	379	375	379
ORS 657	274	274	274	263	263	274	263	263	263
ORS 1222	490	490	490	490	490	490	490	490	490
ORS 1112	347 /375	347 /375	375	347 /375	375	347 /375	347	-*	347
ORS 202	309	309	309	333	333	333	309	309	309
ORS 1040	200	200	-	200	200	200	192	200	200
ORS 777	315	315	315	315	315	315	315	315	315
ORS 1021	270	270	270	270	270	270	270	270	270
RTS 05	-	-	-	+	+	+	+	-	+
RTS 40	-	+	-	-	-	-	-	+	+
RTS 40(2)	-	+	-	-	-	-	-	+	+
RTS 28(L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ORS 432	163	163	163	163	163	163	163	163	163
RTS 29(L)	1	1	1	2	2	2	2	2	2

* +/- присутствие/отсутствие амплифицированного фрагмента

При оценке шести устойчивых и трех восприимчивых родительских линий полиморфизм по длине локуса показали маркеры: ORS 683, ORS 1112, ORS 1080, ORS 657, ORS 202, ORS 1040, RTS 29 (L). По принципу наличия/отсутствия амплифицированного фрагмента полиморфизм наблюдался по локусам RTS 05 и RTS 40. Оставшиеся маркеры показали себя мономорфными для всех изучаемых линий, и дальнейшее их применение в исследовании нецелесообразно. Для гибридологического анализа необходим подбор наибольшего количества полиморфных маркеров и контрастных линий по искомому признаку для гибридизации и оценки в F₁ и F₂. Для этих целей выделили маркеры ORS 683 и ORS 1112, у которых была замечена связь полиморфизма маркера с восприимчивостью растений родительских линий к заражению. Восприимчивые линии характеризовались аллелем ORS 683 длиной 364 п.н. (таблица) и полным отсутствием аллеля длиной 375 п.н. у локуса ORS 1112 (рис. 3). Данные

маркеры находятся в относительной близости к гену *or_{ab-vl-8}* на молекулярно-генетической карте ORS 683 – 1,5 сМ, ORS 1112 – 11,3 сМ (рис. 1), а на физической карте ORS 683 является самым близкорасположенным локусом к ORS 1112 с расстоянием между ними порядка 4,25 млн п.н. (рис. 2).

Рисунок 3 – Электрофоретические спектры локуса ORS 1112

Дорожки: 1, 4, 5 – RGL1; 2, 3 – RGL2; 6–8 – RGB; 9, 10 – RGA; 11, 12, 16 – RGP1; 13–15 – RGP2; 17 – BK 678; 18 – BK 680; 19 – BK 101; М – маркер молекулярной массы 100 бр. Стрелкой обозначен фрагмент ДНК 375 п.н.

На основании вышеописанного, принято решение использовать маркеры ORS 683 и ORS 1112 как основные. Для гибридологического анализа выбраны пары для скрещиваний: RGP2 × BK 680, BK 678 × RGP2, BK 680 × RGB, RGL1 × BK 678, BK 678 × RGP1, BK 680 × RGL1 (RGL1 × BK 680). Для гибридологического анализа будут использованы основные маркеры (для всех гибридных комбинаций), а также маркеры, показавшие полиморфизм между двумя родительскими формами.

Выводы. В результате проведенного исследования были определены маркеры для дальнейшей работы и выбраны пары для гибридизации и оценки в F₁ и F₂. С помощью BLAST будет актуализироваться карта локусов и будут подобраны и созданы новые маркеры, расположенные в области поиска.

Список литературы

1. Škorić D., Pacureanu M. Sunflower breeding for resistance to broomrape (*Orobanchе cumanа* Wallr.) // In: Proceedings of the International Sympo-

sium Sunflower Breeding on Resistance to Diseases, Krasnodar, Russia, 23–24 June, 2010. – P. 19–30.

2. Molinero-Ruiz L., Delavault P., Pérez-Vich B., Pacureanu-Joita M., Bulos M., Altieri E., Domínguez J. History of the race structure of *Orobanche cumana* and the breeding of sunflower for resistance to this parasitic weed: A review // Span. J. Agric. Res. – 2015. – V. 13. – 4 e10R01. DOI: 10.5424/sjar/2015134-8080.

3. Domínguez J. R-41, a sunflower restorer inbred line, carrying two genes for resistance against a highly virulent Spanish population of *Orobanche cernua* // Plant Breed. – 1996. – V. 115. – P. 203–204.

4. Jestin C., Lecomte V., Duroueix F. Current situation of sunflower broomrape in France // In: Proceedings of the 3rd International Symposium on Broomrape in Sunflower, Córdoba, Spain, 3–6 June, 2014. – P. 3–6.

5. Perez-Vich B., Velasco L., Rich P.J., Ejeta G. Marker-assisted and physiology-based breeding for resistance to root parasitic Orobanchaceae // In: Parasitic Orobanchaceae – Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013. – P. 369–391.

6. Martín-Sanz A., Malek J., Fernández-Martínez J.M., Pérez-Vich B., Velasco L. Increased virulence in sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) populations from Southern Spain is associated with greater genetic diversity // Front. Plant Sci. – 2016. – V. 7. – P. 589.

7. Fernández-Martínez J.M., Pérez-Vich B., Velasco L. Sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) // In: Sunflower. – AOCS Press: Urbana, IL, USA, 2015. – P. 129–155.

8. Kaya Y. Current situation of sunflower broomrape around the world // In Proceedings of the 3rd International Symposium on Broomrape (*Orobanche* spp.) in Sunflower, Cordoba, Spain, 3–6 June, 2014. – P. 9–18.

9. Antonova T.S. The history of interconnected evolution of *Orobanche cumana* Wallr. and sunflower in the Russian Federation and Kazakhstan // Helia. – 2014. – V. 37. – P. 215–225.

10. Duca M., Port A., Boicu A. Molecular Characterisation of Broomrape Populations from Republic of Moldova using SSR Markers // Helia. – 2017. – V. 40. – P. 47–60.

11. Antonova T.S., Araslanova N.M., Strelnikov E.A., Ramazanov S.A., Tchelustnikova T.A., Guchetl S.Z. Screening of wild *Helianthus* species for resistance to high virulent *Orobanche cumana* Wallr., affecting sunflower in the Rostov region of the Russian Federation // Helia. – 2011. – V. 34. – P. 115–123.

12. Maklik E., Kyrychenko V.V., Pacureanu M.J. Race composition and phenology of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in Ukraine // In: Proceedings of the 4th International Symposium on Broomrape in Sunflower, Bucharest, Romania, 2–4 July, 2018. – P. 67–78.

13. Pacureanu J.M., Raranciuc S., Sava E., Stanciu D., Nastase D. Virulence and aggressiveness of sunflower (*Orobanche cumana* Wallr.) populations in Romania // Helia. – 2014. – V. 32. – P. 111–118.

14. Miladinović D., Dedić B., Quiroz F., Alvarez D., Poverene M., Cantamutto M. *Orobanche cumana* Wallr. Resistance of commercial sunflower cultivars grown in Argentina // J. Basic Appl. Genet. – 2012. – V. 23. – P. 37–41.

15. Dedić B., Miladinović D., Jocić S., Cvejić S., Jocković M., Miklić V. Increase in virulence of sunflower broomrape in Serbia // In: Proceedings of the 4th International Symposium on Broomrape in Sunflower, Bucharest, Romania, 2–4 July, 2018. – P. 27–35.

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

17. Vranceanu A.V., Tudor V.A., Stoenescu F.M., Pirvu N. Virulence groups of *Orobanche cumana* Wallr. differential hosts and resistance sources and genes in sunflower // In: Proceedings of the 9th International Sunflower Conference, Torremolinos, Spain, 8–13 June, 1980. – P. 74–80.

18. Pacureanu-Joita M., Vranceanu A.V., Soare G., Marinescu A., Sandu I. The evaluation of the parasite-host interaction system (*Helianthus annuus* L.) (*Orobanche cumana* Wallr.) in Romania // In: Proceedings of the 2nd Balkan Symposium on Field Crops, Novi Sad, Yugoslavia, 16–20 June, 1998. – P. 1–20.

19. Pérez-Vich B., Akhtouch B., Knapp S., Leon A., Velasco L., Fernández-Martínez J., Berry S.T. Quantitative trait loci for broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) resistance in sunflower // Theor. Appl. Genet. – 2004. – V. 109. – P. 92–102.

20. Akhtouch B., Muñoz-Ruz J., Melero-Vara J.M., Fernández-Martínez J.M., Domínguez J. Inheritance of resistance to race F of broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower lines of different origin // Plant Breed. – 2002. – V. 121. – P. 266–268.

21. Fernández-Martínez J., Pérez-Vich B., Akhtouch B., Velasco L., Muñoz-Ruz J., Melero-Vara J.M., Domínguez J. Registration of Four Sunflower Germplasms Resistant to Race F of Broomrape // Crop Sci. – 2004. – V. 44. – P. 1033–1034.

22. Akhtouch B., del Moral L., Leon A., Velasco L., Fernández-Martínez J.M., Pérez-Vich B. Genetic study of recessive broomrape resistance in sunflower // Euphytica. – 2016. – V. 209. – P. 419–428.

23. Lu Y.H., Gagne G., Grezes-Besset B., Blanchard P. Integration of a molecular linkage group containing the broomrape resistance gene *Or₅* into an RFLP map in sunflower // Genome. – 1999. – V. 42. – P. 453–456.

24. Lu Y., Melero-Vara J., Garcia-Tejada J., Blanchard P. Development of SCAR markers linked to the gene *Or₅* conferring resistance to broomrape

(*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower // Theor. Appl. Genet. – 2000. – V. 100. – P. 625–632.

25. 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 Sci. – 2003. – V. 43. – P. 1021–1028.

26. Imerovski I., Dedić B., Cvejić S., Miladinović D., Jocić S., Owens G.L., Kociš Tubić N., Rieseberg L.H. BSA-seq mapping reveals major QTL for broomrape resistance in four sunflower lines // Mol. Breed. – 2019. – V. 39. – P. 39–41.

27. Duriez P., Vautrin S., Auric M.C., Bazerque J., Boniface M.C., Callot C., Carrère S., Cauet S., Chabaud M., Gentou F. [et al.]. A receptor-like kinase enhances sunflower resistance to *Orobanche cumana* // Nat. Plants. – 2019. – V. 5. – P. 1211–1215.

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

29. Saghai-Marouf 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. – 1984. – V. 81. – P. 8014–8018.

30. Bi I.V. [et al.]. Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction // Plant Breeding. – 1996. – V. 115. – P. 205–206.

31. Гучетль С.З., Антонова Т.С., Арасланова Н.М., Челюстникова Т.А., Путинова Ю.В. Генетический анализ устойчивости к расе G *Orobanche cumana* Wallr. в F2 и BC1 линий подсолнечника RGP1, RGP2, RGB, RGL1, RGL2 // Масличные культуры. – 2019. – Вып. 4 (180). – С. 23–28. DOI: 10.25230/2412-608X-2019-4-180-23-28.

32. Imerovski I., Dimitrijevic A., Miladinovic D., Dedic B., Sinisa J., Kocis N. Cvejić S. Mapping of a new gene for resistance to broomrape races higher than F // Euphytica. – 2015. – V. 209. – P. 281–289. DOI: 10.1007/s10681-015-1597.

33. Badouin H., Gouzy J., Grasse C. [et al.]. The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution // Nature. – 2017. – V. 546. – P. 148–152. <https://doi.org/10.1038/nature22380>.

34. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_002127325.1.

35. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

References

1. Škorić D., Pacureanu M. Sunflower breeding for resistance to broomrape (*Orobanche cumana*

Wallr.) // In: Proceedings of the International Symposium Sunflower Breeding on Resistance to Diseases, Krasnodar, Russia, 23–24 June, 2010. – P. 19–30.

2. Molinero-Ruiz L., Delavault P., Pérez-Vich B., Pacureanu-Joita M., Bulos M., Altieri E., Domínguez J. History of the race structure of *Orobanche cumana* and the breeding of sunflower for resistance to this parasitic weed: A review // Span. J. Agric. Res. – 2015. – V. 13. – 4 e10R01. DOI: 10.5424/sjar/2015134-8080.

3. Domínguez J. R-41, a sunflower restorer inbred line, carrying two genes for resistance against a highly virulent Spanish population of *Orobanche cernua* // Plant Breed. – 1996. – V. 115. – P. 203–204.

4. Jestin C., Lecomte V., Duroueix F. Current situation of sunflower broomrape in France // In: Proceedings of the 3rd International Symposium on Broomrape in Sunflower, Córdoba, Spain, 3–6 June, 2014. – P. 3–6.

5. Perez-Vich B., Velasco L., Rich P.J., Ejeta G. Marker-assisted and physiology-based breeding for resistance to root parasitic Orobanchaceae // In: Parasitic Orobanchaceae – Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013. – P. 369–391.

6. Martín-Sanz A., Malek J., Fernández-Martínez J.M., Pérez-Vich B., Velasco L. Increased virulence in sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) populations from Southern Spain is associated with greater genetic diversity // Front. Plant Sci. – 2016. – V. 7. – P. 589.

7. Fernández-Martínez J.M., Pérez-Vich B., Velasco L. Sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) // In: Sunflower. – AOCS Press: Urbana, IL, USA, 2015. – P. 129–155.

8. Kaya Y. Current situation of sunflower broomrape around the world // In Proceedings of the 3rd International Symposium on Broomrape (*Orobanche* spp.) in Sunflower, Cordoba, Spain, 3–6 June, 2014. – P. 9–18.

9. Antonova T.S. The history of interconnected evolution of *Orobanche cumana* Wallr. and sunflower in the Russian Federation and Kazakhstan // Helia. – 2014. – V. 37. – P. 215–225.

10. Duca M., Port A., Boicu A. Molecular Characterization of Broomrape Populations from Republic of Moldova using SSR Markers // Helia. – 2017. – V. 40. – P. 47–60.

11. Antonova T.S., Araslanova N.M., Strelnikov E.A., Ramazanov S.A., Tchelustnikova T.A., Guchetl S.Z. Screening of wild *Helianthus* species for resistance to high virulent *Orobanche cumana* Wallr., affecting sunflower in the Rostov region of the Russian Federation // Helia. – 2011. – V. 34. – P. 115–123.

12. Maklik E., Kyrychenko V.V., Pacureanu M.J. Race composition and phenology of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in Ukraine // In: Proceedings of the 4th International Symposium on Broomrape in Sunflower, Bucharest, Romania, 2–4 July, 2018. – P. 67–78.

13. Pacureanu J.M., Raranciuc S., Sava E., Stanciu D., Nastase D. Virulence and aggressiveness of sunflower (*Orobanche cumana* Wallr.) populations in Romania // *Helia*. – 2014. – V. 32. – P. 111–118.
14. Miladinović D., Dedić B., Quiroz F., Alvarez D., Poverene M., Cantamutto M. *Orobanche cumana* Wallr. Resistance of commercial sunflower cultivars grown in Argentina // *J. Basic Appl. Genet.* – 2012. – V. 23. – P. 37–41.
15. Dedić B., Miladinović D., Jocić S., Cvejić S., Jocković M., Miklić V. Increase in virulence of sunflower broomrape in Serbia // In: Proceedings of the 4th International Symposium on Broomrape in Sunflower, Bucharest, Romania, 2–4 July, 2018. – P. 27–35.
16. Imerovski I., Dimitrijević A., Miladinović D., Dedić B., Jocić S., Kociš Tubić N., Cvejić S. Mapping of a new gene for resistance to broomrape races higher than F // *Euphytica*. – 2016. – Vol. 209. – P. 281–289.
17. Vranceanu A.V., Tudor V.A., Stoenescu F.M., Pirvu N. Virulence groups of *Orobanche cumana* Wallr. differential hosts and resistance sources and genes in sunflower // In: Proceedings of the 9th International Sunflower Conference, Torremolinos, Spain, 8–13 June, 1980. – P. 74–80.
18. Pacureanu-Joita M., Vranceanu A.V., Soare G., Marinescu A., Sandu I. The evaluation of the parasite-host interaction system (*Helianthus annuus* L.) (*Orobanche cumana* Wallr.) in Romania // In: Proceedings of the 2nd Balkan Symposium on Field Crops, Novi Sad, Yugoslavia, 16–20 June, 1998. – P. 1–20.
19. Pérez-Vich B., Akhtouch B., Knapp S., Leon A., Velasco L., Fernández-Martínez J., Berry S.T. Quantitative trait loci for broomrape (*Orobanche Cumana* Wallr.) resistance in sunflower // *Theor. Appl. Genet.* – 2004. – V. 109. – P. 92–102.
20. Akhtouch B., Muñoz-Ruz J., Melero-Vara J.M., Fernández-Martínez J.M., Domínguez J. Inheritance of resistance to race F of broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower lines of different origin // *Plant Breed.* – 2002. – V. 121. – P. 266–268.
21. Fernández-Martínez J., Pérez-Vich B., Akhtouch B., Velasco L., Muñoz-Ruz J., Melero-Vara J.M., Domínguez J. Registration of Four Sunflower Germplasms Resistant to Race F of Broomrape // *Crop Sci.* – 2004. – V. 44. – P. 1033–1034.
22. Akhtouch B., del Moral L., Leon A., Velasco L., Fernández-Martínez J.M., Pérez-Vich B. Genetic study of recessive broomrape resistance in sunflower // *Euphytica*. – 2016. – V. 209. – P. 419–428.
23. Lu Y.H., Gagne G., Grezes-Besset B., Blanchard P. Integration of a molecular linkage group containing the broomrape resistance gene *Or₅* into an RFLP map in sunflower // *Genome*. – 1999. – V. 42. – P. 453–456.
24. Lu Y., Melero-Vara J., García-Tejada J., Blanchard P. Development of SCAR markers linked to the gene *Or₅* conferring resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower // *Theor. Appl. Genet.* – 2000. – V. 100. – P. 625–632.
25. 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 Sci.* – 2003. – V. 43. – P. 1021–1028.
26. Imerovski I., Dedić B., Cvejić S., Miladinović D., Jocić S., Owens G.L., Kociš Tubić N., Rieseberg L.H. BSA-seq mapping reveals major QTL for broomrape resistance in four sunflower lines // *Mol. Breed.* – 2019. – V. 39. – P. 39–41.
27. Duriez P., Vautrin S., Auriac M.C., Bazerque J., Boniface M.C., Callot C., Carrère S., Cauet S., Chabaud M., Gentou F. [et al.]. A receptor-like kinase enhances sunflower resistance to *Orobanche cumana* // *Nat. Plants*. – 2019. – V. 5. – P. 1211–1215.
28. Antonova T.S., Strel'nikov E.A., Araslanova N.M., Guchetl' S.Z., Chelyustnikova T.A. Otbor na ustoychivost' k rase G zarazikhi iz rasshcheplyayushchikhsya populyatsiy podsolnechnika v iskusstvennykh usloviyakh vyrashchivaniya // *Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK*. – 2017. – Vyp. 3 (171). – S. 18–22.
29. Saghai-Maroo 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*. – 1984. – V. 81. – P. 8014–8018.
30. Bi I.V. [et al.]. Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction // *Plant Breeding*. – 1996. – V. 115. – V. 3. – P. 205–206.
31. Guchetl' S.Z., Antonova T.S., Araslanova N.M., Chelyustnikova T.A., Pitinova Yu.V. Geneticheskiy analiz ustoychivosti k rase G *Orobanche cumana* Wallr. v F₂ i VS1 liniy podsolnechnika RGP1, RGP2, RGV, RGL1, RGL2 // *Maslichnye kul'tury*. – 2019. – Vyp. 4 (180). – S. 23–28. DOI: 10.25230/2412–608Kh–2019–4–180–23–28.
32. Imerovski I., Dimitrijevic A., Miladinovic D., Dedic B., Sinisa J., Kocis N. Cvejic S. Mapping of a new gene for resistance to broomrape races higher than F // *Euphytica*. – 2015. – V. 209. – P. 281–289. DOI: 10.1007/s10681-015-1597.
33. Badouin H., Gouzy J., Grassa C. [et al.]. The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution // *Nature*. – 2017. – V. 546. – P. 148–152. <https://doi.org/10.1038/nature22380>.
34. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_002127325.1.
35. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Получено: 20.08.2020 Принято: 05.10.2020
 Received: 20.08.2020 Accepted: 05.10.2020