

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МАСЛИЧНЫХ
КУЛЬТУР ИМЕНИ В.С. ПУСТОВОЙТА»

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

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Гучетль Саида Заурбиевна

Краснодар

2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ	10
1.1 Подсолнечник в мировом и российском сельском хозяйстве: история, современное значение и направления селекции	10
1.2 Заразиха как основной лимитирующий фактор производства подсолнечника	16
1.3 Стратегии контроля заразихи в агроценозах подсолнечника	21
1.3.1 Агротехнические приемы ограничения вредоносности заразихи	22
1.3.2 Биологические подходы к снижению вредоносности паразита	24
1.3.3 Химические методы борьбы с заразихой	25
1.3.4 Селекция подсолнечника на устойчивость к заразихе	27
1.4 Генетический контроль устойчивости подсолнечника к заразихе и создание устойчивых форм	30
1.5 Маркер-вспомогательная селекция подсолнечника как инструмент повышения точности и эффективности отбора	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
2.1 Растительный материал	42
2.1.1 Подсолнечник (<i>Helianthus annuus</i> L.)	42
2.1.2 Заразиха кумская (<i>Orobanchе cumanа</i> Wallr.)	44
2.2 Фенотипирование устойчивости подсолнечника	45
2.3 Дизайн ДНК-маркеров <i>in silico</i>	46
2.4 Выделение геномной ДНК	48
2.5 Условия проведения и визуализация результатов ПЦР	50
2.6 Статистический анализ	51
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	53
3.1 Анализ ассоциации микросателлитных локусов из предполагаемой области локализации гена с устойчивостью к расе G _{RU} заразихи	53

3.2 Разработка новых ДНК-маркеров и исследование их ассоциации с признаком устойчивости	60
3.3 Валидация маркерной системы на расщепляющихся популяциях подсолнечника.....	69
3.4 Разработка аллель-специфичного ДНК-маркера для ПЦР в реальном времени, валидация и сравнительный анализ двух маркерных систем	77
3.5 Эффективность разработанных маркерных систем для создания гомозиготного по гену устойчивости сорта подсолнечника.	93
3.6 Анализ распространенности гена <i>HaOr7</i> среди коммерческих гибридов подсолнечника, возделываемых на территории РФ, и оценка его стратегической роли в обеспечении устойчивости к расе G _{RU} заразики ...	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
ВЫВОДЫ.....	116
ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ СЕЛЕКЦИОННОЙ ПРАКТИКИ	117
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ПОНЯТИЙ И СОКРАЩЕНИЙ	118
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ	121
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	125
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	163
Приложение А – Результаты анализа изученных локусов у родительских линий подсолнечника	163
Приложение Б – Результаты ПЦР с разработанными ДНК-маркерами.....	164
Приложение В – Описание линий, проанализированных с помощью мультиплексной ПЦР с маркерами RORS1/SORS1	165
Приложение Г – Описание линий, проанализированных с помощью мультиплексной ПЦР с маркерами RORS1/SORS9	166
Приложение Д – Описание коммерческих гибридов различных селекционных компаний и результаты их анализа	167
Приложение Е – Акт о внедрении результатов диссертационной работы	170

ВВЕДЕНИЕ

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 *Orobanchе 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} заразики является актуальной задачей.

Цель исследования:

Изучить молекулярно-генетический контроль устойчивости подсолнечника к расе G_{RU} заразики, 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 заразики;
2. Разработать новые ДНК-маркеры, провести анализ их ассоциации с признаком устойчивости подсолнечника к расе G_{RU} заразики 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} заразики;
5. Оценить распространенность маркированного гена устойчивости у возделываемых в РФ коммерческих гибридов подсолнечника, отнесенных к разным группам устойчивости к заразики.

Научная новизна исследования. Впервые разработаны внутригенные кодоминантные ДНК-маркеры гена *HaOr7* подсолнечника, как для классической ПЦР (Патент № 2830955 С1, 2024), так и для ПЦР в реальном времени (Патент № 2851468 С1, 2025). На молекулярно-генетическом уровне экспериментально подтверждена роль данного гена как главной детерминанты устойчивости к расе G заразики, 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 заразики 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} заразики.

Теоретическая значимость работы. На молекулярно-генетическом уровне подтверждена роль гена *HaOr7* как ключевой детерминанты устойчивости подсолнечника к заразики 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 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} заразики в агроценозах подсолнечника. Результаты исследования вносят вклад в понимание молекулярно-генетических основ устойчивости подсолнечника к расе G_{RU} заразики, 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} заразики 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} заразики 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 *Or7* и контролирует устойчивость к расе G_{RU} заразики, преобладающей на территории Российской Федерации

2. Вклад аллельного состояния гена *HaOr7* в формирование устойчивости подсолнечника к расе G_{RU} заразики 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 заразики.

Апробация результатов. Основные результаты диссертационного исследования были представлены на 5-ом Международном симпозиуме по заразики 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 заразики 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:

– FG RU-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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1.1 Подсолнечник в мировом и российском сельском хозяйстве: история, современное значение и направления селекции

Подсолнечник культурный (*Helianthus annuus* L.) относится к семейству *Asteraceae* (Compositae) и является однолетним перекрестноопыляемым растением (Fernández-Martínez et al., 2009; Blackman et al., 2011). Вид характеризуется диплоидным набором хромосом ($2n = 34$), что соответствует гаплоидному числу $n = 17$ (Badouin et al., 2017). Геном *H. annuus* отличается большим размером и высоким содержанием повторяющихся последовательностей. Первая высококачественная сборка референсного генома подсолнечника составила 3,6 Гб (Badouin et al., 2017; Ventimiglia, 2023). Позднее, с помощью новых технологий – секвенирования длинных чтений и Hi-C картирования, была уточнена оценка размера генома – около 3,1 Гб. Этот результат был достигнут за счет повышения точности сборки и аннотирования повторов (Huang et al., 2023, Yi et al., 2025). Анализ повторяющихся последовательностей сыграл важную роль, так как более 80 % генома подсолнечника представлено транспозируемыми элементами, которые являются основным фактором увеличения размера генома и формирования его современной структуры (Kirov et al., 2020; Ventimiglia et al., 2023).

Род *Helianthus* L. характеризуется высоким видовым разнообразием. Согласно таксономическим обзорам, он включает 52–53 вида, распространенных преимущественно в Северной Америке (Schilling, 2006; Seiler et al., 2017; Terzić et al., 2020). В составе рода выделяют 14 однолетних и 39 многолетних видов, являющихся как диплоидными, так и тетраплоидными и гексаплоидными формами. Высокий уровень внутривидового и межвидового генетического разнообразия делает род *Helianthus* богатым источником генетических ресурсов для селекции, особенно по признакам устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам (Seiler, 2019).

Центром происхождения культурного подсолнечника считается юго-западная часть Северной Америки. Археоботанические данные свидетельствуют о

его domestikации более 4000–4500 лет назад коренными народами Северной Америки, которые использовали его в пищу и как источник масла (Putt, 1997; Molinero-Ruiz et al., 2015). Интродукция подсолнечника в Европу была осуществлена испанскими мореплавателями в начале XVI века, где он выращивался в качестве декоративного растения. В XVII веке подсолнечник распространился в Восточную Европу и Россию, где в дальнейшем сформировалось масличное направление его использования (Putt, 1997). Этот процесс сопровождался переходом от декоративного выращивания к стихийному отбору растений для сельскохозяйственного возделывания. По свидетельствам В. С. Пустовойта, к началу XX века среди сортов народной селекции встречались как раннеспелые низкорослые типы, так и высокорослые позднеспелые растения с продолжительным вегетационным периодом; при этом данные сорта представляли собой «чрезвычайно пестрые смеси» (Пустовойт, 1926; Пустовойт, 1940). Это свидетельствует о высоком уровне внутрипопуляционного генетического разнообразия, сформированного в результате длительного стихийного отбора.

Переход к систематической и научно-обоснованной селекции относится к 1909–1913 гг., когда были начаты работы на опытно-селекционном поле «Круглик» под руководством В.С. Пустовойта, а также на Саратовской опытной станции (Е.М. Плачек) и в Харькове (В.Б. Енкен) (Пустовойт, 1926; Плачек, 1928). В 1916 г. методом многократного индивидуального отбора был создан сорт Круглик 7-15-163, превосходивший местные сорта по урожайности вплоть до 25 %. В дальнейшем, на его основе был выведен более продуктивный сорт Круглик 631 (Пустовойт, 1926, 1927). Первые районированные сорта подсолнечника, такие как «Маслянка» (к-619), «Успенка» (к-768) и др., характеризовались сравнительно невысокой масличностью – 28–33 % (Купцов, 1931). В 1927 г. был передан в государственное испытание сорт Круглик А-41, на котором была продемонстрирована возможность целенаправленной селекции на повышение масличности семян до 36 % (Пустовойт, 1939; Хатнянский, 2020). В дальнейшем селекция на повышение содержания масла привела к созданию высокомасличных сортов с уровнем масличности, стабильно превышающим 50 % масла в семенах

(Морозов, 1964; Пустовойт, 1975). Достижение столь высокого уровня масличности стало ключевым фактором становления подсолнечника как ведущей мировой масличной культуры.

Вторым ключевым фактором в развитии подсолнечника в XX веке стало открытие цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) PET1, полученной межвидовой гибридизацией *H. petiolaris* Nutt. × *H. annuus* L. (Leclercq, 1969) и обнаружение ядерных генов-восстановителей фертильности (Rf) (Enns et al., 1970; Kinman, 1970; Horn, 2003). Внедрение системы ЦМС-Rf создало технологическую основу для появления первого гибрида F₁ (Putt, 1978) и обеспечило практическую реализацию эффекта гетерозиса (Ahmed, 2021). Выраженный гетерозис по урожайности, масличности и адаптивности обеспечил существенные экономические преимущества гибридов по сравнению с сортами-популяциями, что определило быстрое распространение гибридов F₁ (Bohra, 2016; Seiler, 2017). Уже к концу XX века гибриды заняли доминирующее положение в структуре мировых посевных площадей подсолнечника (Serieys, 2005). Использование генетически контрастных линий и систематическая оценка их комбинационной способности стали основой гибридной селекции, обеспечив дальнейший рост количества селекционных центров и, как следствие, распространенности и продуктивности культуры (Skoric, 2012).

По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (Food and Agriculture Organization, FAO), в 2023 г. мировое производство семян подсолнечника составило 56,32 млн т, в 2024 г. – 52,22 млн т. Лидирующие позиции стабильно занимают Российская Федерация, Украина и Аргентина. В 2023 г. на долю Российской Федерации пришлось 16,68 млн т, Украины – 14,20 млн т, Аргентины – 4,10 млн т; в 2024 г. – 17,20; 10,96 и 3,90 млн т, соответственно. Таким образом, Российская Федерация и Украина формируют порядка 54 % мирового валового сбора, что определяет их доминирующее значение в глобальном балансе растительных масел и экспорта маслосемян.

Роль Российской Федерации в мировой структуре производства подсолнечника в последние годы усиливается. Согласно оперативным данным

Федеральной службы государственной статистики (Росстат) в 2025 г. посевные площади подсолнечника составили 11068,8 тыс. га, что на 12,8 % превышает уровень 2024 г. Наибольшие площади в 2025 г. сосредоточены в Приволжском федеральном округе – 5161,4 тыс. га (116,0 % к уровню 2024 г.), где лидируют Саратовская (1612,3 тыс. га), Оренбургская (1406,2 тыс. га) и Самарская (794,6 тыс. га) области. Существенные площади также в Южном федеральном округе – 2474,7 тыс. га, прежде всего в Ростовской (1021,4 тыс. га) и Волгоградской (854,2 тыс. га) областях. Значительные площади под подсолнечником также в Краснодарском крае – 497,6 тыс. га, что подтверждает его значимую роль в производстве культуры.

Современный масштаб возделывания подсолнечника и его роль в мировом сельском хозяйстве являются результатом развития селекции и проведения фундаментальных биологических исследований, позволивших существенно улучшить хозяйственно-ценные признаки культуры (Škorić et al., 2012; Vear, 2016). В процессе работы последовательно формировались основные направления селекции. На ранних этапах ключевой задачей являлось повышение урожайности и масличности, поскольку именно эти два признака определяли хозяйственную ценность культуры (Пустовойт, 1975; Škorić, 2012). Позднее, в число приоритетных направлений вошли работы по изменению жирнокислотного состава масла, прежде всего созданию высокоолеиновых форм (Soldatov, 1976; Fernandez-Martinez et al., 1989), а также селекция на скороспелость, позволяющая адаптировать культуру к различным зонам возделывания (Leon et al.; Allinne et al., 2009; Cadic et al., 2013). Наряду с этим изучались признаки содержания белка, лузжистости и влагоотдачи семян, а также потенциальные возможности изменения архитектоники растения для изменения сроков вегетации (Denis et al., 1994; Dauguet et al., 2015; Brigham, Young, 1980; Liu, Leclercq, 1988). Значительные успехи в улучшении качества подсолнечного масла были достигнуты также благодаря выявлению и использованию мутантных линий с измененным составом токоферолов, что позволило создавать генотипы с различными профилями витамина Е в масле (Demurin et al., 1996; Velasco et al., 2004). Следует отметить, что за последние 50 лет спектр селекционных задач у подсолнечника заметно расширился: наряду с

классическими направлениями все большее значение играют: устойчивость к стрессовым условиям среды, селекция на качество продукции и использование молекулярно-генетических инструментов отбора (Vear, 2016; Rauf, 2019; Jocković, 2021).

Также одну из важнейших ролей в развитии селекции подсолнечника сыграли генетические банки, или коллекции генетических ресурсов растений. Длительный сбор, сохранение и изучение материала, включая дикорастущие виды и межвидовые гибриды рода *Helianthus*, способствовали расширению генетического разнообразия, предотвращая эффект «бутылочного горлышка» и введению новых источников селекционно-ценных признаков в селекционный процесс (Gavrilova et al., 2014; Гаврилова и др., 2021). Однако современная роль генетических банков не ограничивается пассивным накоплением и сохранением генетического материала, происходит трансформация коллекций в активные биоресурсные центры, в которых наряду с сохранением проводятся исследования генетического разнообразия и поиск доноров ценных признаков с использованием омиксных технологий и цифровизации. В Российской Федерации находится одна из крупнейших коллекций генетических ресурсов растений «Федеральный исследовательский центр «Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова» (ВИР), что обеспечивает широкие возможности для отечественной селекции (Сафонова и др., 2019; Хлесткина, 2022).

В настоящее время среди основных направлений селекции подсолнечника можно выделить селекцию на продуктивность, устойчивость к патогенам, качество масла, длину вегетационного периода, а также гербицидоустойчивость (Dimitrijević, 2018; Лукомец и др., 2021). Отдельными направлениями выступают создание крупноплодных кондитерских сортов (Бочковой и др., 2020; Demir, 2021) и декоративных форм подсолнечника (Перетягина, 2018; Лукомец и др., 2021; Svejčić et al., 2025). При этом селекция на продуктивность уже не сводится только к максимальному потенциалу урожая: все большее значение имеет способность генотипов сохранять высокую урожайность в стрессовых условиях, в том числе при

дефиците влаги и минерального питания (Marchand et al., 2013; Casadebaig et al., 2015).

Одним из важнейших направлений стала селекция на устойчивость к биотическим факторам. В числе наиболее значимых вредоносных объектов в литературе последних десятилетий упоминаются: растение-паразит зарази́ха *Orobanche cumana* Wallr. (Molinero-Ruiz, Domínguez, 2014; Антонова и др., 2015; Velasco et al., 2016), ложная мучнистая роса, вызываемая *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni. (Sackston, 1949; Gulya et al., 1997; Vear. et al, 1997; Антонова и др., 2006), фомопсис, вызываемый *Diaporthe helianthi* Munt.-Cvetk., Mihaljč. & M. Petrov (Viguié, 2000; Пивень В. Т. и др. 2013; Mathew et al., 2015; Krsmanović, 2024), а также склеротиниоз, обусловленный *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. (Hahn, 2002; Talukder et al., 2014; Vear, 2017). В ряде регионов заметное влияние оказывают также: фомоз стебля (*Phoma macdonaldii* Boerema), вертициллез (*Verticillium dahliae* Kleb.), альтернариоз (*Alternaria helianthi* (Hansf.) Tubaki & Nishih) и ржавчина (*Puccinia helianthi* Schwein) (Ивебор, 2013; Bordat et al, 2017; Арасланова, 2019; Martín-Sanz, 2018; Lakshmi Prasad, 2020).

Совместное развитие селекции подсолнечника и средств защиты растений привели к внедрению производственных технологий Clearfield, Clearfield Plus и ExpressSun (SUMO). Развитие этого направления связано с использованием генетической устойчивости подсолнечника к гербицидам – ингибиторам ацетолактатсинтазы (ALS) (Škorić et al., 2012; Tan et al., 2005; Sala et al., 2008). Источниками устойчивости служат мутации в гене *AHASL1*, идентифицированные в ряде линий подсолнечника и использованные в селекционных программах при создании гибридов, устойчивых к имидазолиновым и сульфонилмочевинным гербицидам (Al-Khatib et al., 1998; Sala et al., 2012; Knezevic et al., 2013). В свою очередь, разработка таких гибридов требует контроля гомозиготности растений по соответствующим аллелям устойчивости (Дему́рин, Перстенева, 2007; Bulos et al., 2013a).

Таким образом, становление подсолнечника в качестве ключевой масличной культуры стало результатом длительного селекционного процесса, который

обеспечил переход от декоративного растения к высокомаржинальной сельскохозяйственной культуре. Последовательное улучшение хозяйственно ценных признаков позволило значительно повысить урожайность и масличность, расширить ареал возделывания и обеспечить важное место культуры в структуре мировых посевных площадей. Современное разнообразие гибридов и сортов подсолнечника является результатом многолетней селекционной работы, которая была осуществлена благодаря, в том числе, не прекращающимся исследованиям биотических факторов, ограничивающих реализацию потенциала урожайности культуры, среди которых важное место занимают возбудители болезней и растения-вредители.

1.2 Заразиха как основной лимитирующий фактор производства подсолнечника

Заразиха кумская (или подсолнечная) (*Orobanche cumanana* Wallr.) является облигатным паразитом подсолнечника и считается одним из наиболее опасных биотических факторов, ограничивающих производство этой культуры в ряде регионов мира (Кауа, 2014, Molinero-Ruiz et al., 2015; Антонова, 2018). Паразит относится к семейству *Orobanchaceae* Vent. и полностью лишен фотосинтетической активности, что обуславливает его обязательную зависимость от растения-хозяина на всех этапах жизненного цикла (Parker, 2009; Joel et al., 2013).

Жизненный цикл *O. cumanana* начинается с прорастания семян, которое происходит при достаточной влажности и температуре, а также обязательной стимуляции веществами, выделяемыми корнями растения-хозяина (Delavault, 2015; Lechat et al., 2015; Антонова, 2018). В качестве основных стимуляторов прорастания выступают вещества, принадлежащие к семейству метаболитов, производных каротиноидов, называемых стриголактонами (Joel et al., 2011; Yoneyama et al., 2011; Raupp, Spring, 2013). В недавнем исследовании были также подтверждены различия в реакции растений заразихи из разных популяций к различным стимуляторам прорастания (Chabaud et al., 2022). После стимуляции

прорастания зарази́ха формирует зародышевый проросток, который растет по направлению к корню хозяина и прикрепляется к его поверхности, в дальнейшем формируя гаусторий – орган, функцией которого является проникновение паразита в ткани корня подсолнечника и установление сосудистых связей между растением-хозяином и паразитом (Joel, Losner-Goshen, 1994; Labrousse et al., 2001). Проникновение сопровождается механическим воздействием и выделением особых ферментов, разрушающих клеточные стенки, таких как гликозил-гидролазы, пектат-лиазы и пектинэстеразы (Losner-Goshen et al., 1998; Mitsumasu et al., 2015; Raupp, Spring, 2013; Yang et al., 2020). После установления сосудистых связей паразит начинает активно использовать воду и минеральные вещества растения-хозяина (Hassan et al. 2004; Krupp et al., 2019). В месте прикрепления формируется клубенек (tubercle) – орган, цель которого накопление питательных веществ для дальнейшего развития. В последствии из него развивается подземный побег, который выходит на поверхность почвы приблизительно через 40 дней и образует побег с соцветием (Stewart, Press, 1990; Aly et al. 2009). Цветение завершается образованием большого количества мелких семян – до нескольких сотен тысяч на одно растение, что обеспечивает эффективное распространение паразита (Gagne et al., 1998; Plaza et al., 2004; Pineda-Martos et al., 2013). Зарази́ха считается преимущественно самоопыляющимся видом из-за морфологии цветка и выявленной относительно низкой внутрипопуляционной генетической изменчивости (Gagne et al., 1998; Pineda-Martos et al., 2013). Тем не менее, в ряде исследований сообщалось о существовании некоторой степени перекрестного опыления (Rodriguez-Ojeda et al., 2013; Pineda-Martos et al., 2014). Семена зарази́хи сохраняют жизнеспособность в почве в течении 8–20 лет, что обеспечивает длительное сохранение популяций *O. citana* и осложняет контроль паразита (Parker, 2009; Антонова, 2018).

Распространение зарази́хи в мире стало серьезной проблемой для подсолнечника уже на ранних этапах его промышленного возделывания. Первые устойчивые формы, были получены в 1909–1913 гг. под руководством В.С. Пустовойта (Пустовойт, 1926; Жданов, 1967). Однако уже в 1927 г. из

различных районов Ростовской области, Краснодарского края, Украины и Воронежской области начали поступать сведения о сильном поражении заразой сортов подсолнечника, которые ранее считались устойчивыми (Пустовойт, 1940; Пустовойт, 1937; Рощин, 1940). Эти наблюдения свидетельствовали о наличии различий в вирулентности популяций паразита и указывали на существование различных физиологических форм заразы, способных преодолевать устойчивость ранее созданных сортов (Жданов, 1930, 1933; Рощин, 1940, Хатнянский, 2020).

В ходе дальнейших исследований было установлено, что популяции заразы подсолнечника различаются по вирулентности, что привело к выделению первых физиологических рас паразита. На основании способности поражать различные сорта подсолнечника были выделены раса А, к которой устойчивы сорта Саратовский 169, Круглик А-41 и Фуксинка 10, и более вирулентная раса В (В в международной номенклатуре), поражающая эти сорта, а в ряде районов отмечалось совместное распространение обеих рас (Пустовойт, 1926, 1939; Жданов, 1930; Бейлин, 1940). Позднее было показано, что правильнее говорить не о двух отдельных расах, а о комплексе рас заразы, различающихся по вирулентности (Пустовойт, 1937; Рощин, 1940; Бейлин, 1940, 1948; Хатнянский, 2020). В 1930-е годы распространение расы В также было отмечено на территории Молдовы и Украины (Duca, 2014; Miladinovic et al., 2014). Создание устойчивых сортов подсолнечника временно сдержало развитие паразита, однако дальнейшая эволюция привела к возникновению более вирулентных биотипов. В частности, устойчивость к расам А и В была преодолена расой С, впервые обнаруженной в 1970-е годы в Молдове. В дальнейшем аналогичным образом возникли новые расы с повышенной вирулентностью – D, E, F, G и H (Vrânceanu et al., 1980; Duca, 2014; Antonova, 2014). Дополнительные сложности вызывают проблемы в сравнении рас *O. citana* между регионами, что связано с отсутствием полностью унифицированной системы обозначения рас. Популяции паразита, формально относимые к одной и той же расе, могут существенно различаться по спектру вирулентности в зависимости от географического происхождения, что может быть

связано как с использованием различных наборов генотипов-дифференциаторов подсолнечника, так и с генетической неоднородностью популяций паразита (Škorić et al., 2010; Cvejić et al., 2020; Calderón-González et al., 2024). В связи с этим было предложено уточнять обозначение рас добавлением географического индекса, отражающего регион происхождения популяции. Так, популяция, идентифицированная в долине Гвадалквивир (Испания), была обозначена как G_{GV} (race G Guadalquivir Valley), что позволило отличить ее от других популяций расы G, описанных в Восточной Европе (Martín-Sanz et al., 2016). В недавних исследованиях также было показано, что традиционная номенклатура рас может приводить к путанице, поскольку одинаковыми обозначениями нередко описывают популяции с различным профилем вирулентности в разных географических регионах. Так, популяционный анализ заразики из Испании подтвердил существование двух генетически различающихся биотипов *O. citana* и показал, что наряду с межпопуляционной рекомбинацией возможны и иные механизмы повышения вирулентности, включая точечные мутации. На основании этих данных были предложены уточненные обозначения патотипов F_{CU}, F⁺_{CU} и G_{CU} (CU – провинция Куэнка, Испания), что подчеркивает необходимость более детальной характеристики расового состава паразита с учетом их географического происхождения и генетической структуры (Fernández-Melero et al., 2023). Дальнейшие молекулярно-генетические исследования подтвердили ранее выявленную дифференциацию популяций (Fernández-Melero et al., 2026). Вместе с тем современные исследования показывают, что эволюция *O. citana* может сопровождаться не только повышением вирулентности патотипов, но и формированием устойчивости к средствам химического контроля. Так, в недавнем исследовании в Греции были выявлены популяции заразики, выжившие после обработки гербицидом имазамокс в посевах гербицидоустойчивых гибридов подсолнечника. При определении расовой принадлежности с использованием линий-дифференциаторов и устойчивых гибридов было установлено, что исследованные популяции отличаются высокой вирулентностью и относятся к патотипам G и G⁺. Одновременно с высокой вирулентностью, у отдельных

растений этих популяций были обнаружены мутации в гене, кодирующем ацетолактатсинтазу (ALS), влияющие на чувствительность паразита к гербицидам группы имидазолинонов (Kaundun et al., 2024). Эти результаты свидетельствуют о появлении популяций заразихи, сочетающих высокую вирулентность и устойчивость к гербицидам, что может существенно осложнить контроль данного паразита в агроценозах подсолнечника. Отдельные опасения вызывает возможность быстрого распространения этих биотипов в другие регионы.

К середине XX века основные регионы возделывания подсолнечника – Россия, Украина, Казахстан, Молдова, Румыния, Болгария, Сербия и Турция были сильно заражены семенами заразихи, что сделало создание устойчивых сортов необходимым условием стабильного производства культуры (Antonova, 2014; Кауа, 2014). Позднее паразит распространился и в другие регионы мира: в Испании он был обнаружен в 1958 г., в Китае – в 1979 г., во Франции – в 2007 г., в Тунисе – в 2010 г., а в Марокко – в 2016 г. (Molinero-Ruiz, Domínguez, 2014; Ma & Jan, 2014; Jestin et al., 2014; Amri, 2012; Nabloussi et al., 2018).

В последние годы отмечается дальнейшее расширение ареала паразита и появление новых очагов его распространения. Так, в 2017 г. было впервые сообщено о распространении *O. citrana* в Португалии (González-Cantón et al., 2019), а в 2025 г. опубликован отчет о первом обнаружении паразита на территории Южной Америки (Barea et al., 2025), что является тревожным сигналом. Одновременно продолжают поступать сведения о широком распространении и высокой вирулентности биотипов разных популяций паразита как в традиционных зонах его развития, например, в Румынии и Молдове, так и в Китае (Rîșnoveanu et al., 2016; Duca et al., 2019, Cao et al., 2023; Zhao et al., 2025). Расширение географического ареала и появление новых очагов распространения заразихи связывают как с интенсификацией возделывания подсолнечника, в частности с импортом семян подсолнечника в другие страны и континенты, так и со способностью заразихи формировать новые более вирулентные расы (Calderón-González et al., 2024; Nabloussi et al., 2023; Fernández-Melero et al., 2026).

Широкое распространение *O. cuman* представляет серьезную угрозу для сельскохозяйственного производства прежде всего из-за высокой вредоносности этого паразита. Сильное поражение посевов заразой приводит к нарушениям водного режима и минерального питания растений подсолнечника, что значительно снижает урожайность. В условиях сильной концентрации семян заразы в почве потери урожая подсолнечника могут достигать 30–100 % (Alcántara et al., 2006; Duca, 2015). Однако, снижение урожайности зависит не только от зараженности почвы, но и от сочетания вирулентности биотипов внутри популяций заразы с устойчивостью возделываемых гибридов, а также других факторов, влияющих на прикрепление паразита к корням подсолнечника (Jestin et al., 2014; Molinero-Ruiz et al., 2015; Cvejić et al., 2020).

На территории Российской Федерации в настоящее время на большинстве полей подсолнечника доминирует раса G заразы (*Orobancha cuman* Wallr.), хотя на отдельных полях могут преобладать и менее вирулентные расы E и F (Антонова и др., 2020, 2022).

Таким образом, *O. cuman* является одним из наиболее значимых биотических факторов, ограничивающих производство подсолнечника, а большинстве регионов, где он возделывается. Высокая вредоносность паразита обусловлена чрезвычайно высоким коэффициентом размножения, что сказывается на скорости формирования более вирулентных рас, а также способностью к длительному сохранению жизнеспособных семян в почве. Расширение географического ареала и постоянное появление новых рас паразита приводят к регулярному преодолению устойчивости ранее созданных сортов и гибридов подсолнечника, что делает актуальным постоянный поиск эффективных средств борьбы с заразой.

1.3 Стратегии контроля заразы в агроценозах подсолнечника

Специфика паразитизма *O. cuman* существенно осложняет контроль ее вредоносности в посевах подсолнечника. Заражение растения-хозяина происходит на ранних этапах его развития, в то время как основная часть жизненного цикла

паразита протекает под поверхностью почвы. На протяжении этого периода зарази́ха уже использует питательные вещества растения-хозяина, оставаясь при этом незаметной для визуального обнаружения (Parker, 2009; Molinero-Ruiz et al., 2015). По этой причине появление надземных побегов паразита обычно обнаруживается уже после того, как значительная часть ущерба культуре была нанесена (Delavault, 2015). В связи с этим контроль зарази́хи требует комплекса взаимодополняющих мероприятий. Современные системы борьбы включают агротехнические приемы, биологические и химические методы, а также селекционно-генетические подходы. Их совместное использование позволяет контролировать накопление семян зарази́хи в почве, снижать степень заражения посевов и уменьшать ущерб на различных этапах (Molinero-Ruiz et al., 2015; Fernández-Melero et al., 2026).

1.3.1 Агротехнические приемы ограничения вредоносности зарази́хи

Агротехнические методы являются одними из первых и широко применяемых способов защиты сельскохозяйственных культур от вредных организмов. Они основаны на использовании различных элементов технологии возделывания культур для создания неблагоприятных условий для патогенов, вредителей и паразитических растений (Juroszek, Tiedemann, 2011). К числу таких мероприятий относят севооборот, обработку почвы, регулирование способов и сроков посева и другие агроприемы (Ponomarev et al., 2025). В частности, применение научно-обоснованных севооборотов способно снижать распространение многих заболеваний растений, поскольку разрывает циклы развития патогенов и уменьшает их численность в почве (Peters et al., 2003; Nabloussi et al., 2018; Panth et al., 2020; Shi, Zhao, 2020). Экспериментальные исследования показали, что увеличение доли подсолнечника в структуре посевных площадей в севообороте существенно влияет на численность сорной растительности, включая паразитическое растение *O. cyma*, тогда как оптимальное чередование культур позволяет снижать ее распространение (Shevchenko et al., 2024). Кроме того, сокращение продолжительности севооборота

и частое возвращение подсолнечника на одно и то же поле рассматривается как один из факторов ускоренной эволюции и распространения новых биотипов (Antonova, 2023). В связи с этим соблюдение научно обоснованных севооборотов с длительным периодом возврата подсолнечника на прежнее поле рассматривается как важный элемент интегрированной системы контроля заразики (Molinero-Ruiz et al., 2015).

К числу агротехнических также относятся приемы, направленные на уменьшение жизнеспособности семян паразита или нарушение условий его прорастания. Одним из таких является соляризация почвы – метод термического воздействия, основанный на использовании солнечной энергии для нагрева верхнего слоя почвы вплоть до 55 °C, что оказывает губительное воздействие на семена заразики (Mauromicale et al., 2005). Однако применение данного приема неприменимо для производственных посевов.

Негативное влияние на развитие паразита может оказывать и изменение уровня минерального питания растений. Повышенное содержание азота и фосфора способно изменять развитие корневой системы растения-хозяина и снижать вероятность распознавания паразитом корней подсолнечника. Кроме того, отмечается ингибирующее воздействие повышенной концентрации питательных веществ на прорастание семян заразики, что в конечном итоге приводит к уменьшению степени заражения (Fernández-Aparicio et al., 2016).

Еще одним агротехническим приемом является использование сидеральных культур. Внесение зеленой массы представителей семейства *Brassicaceae*, может оказывать подавляющее действие на семена паразитических растений. Показано, что использование сидератов, таких как горчица и рапс, способствует снижению зараженности почвы *O. citana*, что связывают с выделением биологически активных соединений и изменением микробиологических процессов в почве (Strelnikov et al., 2020).

Важное место среди агроприемов, способных контролировать вредоносность заразики имеет применение культур-провокаторов. Данный прием основан на том, что некоторые сельскохозяйственные растения обладают способностью

индуцировать прорастание семян *O. citana*, но не являются подходящими хозяевами для дальнейшего развития паразита. В результате нескольких циклов выращивания таких культур происходит постепенное снижение запаса семян в почве. К сельскохозяйственным растениям, способным стимулировать прорастание семян паразита, относят хлопчатник, овес, пшеницу, сорго, просо, нут, сою, кукурузу и ряд других растений (Fernández-Aparicio et al., 2009; Zhang et al., 2013; Ye et al., 2020).

Таким образом, агротехнические методы не обеспечивают полного контроля заразики, однако позволяют существенно снижать ее распространение и общую зараженность почвы. Наибольшая эффективность агротехнических методов может быть достигнута в рамках комплексной системы контроля паразита.

1.3.2 Биологические подходы к снижению вредоносности паразита

К числу перспективных направлений снижения вредоносности заразики относятся биологические методы, основанные на использовании микроорганизмов и естественных врагов паразита. Сообщалось, что ряд микроорганизмов способен снижать степень паразитирования *O. citana*, воздействуя на различные стадии его жизненного цикла. Так, в качестве биогербицида применяли гриб *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras*, что приводило к уменьшению биомассы заразики (Shabana et al., 2002). Отмечается, что определенный эффект могут обеспечивать и симбиотические микроорганизмы ризосферы (Xi et al. 2022). Показано, что арбускулярные микоризные грибы способны снижать поражение подсолнечника заразой за счет уменьшения количества стимуляторов прорастания, выделяемых корнями растения-хозяина, что подавляет прорастание семян паразита (Louarn et al., 2012). Аналогичный эффект фиксировали при использовании бактерии *Streptomyces enissocaesilis* (ex Krasil'nikov 1970) Sveshnikova 1986 (Chen et al., 2016). Кроме использования микроорганизмов, существуют и агротехнические приемы, способные опосредованно подавлять развитие паразита через изменение микробного сообщества ризосферы растений (Xu et al., 2024).

Помимо микроорганизмов, рассматривается использование специализированных фитофагов. Одним из естественных врагов заразихи является *Phytomyza orobanchia* Kaltenbach, личинки которой питаются тканями и семенами заразихи. Их развитие в соцветиях паразита приводит к снижению семенной продуктивности, а также к ослаблению или гибели побегов заразихи (Klein, Kroschel, 2002).

В целом биологические методы обладают, в первую очередь, экологическими преимуществами и могут снижать как накопление семян паразита в почве, так и подавлять развитие патогена. Однако эффективность таких подходов часто зависит от почвенно-климатических условий и стабильности популяций используемых организмов, поэтому на практике они рассматриваются главным образом как элемент интегрированных систем контроля заразихи.

1.3.3 Химические методы борьбы с заразихой

К химическим методам контроля заразихи относятся как применение гербицидов, так и использование соединений, стимулирующих прорастание семян паразита в отсутствие растения-хозяина. Одним из перспективных подходов является химический аналог культур-провокаторов – внесение в почву синтетических стриголактонов, таких как GR24 и Nijmegen-1 (Plakhine et al., 2009). Аналогичное действие оказывают сесквитерпеноиды, выделенные из растения *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter (Masi et al., 2019), а также ряд других соединений, включая аналоги стриголактонов и биологически активные молекулы, способные запускать прорастание семян паразита (Ueno et al., 2014; Lumbroso et al., 2016).

В производстве широкое применение получили гербициды, способные подавлять развитие паразита на ранних стадиях развития. Наиболее часто используются препараты из группы ингибиторов ацетолактатсинтазы (ALS), прежде всего имидазолинонов, которые применяются как в довсходовых, так и в послевсходовых обработках (Brown, 1990; Garcia-Torres et al., 1995; Aly et al., 2001). Эффективность такой стратегии существенно повысилась после внедрения гибридов подсолнечника генетически устойчивых к данным гербицидам (Al-Khatib

et al., 1998; Alonso et al., 1998). Вокруг этих генетических источников были созданы производственные технологии возделывания подсолнечника, такие как Clearfield, Clearfield Plus и ExpressSun, основанные на использовании гибридов, устойчивых к ингибиторам ацетолактатсинтазы (Sala et al., 2012; Gil, Nestares, 2019). Применение данных систем значительно повысило эффективность химического контроля сорной растительности и заразики и в настоящее время широко используется в промышленном производстве подсолнечника во многих странах мира (Pfenning et al., 2008; Elezovic et al., 2012; Jursík et al., 2017; Brankov et al., 2024). Однако длительное и интенсивное применение гербицидов создает эволюционное давление на популяции паразита и приводит к появлению форм, устойчивых к химическим средствам контроля, что было описано в недавнем исследовании (Kaundun et al., 2024).

Наряду с прямым воздействием на паразита изучается возможность химической индукции защитной реакции растения-хозяина. Показано, что обработка подсолнечника салициловой кислотой усиливает гиперчувствительную реакцию при заражении паразитом (Yang et al., 2016), а обработка семян 5-аминолевулиновой кислотой способствует снижению уровня активных форм кислорода и регуляции экспрессии генов стрессового ответа, что может повышать устойчивость растений к паразиту (Li et al., 2019).

Таким образом, современные химические технологии играют одну из ключевых ролей в контроле вредоносности заразики, однако, их применение не обеспечивает полного и долговременного решения проблемы заразики. Недавнее обнаружение устойчивых к гербицидам растений паразита говорит об уязвимости таких систем. При этом сами гербицидные технологии не являются самостоятельным инструментом, поскольку их применение возможно лишь в комплексе с устойчивыми к гербицидам гибридами подсолнечника. Следовательно, использование таких стратегий контроля в производстве напрямую зависит от результатов селекционной работы. В связи с этим селекционно-генетическое улучшение подсолнечника является ключевым элементом системы

контроля заразики и должно рассматриваться как одно из основных направлений борьбы с паразитом.

1.3.4 Селекция подсолнечника на устойчивость к заразики

Использование устойчивых сортов и гибридов подсолнечника считается одним из наиболее эффективных и экологически безопасных способов ограничения вредоносности заразики (Pérez-Vich et al., 2013). В сочетании с агротехническими и химическими методами генетическая устойчивость позволяет существенно снижать степень поражения растений подсолнечника и посевов в целом (Yoder, Scholes, 2010; Shi et al., 2020; Fernández-Aparicio et al., 2021).

Селекционная работа по созданию устойчивых к заразики форм подсолнечника имеет длительную историю. Уже в первые десятилетия промышленного возделывания культуры были получены сорта, проявлявшие устойчивость к паразиту (Пустовойт, 1926; Жданов, 1967). Однако дальнейшее распространение заразики сопровождалось появлением более вирулентных популяций, способных поражать ранее устойчивые формы, что было отмечено в различных регионах возделывания подсолнечника (Vrânceanu et al., 1980; Antonova, 2014). В результате устойчивость, достигнутая благодаря селекции, носила временный характер и требовала постоянного поиска новых источников генетической устойчивости. В связи с этим уже в середине XX века в селекционных программах начали активно использовать межвидовую гибридизацию с дикорастущими видами рода *Helianthus* для расширения генетического разнообразия культуры и поиска новых источников устойчивости. В работах, проводившихся Г. В. Пустовойт, во ВНИИМК были получены межвидовые гибриды культурного подсолнечника с дикорастущим видом *Helianthus tuberosus* L, который рассматривался как источник генов устойчивости к болезням и заразики (Пустовойт, 1964; Пустовойт, 1966; Пустовойт, 1974). Благодаря этому подходу был достигнут значительный прогресс в создании устойчивых к заразики форм подсолнечника (Seiler et al., 2017).

Однако постоянное появление новых, более вирулентных рас паразита нередко приводило к существенному снижению эффективности ранее выявленных источников устойчивости. Так, при оценке коллекции подсолнечника в Турции устойчивость к расе Е была выявлена лишь у 22 из 903 образцов (Gulya et al., 1994), а при анализе 429 образцов в Испании устойчивыми оказались только 8 генотипов (Domínguez, 1996). В связи с этим селекционные программы требуют постоянного поиска новых источников устойчивости и их внедрения в селекционный процесс (Антонова и др., 2016; Terzić et al., 2020; Chabaud et al., 2022; Che et al., 2025). Однако дикорастущие виды рода *Helianthus* включают как диплоидные, так и тетраплоидные и гексаплоидные виды, при этом большая часть источников устойчивости к заразице была обнаружена именно у многолетних видов, отличающихся по уровню пloidности от культурного подсолнечника, что существенно осложнило интрогрессию генов устойчивости (Fernández-Martínez et al., 2015). В связи с этим при получении межвидовых гибридов нередко требуется применение методов культуры зародышей на ранних этапах селекционного процесса, а на последующих этапах – систематическое определение устойчивости растений подсолнечника к заразице (Velasco et al., 2012). При таком подходе селекционная работа направлена не только на интрогрессию генов устойчивости, но и на восстановление комплекса хозяйственно ценных признаков культурного подсолнечника посредством последовательных обратных скрещиваний (Pérez-Vich et al., 2013).

Несмотря на сложности, эффективность данного подхода подтверждается созданием ряда селекционных линий с использованием дикорастущих видов в качестве доноров устойчивости. Так, путем интрогрессии в начале 2000-х годов были созданы коммерческие гибриды подсолнечника, устойчивые к высоковирулентным расам заразицы (Duriez et al., 2019). Благодаря скрещиванию культурного подсолнечника с *Helianthus maximiliani*, *H. grosseserratus* и *H. divaricatus* были получены четыре популяции подсолнечника (BR1–BR4), проявляющие устойчивость к расе F заразицы (Jan et al., 2002). Устойчивая линия LR1 была создана в результате межвидовой гибридизации *H. annuus* с *H. debilis*

subsp. *debilis* (Labrousse et al., 2004). При использовании межвидовой гибридизации с последующими обратными скрещиваниями и интрогрессией генетического материала многолетних видов *H. tuberosus* и *H. divaricatus* были получены серии инбредных линий подсолнечника, проявляющих устойчивость к зарази́хе. В частности, описаны линии серии LIV (LIV-1–LIV-20), созданные на основе гибридизации с *H. tuberosus*, а также линии серии AB-VL (AB-VL-1–AB-VL-20), происходящие из популяции, отобранной после гибридизации с *H. divaricatus* (Cvejić et al., 2012, Imerovski, 2019). В качестве источника устойчивости к более вирулентным популяциям паразита также использовались образцы *H. debilis* subsp. *tardiflorus*, на основе которых была создана линия подсолнечника, устойчивая к расе G_{GV} зарази́хи (Velasco et al., 2012). Аналогичным образом устойчивость к новым высоковирулентным патотипам паразита была передана из *H. anomalus* (Fernández-Melero et al., 2024).

Помимо межвидовой гибридизации с дикорастущими видами рода *Helianthus*, селекционная работа ведется также с линиями и гибридами, несущими интрогрессированные источники устойчивости. В ряде исследований устойчивость к зарази́хе оценивали у используемых в производстве коммерческих гибридов и селекционных линий, что позволило выявить генотипы, сохраняющие устойчивость к популяциям паразита из других регионов (Kaya et al., 2009; Hladni et al., 2012). К примеру, устойчивые инбредные линии получали непосредственно из коммерческих гибридов подсолнечника путем самоопыления и последующего отбора растений, сохраняющих проявление признака (Гучетль и др., 2018). Такой подход позволяет продолжать селекционную работу с уже адаптированным селекционным материалом и создавать новые линии-доноры устойчивости в комбинации с другими ценными признаками.

Таким образом, селекция подсолнечника на устойчивость к *O. citana* является одним из ключевых направлений контроля и ограничения вредоносности паразита. Интрогрессия генетического материала дикорастущих видов рода *Helianthus* в геном культурного подсолнечника позволила расширить генетическое разнообразие и внедрить новые источники устойчивости к различным расам

зарази. Однако высокая генетическая изменчивость популяций паразита и появление более вирулентных рас приводят к преодолению используемых генов устойчивости. В связи с этим для повышения эффективности селекционного процесса необходимо понимание генетической природы и моделей наследования признака, включая идентификацию генов и их расоспецифичность. В связи с этим, развитие селекции подсолнечника на устойчивость к заразе требует детального изучения генетических механизмов признака.

1.4 Генетический контроль устойчивости подсолнечника к заразе и создание устойчивых форм

Генетическая устойчивость подсолнечника к *O. citana* в большинстве случаев имеет моногенное наследование и расовую специфичность, что соответствует классической модели взаимодействия «ген-на-ген», описанной Н. Flor (Flor, 1971). Согласно этой модели, устойчивость растения определяется наличием у хозяина гена устойчивости (*R*-гена), который распознает соответствующий ему ген авирулентности (*Avr*-ген) паразита и запускает защитную реакцию. Подобный тип устойчивости относится к вертикальной (качественной) и обычно контролируется одним основным геном с сильным эффектом. В ряде исследований выявлена и количественная (горизонтальная) устойчивость, которая контролируется несколькими локусами и, в большинстве случаев, влияющая на степень поражения растения паразитом (Van der Plank, 1966; Pérez-Vich et al., 2004; Pérez-Vich et al., 2013; Лебедева и др., 2023).

Первые гены устойчивости подсолнечника к заразе были описаны Vgânceanu с соавторами (1980). Данные гены были названы *Or₁–Or₅* в зависимости от расы, устойчивости к которой они контролируют – расы от А (*Or₁*) до Е (*Or₅*), соответственно. Обнаружение этих генов стало основой для создания устойчивых сортов и гибридов подсолнечника и определило дальнейшее развитие селекции культуры на устойчивость к заразе. Одним из наиболее изученных генов данной группы является *Or₅*, контролирующей устойчивость к расе Е. Ген *Or₅* является первым картированным геном устойчивости подсолнечника к заразе и

локализован в теломерном регионе 3-й группы сцепления (Lu et al., 2000; Tang et al., 2003; Pérez-Vich et al., 2004). Также описан доминантный ген авирулентности *O. citrana* *avrOr₅*, взаимодействующий с *Or₅* по модели «ген-на-ген» (Rodríguez-Ojeda et al., 2013). При этом было показано, что устойчивость к расе Е не объясняется только действием *Or₅*, поскольку дополнительно были выявлены QTL, влияющие на степень поражения (Pérez-Vich et al., 2004). Это свидетельствует о сочетании у подсолнечника качественной расоспецифичной устойчивости и количественной компоненты, определяющей степень поражения. Выявленная ассоциация SSR-маркеров 3-й группы сцепления с генами *Or₂* и *Or₄* дополнительно подтверждает, что данный регион генома является одним из ключевых в контроле устойчивости к *O. citrana* (Imerovski et al., 2013). При этом, как отмечалось ранее, в данном регионе хромосомы 3 локализовано по меньшей мере несколько генов устойчивости к заразахе, включая *Or₅* (Imerovski et al., 2019).

Последующие геномные исследования показали, что локус *HaOr5* (*Or₅*) расположен в верхнем плече хромосомы 3 в кластере потенциальных генов устойчивости и связан со сложными структурными перестройками генома. В данном участке выявлена крупная вставка, содержащая несколько генов, кодирующих белки семейства F-box с LRR-повторами, а также ген, кодирующий белок типа TIR-NLR, который рассматривается как наиболее вероятный кандидат на роль гена *HaOr5* (Pubert et al., 2024). Для картирования *HaOr5* использовали линию LC1093, ранее описанную как несущую ген *Or₆*, обеспечивающий устойчивость к румынской популяции *O. citrana*, классифицированной как раса F (Păcureanu-Joita et al., 2004). При этом авторы исследования указывают (без ссылок на литературные данные), что согласно современному пересмотру классификации рас данная популяция, ранее идентифицированная как раса F, отнесена к расе Е. Поскольку основной доминантный ген устойчивости, выявленный у LC1093, был картирован в том же регионе, что и *HaOr5*, авторы предположили, что линии LC1093 и PHD, вероятно, несут один и тот же ген устойчивости (Tang et al., 2003; Pubert et al., 2024). Это в очередной раз указывает на то, что в литературе существуют расхождения в обозначении рас паразита и генов устойчивости, что

связано как с недостаточной согласованностью систем дифференциации рас *O. citana*, так и со сложным характером взаимодействия паразита и растения-хозяина.

Еще одним геном устойчивости, локализованным в данном регионе генома, является *or_{av-vl-8}*, выявленный в линии подсолнечника AV-VL-8 (Imerovski et al., 2016). В отличие от большинства ранее описанных генов устойчивости к заразице, данный ген проявляет рецессивный характер наследования и обеспечивает устойчивость к расам паразита более вирулентным, чем раса F. Картирование показало, что локус *or_{av-vl-8}* также расположен на хромосоме 3, однако в области, не перекрывающейся с локусом *Or₅*. Это подтверждает, что хромосома 3 содержит несколько независимых локусов, контролирующих признак устойчивости к заразице.

Последующие исследования в очередной раз показали, что устойчивость к более вирулентным расам паразита может контролироваться не только отдельными генами с крупным эффектом, но и несколькими генами или локусами количественных признаков (QTL). Так, на линии подсолнечника P-96, устойчивой к расе F заразицы, показано, что данный признак контролируется двумя рецессивными генами, с эпистатическим эффектом (Akhtouch et al., 2002). В дальнейшем в этой и других линиях были выявлены QTL, ассоциированные с признаком и локализованные на нескольких группах сцепления генома подсолнечника включая LG 1, 4, 5, 13 и 16 (Pérez-Vich et al., 2004), а также LG 2, 3, 4, 5 и 6 (Akhtouch et al., 2016).

Наряду с генами *Or₁–Or₅*, в последние годы были описаны и другие гены устойчивости подсолнечника к *O. citana*, что существенно расширило представления о генетическом контроле данного признака. Одним из таких генов является *HaOr7*, обеспечивающий устойчивость к расе F_{GV} паразита. Данный ген был клонирован и локализован на хромосоме 7 подсолнечника (Duriez et al., 2019). Ген *HaOr7* кодирует рецептороподобную киназу с лейцин-богатыми повторами (LRR-RLK), участвующую в распознавании факторов вирулентности паразита и запуске защитного сигнального каскада в растении-хозяине. Предполагается, что

кодируемый геном *HaOr7* белок распознает соответствующий авирулентный фактор *O. citana* через LRR-домен, что приводит к активации защитной реакции и предотвращает формирование сосудистых соединений паразита с корневой системой подсолнечника.

Значительный интерес представляет группа генов устойчивости, локализованных на хромосоме 4 подсолнечника. В этом регионе генома выявлен кластер генов, кодирующих рецептороподобные белки (RLP) и рецептороподобные киназы (RLK), которые рассматриваются как кандидаты генов устойчивости к паразитическим растениям (Fernández-Aparicio et al., 2022; Лебедева и др., 2023).

Одним из генов, локализованных в данном регионе, является *Or_{SH}*, контролирующий постгаусториальную устойчивость к заразице. Этот ген был картирован в группе сцепления 4 генетической карты подсолнечника (Hassan et al., 2008). Устойчивость, контролируемая *Or_{SH}*, проявляется на поздних этапах взаимодействия паразита с растением-хозяином. После формирования сосудистых соединений развитие паразита существенно замедляется, а побеги заразицы остаются недоразвитыми и часто погибают на поздних стадиях развития. Данный механизм связан с накоплением фенольных соединений в растения-хозяина, а также тканях гаустория и клубенька заразицы, которые оказывают токсическое воздействие на паразита (Martín-Sanz et al., 2020).

Другим геном, расположенным в том же хромосомном регионе, является *Or_{Deb2}*. Этот ген был интрогрессирован в культурный подсолнечник из дикого вида *H. debilis* subsp. *tardiflorus* (Velasco et al., 2012). Ген *Or_{Deb2}* контролирует устойчивость к нескольким высоковирулентным расам *O. citana*, включая расы E, F и G, в частности G_{GV} (Martín-Sanz et al., 2016; Fernández-Aparicio et al., 2022). Ген был картирован в верхней части хромосомы 4 в интервале примерно 1,38 Мб генома подсолнечника. Анализ данного региона выявил несколько генов-кандидатов, кодирующих рецептор-подобные белки с доменами LRR и рецепторные киназы, а также белки теплового шока. Показано, что устойчивость к заразице, контролируемая *Or_{Deb2}*, связана с нарушением проникновения паразита в

ткани корня растения-хозяина, аналогично механизму устойчивости, контролируемому геном *HaOr7*. Проникновение проростка заразики ограничивалось тканями коры корня подсолнечника, что препятствовало образованию гаустории и сосудистого контакта (Fernández-Aparicio et al., 2022; Лебедева и др., 2023).

Недавно был описан новый ген устойчивости *Or_{Anom1}*, интрогрессированный в культурный подсолнечник из дикого вида *H. anomalus* (Fernández-Melero et al., 2024). Этот ген обеспечивает устойчивость к расе G паразита и наследуется как один доминантный локус. Ген *Or_{Anom1}* был картирован на хромосоме 4 в интервале около 1,32 Мб (Fernández-Melero et al., 2024). Фитопатологические исследования показали, что устойчивость, обусловленная *Or_{Anom1}*, реализуется на поздних этапах взаимодействия паразита с растением-хозяином. После формирования сосудистых соединений рост паразита подавляется, что сопровождается накоплением фенольных соединений и некрозом паразитических структур. Предполагается, что устойчивость, контролируемая данным локусом, реализуется на ранних этапах паразитирования и связана с распознаванием эффекторных молекул паразита рецепторными белками растения, что приводит к активации защитных реакций и подавлению формирования и функционирования гаустории (Fernández-Melero et al., 2024).

Несмотря на локализацию *Or_{SII}*, *Or_{Deb2}* и *Or_{Anom1}* в одном регионе хромосомы 4, анализ опубликованных данных свидетельствует о том, что они, вероятно, представляют собой разные гены устойчивости. В частности, аллельные скрещивания между линиями, несущими *Or_{Anom1}* и *Or_{Deb2}*, не выявили восприимчивых растений среди 3018 растений F₂, что свидетельствует о тесной генетической связи этих генов и их локализации в одном хромосомном регионе, однако не позволяет однозначно определить, представляют ли они разные гены или разные аллели одного локуса (Fernández-Melero et al., 2024). Несмотря на это, происхождение этих генов различается: *Or_{Deb2}* интрогрессирован из дикого вида *H. debilis* (Velasco et al., 2012), *Or_{Anom1}* — из *H. anomalus* (Fernández-Melero et al., 2024), тогда как о происхождении *Or_{SII}* известно, что он был обнаружен в селекционном

материале культурного подсолнечника (Hassan et al., 2008; Martín-Sanz et al., 2020). Вместе с этим, различия в механизмах проявления устойчивости также указывают на их возможную генетическую независимость: устойчивость, обусловленная *Or_{SH}*, проявляется на поздних стадиях развития паразита и сопровождается подавлением роста заразики после формирования клубеньков (Martín-Sanz et al., 2020), тогда как устойчивость, связанная с *Or_{Anom1}*, проявляется на более ранних этапах взаимодействия и сопровождается некрозом паразитических структур (Fernández-Melero et al., 2024). Исходя из этого, данный регион хромосомы 4 содержит несколько тесно сцепленных генов устойчивости к *O. citrana*, аллельные отношения между которыми до конца не установлены. Необходимы дополнительные генетические исследования для лучшего картирования, определения и клонирования генов-кандидатов и получения нуклеотидных последовательностей данных генов.

Таким образом, устойчивость подсолнечника к *O. citrana* в большинстве случаев укладывается в модель «ген-на-ген». В настоящее время идентифицирован ряд генов, локализованных в различных участках генома подсолнечника и имеющих разное происхождение, включая дикорастущие виды рода *Helianthus*. Использование этих генов в селекции позволило создать устойчивые линии и гибриды подсолнечника, широко применяемые в производстве. Однако широкое использование небольшого числа генов устойчивости создает повышенное давление естественного отбора в популяциях паразита, что способствует появлению и закреплению более вирулентных биотипов, способных преодолевать действие этих генов, что приводит к формированию новых рас *O. citrana*. В связи с этим поиск и изучение новых источников устойчивости остаются важным направлением селекционных и генетических исследований. В частности, в последние годы описаны гены *Or_{Deb2}* и *Or_{Anom1}*, интрогрессированные из дикорастущих видов рода *Helianthus*, потенциал которых в производстве подсолнечника еще не ясен и требует дальнейшего изучения.

1.5 Маркер-вспомогательная селекция подсолнечника как инструмент повышения точности и эффективности отбора

Прогресс в молекулярной генетике и геномных технологиях существенно расширил возможности селекции сельскохозяйственных культур. Одним из наиболее широко используемых подходов является маркер-вспомогательная селекция (marker-assisted selection, MAS), основанная на использовании ДНК-маркеров, которые являются либо внутригенными, либо сцепленными с генами или локусами количественных признаков (Kucherenko et al., 2022; Kumar et al., 2024).

Впервые концепция использования молекулярных маркеров в селекции и термин marker-assisted selection были сформулированы в 1983 году (Beckmann, Soller, 1983). Первое практическое использование ДНК-маркеров в селекции растений было посвящено отбору генотипов сои, устойчивых к соевой цистообразующей нематодe (*Heterodera glycines* Ichinohe), где молекулярные маркеры были использованы для идентификации аллелей устойчивости (Concibido et al., 1996).

Применение ДНК-маркеров в селекции растений обладает рядом преимуществ по сравнению с традиционным отбором по фенотипу. Выделение и очистка нуклеиновых кислот для анализа возможно из всех тканей растения, включая листья, корни и семена (Hasan et al., 2021; Kumar et al., 2024). В отличие от фенотипической оценки, результаты анализа ДНК не зависят от факторов внешней среды, которые могут существенно влиять на проявление многих признаков (Bhuvaneswari et al. 2020; Tiwari et al., 2023; Tyagi et al., 2024). Дополнительным преимуществом является высокая скорость и пропускная способность современных методов генотипирования, позволяющих одновременно анализировать большое число образцов (Vieira et al., 2025). Кроме того, ДНК-маркеры дают возможность проводить одновременный контроль нескольких генов или признаков в одном и том же растении, что особенно важно при работе с индивидуальными растениями и при селекции на устойчивость к патогенам (Jiang, 2013; Cvejić et al., 2020; Varshney et al., 2021). Благодаря этим преимуществам

данный подход широко используется и в селекции подсолнечника (Dimitrijevic, Horn, 2018; Rauf S et al., 2020).

ДНК-маркеры можно условно разделить на две группы по отношению к селекционно-ценным признакам. В первую группу входят маркеры, ассоциированные с генами, контролирующими признак. По локализации их можно разделить на внутригенные маркеры, которые могут выявлять причинные мутации (функциональные маркеры) или просто локализоваться внутри гена, благодаря чему быть тесно сцепленными с признаком, а также маркеры, располагающиеся в достаточной близости к таким генам или локусам количественных признаков (Collard, Mackill, 2008; Reddy et al., 2021; Amiteye, 2021). Маркеры из второй группы не имеют установленной связи с селекционно-ценными признаками (так называемые «нейтральные маркеры») и применяются преимущественно для генотипирования, анализа генетического разнообразия, определения генетической чистоты партий семян и паспортизации (Iqbal et al., 2010; Mandel et al., 2011; Zeinalzadeh-Tabrizi et al., 2018; Гучетль и др. 2023, 2024; Анискина и др., 2025). Наибольшую значимость для селекционных программ представляют маркеры, ассоциированные с селекционно-ценными признаками. Ярким примером в селекции подсолнечника является отбор на устойчивость к гербицидам. Были разработаны маркеры мутаций в гене *AHASL1*, контролирующие устойчивость к имидазолинонам и сульфонилмочевинам, что позволило проводить маркер-вспомогательный отбор гомозиготных устойчивых линий на раннем этапе и без обработки гербицидами (Kolkman et al., 2004; Bulos et al., 2013a). Другим актуальным направлением применения ДНК-маркеров является селекция на измененный жирнокислотный профиль масла семян. Выявлено, что высокий уровень олеиновой кислоты обусловлен мутацией в гене *FAD2-1* и разработаны ДНК-маркеры, что позволило на этапе проростков проводить отбраковку растений, не несущих аллель мутации высокоолеиновости (Lacombe, Bervillé, 2001; Schuppert et al., 2006; Dimitrijević et al., 2017). Дальнейшее генотипирование большой коллекции подсолнечника также позволило выявить дополнительные генетические детерминанты жирнокислотного состава масла и подтвердить ключевую роль

локусов десатуразы жирных кислот в формировании этого признака, что в перспективе расширяет возможности для маркер-вспомогательного отбора (Chernova et al., 2021; Gubaev et al., 2023). Важным инструментом для селекции гибридов подсолнечника является использование ДНК-маркеров гена, ассоциированных с геном восстановления фертильности *Rf1*. Разработка и применение маркер-вспомогательного отбора по данному гену позволило избежать проведения тест-скрещиваний с последующей оценкой фертильности гибридного потомства (Horn et al., 2019; Goryunov et al., 2019; Radanović et al., 2022; Анисимова и др., 2023). Поскольку ген восстановления фертильности *Rf1* обеспечивает восстановление фертильности при цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС), для повышения эффективности создания родительских линий были также разработаны и применяются ДНК-маркеры для определения наличия/отсутствия ЦМС PET1 (Laver et al., 1991; Schnabel et al., 2008; Makarenko et al., 2018).

Маркер-вспомогательный отбор является особенно актуальным в селекции подсолнечника на устойчивость к биотическим стрессам. Множество работ посвящено поиску и разработке маркеров, ассоциированных с генами устойчивости к патогенам. Так, для признака устойчивости к ржавчине были разработаны и валидированы SSR- и SNP-маркеры, ассоциированные с генами устойчивости: *R₁*, *R₂*, *R₄*, *R_{4u}*, *R₅*, *R₁₁*, *R₁₂*, *R_{13a}* и *R_{13b}*, *R_{HAR6}* и *R₁₅* (Qi et al., 2011; Qi et al., 2012; Gong et al., 2013; Bulos et al., 2013a; Talukder et al., 2014; Ma et al., 2018). Применение разработанных маркеров позволило провести пирамидирование генов устойчивости к ржавчине, другими словами, создать линии, сочетающие сразу несколько генов (Ma et al., 2016; Qi, Ma, 2019a). Аналогичные исследования проведены для отбора по признаку устойчивости к ложной мучнистой росе. Несмотря на то, что у подсолнечника описано большое (более 36) число генов устойчивости, называемых *Pl*, валидированные ДНК-маркеры разработаны лишь для части из них: *Pl₁*, *Pl₂*, *Pl₅*, *Pl₈*, *Pl₁₈*, *Pl₁₉*, *Pl₂₀*, *Pl₃₃*, *Pl₃₆* и *Pl_{Arg}* (Liu et al., 2012; Qi et al., 2015; Zhang et al., 2017; Ma et al., 2017; Qi et al., 2019b). Посредством маркер-вспомогательного отбора был проведен отбор растений на ранних этапах вегетации

и созданы устойчивые линии HA-DM5 и HA-DM6, сочетающие несколько генов устойчивости (Qi et al., 2017; Qi et al., 2020).

Особое значение для производства подсолнечника во многих регионах мира играет устойчивость к заразихе. Однако, в отличие от ржавчины и ложной мучнистой росы, генов устойчивости к заразихе в литературе описано значительно меньше. (Cvejić et al., 2020; Fernández-Aparicio et al., 2022; Calderón-González et al., 2023). Первым геном, для которого были разработаны ДНК-маркеры был ген *Or₅*, контролирующий устойчивость к расе E. Опубликовано пять SCAR-маркеров, рекомендованных к применению в селекции: RTS05, RTS28, RTS40, RTS29 и RTS41 (Lu et al., 2000). Позднее было показано сцепленное наследование гена *Or₅* с SSR-маркерами CRT392, CRT314, ORS1036 и ORS1040, что позволило локализовать данный ген в теломерном участке хромосомы 3, в непосредственной близости к локусу ORS1036 (Tang et al., 2003). Для более ранних генов устойчивости, *Or₂*, *Or₄* и *Or₆*, были выявлены ассоциации с SSR-маркерами из 3-й хромосомы: для *Or₂* с ORS1114, тогда как *Or₄* показал сцепленное наследование с локусами ORS1036 и ORS1114, а ген *Or₆* – с локусами ORS665 и ORS1114 (Imerovski et al., 2013). Также был описан ген *or_{ab-vl-8}*, контролирующий устойчивость к расам с вирулентностью выше, чем раса F. В результате картирования данного гена было установлено сцепление наследование (1,5 cM) с микросателлитным локусом ORS683, локализованным в хромосоме 3 (Imerovski et al., 2016). Наряду с основными генами с сильным эффектом, были описаны и локусы количественных признаков (QTL), ассоциированные с устойчивостью подсолнечника к заразихе. Pérez-Vich et al. (2004) картировали QTL устойчивости к расам E и F, а Louarn et al. (2016) определили 17 QTL, контролирующих разные этапы взаимодействия *O. citrana* и подсолнечника. Однако, в результате этих работ не были разработаны ДНК-маркеры для отбора устойчивых растений.

Исследования, опубликованные в течении последних пяти лет, направлены преимущественно на картирование новых и ранее описанных генов устойчивости. Так, для локуса *Or_{SH}*, контролирующего постгаусториальную устойчивость к расам F и G заразихи, ранее были запатентованы ДНК-маркеры локализованные в

хромосоме 4 (Hassan et al., 2008). Позднее данный ген был повторно картирован в верхней части хромосомы 4 с использованием панели SNP-маркеров, где ближайшим маркером был показан M-4_30.40, однако нуклеотидные последовательности данного и других маркеров не представлены (Martín-Sanz et al., 2020). В работе Duriez et al. (2019) ген *HaOr7* был локализован на седьмой хромосоме, клонирован и секвенирован, однако в рамках данной работы аллель-специфичные маркеры для идентификации аллелей гена также разработаны не были. Локализация гена *Or_{Deb2}*, контролирующего устойчивость к расе G_{GV}, была первоначально установлена между SNP-маркерами DHAI000240 и DHAI007796 из хромосомы 4, а также запатентован набор KASP-маркеров, внутри данного интервала, предназначенных для маркер-вспомогательного отбора (Gao et al., 2019). Позднее локализация *Or_{Deb2}* была подтверждена и уточнена с помощью SNP-маркеров AX-105938724 и AX-105525205 (Fernández-Aparicio et al., 2022). Однако в рамках данной работы не были разработаны и валидированы ДНК-маркеры, предназначенные для маркер-вспомогательного отбора. В работах Imerovski et al. (2019), Liu et al. (2020) и Calderón-González et al. (2023) с использованием методов BSA-seq, GBS и GWAS выявили новые QTL устойчивости к заразах на хромосомах 3, 4 и 14. В отличие от устойчивости к ржавчине и ложной мучнистой росе, не удалось найти публикации, в которых присутствовала информация об использовании полученных результатов в практической селекции.

В целом анализ литературных источников показал, что современные молекулярно-генетические исследования устойчивости подсолнечника к заразах направлены на картирование генов и локусов количественных признаков, идентификацию генов-кандидатов и поиск генетических ассоциаций с использованием технологий высокопроизводительного генотипирования (WGS, GBS, ДНК-микрочипы), а также подходов к анализу ассоциаций с признаком, таких как BSA-seq, QTL-seq и GWAS. Однако, в данных работах отсутствует этап разработки диагностических ДНК-маркеров для ПЦР. Это можно объяснить тем, что результаты таких исследований обеспечивают технологическое преимущество в селекционном процессе. На это также указывает тот факт, что ДНК-маркеры для

маркер-вспомогательной селекции описаны преимущественно в патентах, в то время как в научных статьях в основном приводят данные о локализации генов устойчивости и, в некоторых случаях, нуклеотидные последовательности. Отдельно стоит отметить, что среди доступных литературных источников не удалось найти публикации, в которых было бы показано практическое применение маркер-вспомогательного отбора при создании селекционного материала подсолнечника, устойчивого к болезням. Таким образом, разработка прикладных молекулярно-генетических инструментов, прежде всего ДНК-маркеров, и внедрение маркер-вспомогательного отбора в практическую селекцию подсолнечника на устойчивость к болезням является актуальной задачей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Растительный материал

2.1.1 Подсолнечник (*Helianthus annuus* L.)

Растительный материал подсолнечника, характеризовался контрастной фенотипической устойчивостью к расе G_{RU} заразики (*O. citana* Wallr.) и включал инбредные линии, гибриды первого поколения (F_1), расщепляющиеся популяции (F_2), коммерческие гибриды, а также растения кондитерского сорта подсолнечника. Материал исследования включал линии, гибриды и сорт-популяцию селекции лабораторий генетики, селекции гибридного подсолнечника, иммунитета и селекции сортов подсолнечника центральной экспериментальной базы (ЦЭБ) ФГБНУ «Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В. С. Пустовойта» (ФНЦ ВНИИМК), линии и гибриды Донской опытной станции имени Л. А. Жданова и Армавирской опытной станции – филиалов ФНЦ ВНИИМК, а также коммерческие гибриды других селекционных компаний.

Для проверки ассоциации микросателлитных маркеров с устойчивостью к расе G_{RU} заразики и гибридологического анализа использовали 19 инбредных линий подсолнечника, контрастных по фенотипической реакции на поражение паразитом. Шестнадцать линий характеризовались как устойчивые, а три как восприимчивые. Для гибридологического анализа получены и использованы 107 растений расщепляющейся популяции F_2 ВК678 × RGP1.

Для разработки новых SSR- и аллель-специфичных ДНК-маркеров и их первичной апробации было использовано 19 инбредных линий селекции ФНЦ ВНИИМК, различающиеся по фенотипической устойчивости к заразики расы G_{RU} , а также гибрид СИ Честер (Syngenta), характеризующийся устойчивостью к паразиту. Валидацию разработанных маркерных систем и анализ соответствия аллельного состояния изучаемого локуса с фенотипом

растений проводили на расщепляющихся популяциях F_2 , полученных от скрещивания устойчивых и восприимчивых линий подсолнечника. Основная часть валидации была выполнена на 70 генотипах устойчивых и восприимчивых к расе G_{RU} заразики, включающих: 66 линий и гибридов селекции ВНИИМК, две линии-дифференциатора к расе F заразики LC1093 и P96 и два устойчивых коммерческих гибрида иностранной селекции СИ Честер (Syngenta, Швейцария) и P64LC108 (Pioneer Hi-Bred International, Inc., США), а также растениях F_2 BK680 $\times$ RGL1 и F_2 RGM $\times$ BK680, для которых проанализировано 103 и 101 растение, соответственно. Дополнительно, для оценки воспроизводимости результатов использовали 37 растений F_2 гибрида СИ Честер и 20 растений F_2 комбинации скрещивания BK680 $\times$ RG. Суммарное количество проанализированных растений F_2 составило 361.

Для оценки влияния аллельного состояния гена *HaOr7* и комбинации скрещивания на фенотипическое проявление устойчивости использовали растения из двух расщепляющихся популяций, полученных в лаборатории генетики ФНЦ ВНИИМК – F_2 BK508 $\times$ BK305 и F_2 BK305 $\times$ BK678-S, включавшие 48 и 50 растений соответственно. С целью апробации разработанных маркерных систем в условиях реального селекционного процесса маркер-вспомогательный отбор был внедрен в работу для оценки 137 растений F_2 из пяти гибридных комбинаций.

Для валидации разработанного маркера для ПЦР в реальном времени и маркерной системы для мультиплексной ПЦР, а также для проверки согласованности их результатов был проведен анализ 80 генотипов подсолнечника селекции ФНЦ ВНИИМК: 59 устойчивых и восприимчивых к расе G_{RU} заразики линий, 11 устойчивых и 10 восприимчивых гибридов. Также проанализированы 2 линии-дифференциатора к расе F заразики – LC1093 и P96.

Для оценки эффективности применения маркер-вспомогательного отбора при создании устойчивых сортов кондитерского подсолнечника

использовали 273 растения F_5 RG $\times$ СПК плюс, полученных в лаборатории селекции сортов подсолнечника.

Для определения аллельного состояния гена *HaOr7* у гибридов, возделываемых на территории Российской Федерации, был проведен анализ 71 коммерческого гибрида подсолнечника 12 селекционных компаний. Указанный набор использовали для сопоставления молекулярно-генетических данных с информацией об устойчивости, заявляемой оригинаторами, без проведения фенотипической оценки в рамках настоящей работы.

В совокупности в исследовании использовано 153 константных генотипа подсолнечника, отличающихся по фенотипической устойчивости к расе G_{RU} заразики, включая 59 инбредных линий селекции ФНЦ ВНИИМК, две линии-дифференциатора к расе F заразики, 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 $\times$ СПК плюс селекции ФНЦ ВНИИМК.

2.1.2 Заразиха кумская (*Orobanche cumana* Wallr.)

Растительным материалом заразики служили семена популяций, в структуре которых преобладала раса G_{RU}. Расовый состав семян был установлен в лаборатории иммунитета ФНЦ ВНИИМК с помощью набора генотипов дифференциаторов подсолнечника. В набор входили: гибрид НК Брио, устойчивый к пяти расам заразики от А до Е; линия LC 1093, устойчивая к расе F румынского типа и к предшествующим расам; линия Р 96, устойчивая к расе F испанского типа и ко всем более ранним расам; гибрид Тунка, сохраняющий устойчивость к расам от А до G_{RU}; а также линия RG, не поражавшаяся расой G_{RU} и всеми предшествующими расами. В качестве восприимчивого контроля использовали сорт ВНИИМК 8883 улучшенный, характеризующийся восприимчивостью ко всем расам заразики.

Семена заразики смешивали с почвенно-песчаным субстратом в соотношении 3:1. Норма внесения составляла не менее 200 мг семян на 1 кг

субстрата. Полученной смесью заполняли пластиковые цветочные ящики размером $50 \times 20 \times 20$ см. Далее в ящики рядовым способом высевали по 10 семян подсолнечника исследуемых генотипов. После посева емкости помещали в камеру искусственного климата «Биотрон-5», где поддерживали температуру 25–27 °С и 16-часовой световой режим. После появления всходов растения выращивали 30 суток, поливая их по мере подсыхания верхнего слоя субстрата. По окончании этого периода растения извлекали из субстрата, после чего на корнях учитывали число клубеньков и побегов заразики. Для каждого генотипа затем рассчитывали среднюю степень поражения и сопоставляли ее с показателями восприимчивого контроля ВНИИМК 8883.

2.2 Фенотипирование устойчивости подсолнечника

Оценку устойчивости подсолнечника к заразики проводили в лаборатории иммунитета ФНЦ ВНИИМК в условиях защищенного грунта на искусственно созданном зараженном фоне, сформированном семенами заразики с преобладанием расы G_{RU} . В основе оценки лежал метод ранней диагностики А. Я. Панченко (1973). Для подготовки зараженного фона семена паразита вносили в короба, содержащие 250 кг почвенно-песчаной смеси, из расчета 200 мг семян на 1 кг смеси. В качестве контроля использовали сорт ВНИИМК 8883 улучшенный, восприимчивый ко всем расам заразики. Растения выращивали в условиях 16-часового фотопериода при температуре 25–27 °С. Полив выполняли по мере подсыхания верхнего слоя почвенной смеси. Семена растений подсолнечника размещали в коробах рядами, высевая по 15 семян в каждом. С целью выравнивания инфекционной нагрузки, после появления всходов проводили прореживание посевов до целевого значения не более 10 растений в ряду, в первую очередь убирая растения с заметными нарушениями роста и развития. Учет количества клубеньков и побегов заразики на корневой системе подсолнечника выполняли через 25–27 дней после появления всходов.

2.3 Дизайн ДНК-маркеров *in silico*

Дизайн ДНК-маркеров для оценки их ассоциации с признаком устойчивости подсолнечника к расе G_{RU} заразили осуществляли на основе анализа нуклеотидных последовательностей, полученных из баз данных RefSeq и GenBank Национального центра биотехнологической информации (NCBI) (NCBI, 2019–2024). На первоначальном этапе, анализ физической локализации микросателлитных локусов был выполнен в 2019 году с использованием актуальной на тот момент референсной сборки генома подсолнечника HanXRQr1.0, размещенной в базе RefSeq (NCBI, 2019).

Поиск микросателлитных локусов (SSR) проводили с использованием программного обеспечения GMATA (Wang X., Wang L., 2016), доступного на GitHub (<https://github.com/XuewenWangUGA/GMATA>, дата обращения 28.03.2021) и нуклеотидных последовательностей третьей хромосомы из референсной сборки генома подсолнечника HanXRQr2.0-SUNRISE из базы RefSeq (NCBI, 2022). Последовательности отобранных SSR-локусов выравнивали на данную сборку с использованием алгоритма BLAST (Altschul et al., 1990), реализованного в веб-инструменте Nucleotide BLAST (NCBI, 2022). Дизайн фланкирующих праймеров выполняли в онлайн-ресурсе Primer-BLAST (Ye et al., 2012), обеспечивающим проверку специфичности отжига на выбранной сборке генома. Для разработки аллель-специфичных маркеров гена *HaOr7* проводили выравнивание нуклеотидных последовательностей устойчивого аллеля Or7-1 (GenBank: MN219479.1) и предполагаемого аллеля дикого типа LOC110867090, локализованного на 7-й хромосоме референсного генома HanXRQr2.0-SUNRISE (номер в базе данных NCBI: NC_035439.2 (143278893..143280718, complement)). Сравнительный анализ осуществляли с использованием алгоритма BLAST (Altschul SF, 1990) и инструментов множественного выравнивания в среде UGENE (Okonechnikov, 2012). На основании выявленных различий подбирали аллель-специфичные праймеры таким образом, чтобы пары RORS1 F/R (F (Forward) – прямой праймер; R

(Reverse) – обратный праймер) и RORS2 F/R обеспечивали амплификацию только последовательности устойчивого аллеля, а пары SORS1 F/R и SORS2 F/R – только последовательности восприимчивого аллеля. Предварительную оценку характеристик праймеров и анализ их совместимости для мультиплексной ПЦР проводили *in silico* с использованием веб-инструмента Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific, 2022), включая оценку вероятности образования вторичных структур, самокомплементарности и праймер-димеров. В результате проведенного анализа было разработано четыре аллель-специфичных маркера. В дальнейшем, с целью исправления проблем при детекции восприимчивого аллеля, были дополнительно сконструированы семь маркеров с названиями SORS2–SORS9. Их дизайн также основывался на сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей аллелей гена *HaOr7* и проверке специфичности амплификации *in silico* с использованием BLAST (Altschul SF, 1990) и Primer-BLAST (Ye et al., 2012). Веб-инструмент Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific, 2022) был использован для *in silico* оценки пригодности разработанных маркеров к совместной ПЦР с маркером RORS1.

Разработка ДНК-маркера для проведения ПЦР в реальном времени осуществлялась при помощи описанных выше последовательностей нуклеотидов и программных инструментов. Для реализации данной задачи была выбрана технология TaqMan. Фланкирующие праймеры располагали в участках, идентичных в обеих последовательностях для обеспечения эквивалентной амплификации. При разработке учитывали стандартные требования к олигонуклеотидам, включая длину, температуру плавления, содержание GC и отсутствие выраженных вторичных структур и самокомплементарности. Дополнительно проводили проверку специфичности праймеров посредством выравнивания с полной сборкой генома подсолнечника HanXRQr2.0-SUNRISE (NCBI, 2023) для исключения неспецифичной амплификации.

Для обеспечения аллель-специфичной детекции результатов были разработаны последовательности зондов Taqman, которые располагались между фланкирующими праймерами. Зонды представляли из себя последовательности нуклеотидов длиной 23–29 п.н. имеющие на 5'-конце разные флуоресцентные метки (FAM, ROX), а на 3'-конце – соответствующие им гасители флуоресценции (BHQ1, BHQ2). Каждый зонд был комплементарен только одному варианту последовательности и имел более 3 однонуклеотидных полиморфизмов, что обеспечивало высокую специфичность. Температуру плавления зондов рассчитывали таким образом, чтобы она превышала температуру плавления праймеров на 5–7 °С, что также повышало стабильность гибридизации и специфичность детекции. Также *in silico* проверяли вероятность образования вторичных структур между праймерами и зондами с помощью веб-инструмента Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific, 2023). Примененный подход обеспечивает идентификацию аллельного состояния гена на основании увеличения флуоресцентного сигнала в ходе ПЦР в реальном времени.

2.4 Выделение геномной ДНК

Выделение геномной ДНК проводили в зависимости от этапа исследования и анализируемого материала. На ранних этапах работы, при анализе ограниченного числа образцов, экстракцию нуклеиновых кислот осуществляли методом ЦТАБ (СТАВ, Цетилтриметиламмония бромид) с модификациями (Boom, 1990). В качестве исходного материала использовали фрагменты настоящих листьев. Навеску листовых тканей массой 80–100 мг гомогенизировали и подвергали лизису в буфере, содержащем 2 % СТАВ, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, с добавлением 0,2 % β-меркаптоэтанола непосредственно перед использованием. Инкубацию проводили при 65 °С в течение 60 мин, после чего дважды выполняли очистку смесью хлороформ:изоамиловый спирт (24:1) с центрифугированием при 12 000 g в течение 10 мин. ДНК осаждали изопропанолом, предварительно

охлажденным до -20 °С, промывали 70 % этанолом, высушивали и растворяли в деионизированной воде.

Начиная с этапа, связанного с конструированием и валидацией новых ДНК-маркеров, а также при анализе расширенных выборок линий и гибридов, выделение и очистку ДНК проводили с использованием набора МагноПрайм ФИТО (НекстБио, РФ) с применением автоматической станции Auto-pure 96 (Allsheng, КНР), что обеспечивало значительно более высокую пропускную способность и воспроизводимость результатов при работе с большим количеством образцов. Для растений подсолнечника, выращенных на инфекционном фоне заразили в тепличных условиях, в качестве исходного материала использовали фрагменты тканей настоящих листьев. Для генотипов, не проходивших фитопатологическую оценку, экстракцию геномной ДНК осуществляли из осевых органов зародыша, предварительно механически отделенных от семянки, что позволило исключить этап проращивания и сократить сроки анализа. При выделении ДНК с использованием набора «МагноПрайм ФИТО» (НекстБио, РФ) предварительная пробоподготовка была модифицирована по сравнению со стандартной инструкцией производителя. Гомогенизацию растительного материала проводили в 2 мл пробирках с металлическими шариками диаметром 2–3 мм в автоматическом гомогенизаторе KZ-III-FP. После гомогенизации в каждую пробирку добавляли 250 мкл Буфера Р и перемешивали встряхиванием (без использования вортекса) до получения однородной суспензии. Далее проводили центрифугирование раствора при 5000 g в течение 5 мин для осаждения крупнодисперсной фракции. После центрифугирования аккуратно отбирали 200 мкл надосадочной жидкости и, избегая захвата осадка, переносили в глубоколоночный планшет. Дальнейшую экстракцию ДНК осуществляли на автоматической станции Auto-pure 96 (Allsheng, КНР) в соответствии с протоколом набора «МагноПрайм ФИТО». Экстракция включала лизис в присутствии магнитных частиц, последовательные два этапа очистки с буфером F1 и один этап с буфером F2,

и в завершении элюцию нуклеиновых кислот в буфере E. Качество полученного элюата оценивали на микроспектрофотометре Nano-300 (Allsheng, КНР) по показателям оптической плотности при 260 и 280 нм. Образцы с соотношением A260/A280 в пределах 1,8–2,0 и без признаков деградации использовали для дальнейших молекулярно-генетических исследований.

2.5 Условия проведения и визуализация результатов ПЦР

Аллельное состояние гена *HaOr7* с помощью мультиплексной системы маркеров для классической ПЦР определяли в реакционной смеси (РС) объемом 25 мкл. Состав РС включал: 2,5 мкл ПЦР-Буфер-Б (10×), 2,5 мкл MgCl₂ (25 мМ), 2,5 мкл смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов (2,5 мМ каждого), по 1 мкл каждого праймера (10 пмоль/мкл), 0,2 мкл SynTaq ДНК-полимеразы (5 е.а./мкл) (Синтол, РФ), 2 мкл матричной ДНК (10–30 нг) и деионизированную H₂O до конечного объема 25 мкл. Амплификацию проводили в термоциклере MiniAmp (Thermo Fisher Scientific, США) при следующем температурно-временном режиме: начальная денатурация 3 мин при 94 °С; далее 35 циклов – 30 с при 94 °С, 40 с при 60 °С, 40 с при 72 °С; финальная элонгация 5 мин при 72 °С. Продукты амплификации разделяли методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле в 1×SB-буфере при напряжении 80–100 V и силе тока 50–58 mA в течение 1 ч с последующим окрашиванием бромистым этидием.

ПЦР в реальном времени проводили в конечном объеме 10 мкл. Состав реакционной смеси включал: 1 мкл ПЦР-Буфер-Б (10×), 1 мкл MgCl₂ (25 мМ), 1 мкл смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов (2,5 мМ каждого), по 0,5 мкл каждого универсального праймера (10 пмоль/мкл), по 0,25 мкл каждого флуоресцентного зонда (10 пмоль/мкл), 0,2 мкл SynTaq ДНК-полимеразы (5 е.а./мкл) (Синтол, РФ), 2 мкл матричной ДНК (25 нг/мкл) и деионизированную H₂O до конечного объема 10 мкл. Амплификацию проводили в приборе QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США) при следующем температурно-

временном режиме: начальная денатурация 5 мин при 94 °C; далее 40 циклов в двухступенчатом режиме – денатурация 20 с при 94 °C и отжиг/элонгация 40 с при 60 °C с регистрацией флуоресцентного сигнала.

2.6 Статистический анализ

Статистический анализ выполняли в программной среде R (если не указано иное) с использованием версий R 4.2.2, R 4.3.1 и R 4.4.0, применявшихся на разных этапах выполнения работы в период 2023-2025 гг. (R Core Team, 2025). Во всех статистических тестах пороговый уровень значимости принимали равным 0,05.

Проверку соответствия наблюдаемых частот распределения растений по фенотипическим и генотипическим классам теоретически ожидаемым соотношениям (3:1 и 1:2:1) выполняли с применением критерия согласия χ^2 Пирсона с использованием базовых функций пакета stats. Анализ расщепления проводили как для фенотипических данных, так и для данных генотипирования по ДНК-маркерам.

Анализ совместного наследования признака устойчивости и молекулярных маркеров выполняли с использованием χ^2 -критерия для многокатегориальных таблиц сопряженности. Расчет ожидаемых частот и значения критерия χ^2 проводили по методу анализа таблиц сопряженности (Лакин, 1990).

Нормальность распределения остатков при анализе количественных признаков оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилка (функция shapiro.test, пакет stats). При нарушении предпосылок параметрических методов для сравнения нескольких независимых выборок применяли критерий Краскела-Уоллиса (функция kruskal.test, пакет stats). Для попарных сравнений использовали критерий Манна-Уитни (функция wilcox.test, пакет stats) с поправкой Холма-Бонферрони на множественные сравнения.

Для анализа данных с избыточной дисперсией использовали обобщенные линейные модели с отрицательным биномиальным

распределением. Модели с нулевым завышением (Zero-Inflated Negative Binomial, ZINB) и двухкомпонентные Hurdle-модели (Zuur et al., 2009) реализовывали с использованием пакета `glmmTMB` (Brooks et al., 2017). В модели включали основные эффекты факторов и их взаимодействия; в отдельных случаях модель задавали без свободного члена (`intercept`).

Корректность и адекватность моделей оценивали с использованием симуляционного анализа стандартизированных квантильных остатков с применением пакета `DHARMA` (Hartig, 2022). Для проверки соответствия ожидаемому равномерному распределению применяли тест Колмогорова-Смирнова. Наличие избыточной или недостаточной дисперсии оценивали с использованием теста на дисперсию остатков. Проверку наличия выбросов выполняли с использованием теста на выбросы. Оценку наличия нулевого завышения проводили с помощью теста на соответствие наблюдаемого числа нулей с ожидаемым из симуляции модели. Все диагностические тесты выполняли на основе симулированных распределений остатков.

Для оценки различий между уровнями факторов рассчитывали маргинальные средние значения (*estimated marginal means*) и выполняли их попарные сравнения с поправкой Сидака (Шидака) с использованием пакета `emmeans` (Lenth, 2023).

Для количественной оценки различий между классами рассчитывали размеры эффектов. Различия долей оценивали с использованием коэффициента Cohen's *h* (Cohen, 1988) с помощью пакета `pwr` (Champely, 2020), различия средних значений – с использованием коэффициента Hedges' *g* с учетом неравенства объемов выборок (Hedges, 1981) с помощью функции `cohen.d()`, `hedges.correction = TRUE`) пакета `effsize` (Torchiano, 2020).

Визуализацию экспериментальных данных и результатов статистического анализа выполняли с использованием пакета `ggplot2` (Wickham, 2016).

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Результаты ранее проведенных в ФНЦ ВНИИМК исследований, свидетельствуют о моногенном контроле признака устойчивости к расе G_{RU} заразики у линий подсолнечника. Однако также отмечено неполное доминирование гена устойчивости (Гучетль и др., 2019). Согласно данным, представленным Imerovski et al. (2015), микросателлитный локус ORS683 из 3-ей группы сцепления генома подсолнечника оказался наиболее близким к гену устойчивости к расе заразики выше F, который был предварительно обозначен как *or_{ab-vl-8}*. Генетическое расстояние между ними составило 1,5 сантиморгана (сМ). Несмотря на то, что в этой же области 3-ей группы сцепления картирован ген *Or₅*, исследователи установили, что они представляют разные локусы. Ген *Or₅* находится в 7,5 сМ дистальнее микросателлитного локуса ORS1036, тогда как *or_{ab-vl-8}* картирован на расстоянии 19,6 сМ проксимальнее указанного локуса. Исходя из этого была проверена гипотеза о возможной локализации гена устойчивости к расе G_{RU} заразики также в верхней части 3-ей группы сцепления. Для этого был проведен отбор маркеров микросателлитных локусов из указанной области генома на основании опубликованных генетических карт (Tang S., 2003; Imerovski et al., 2015) (рисунок 1).

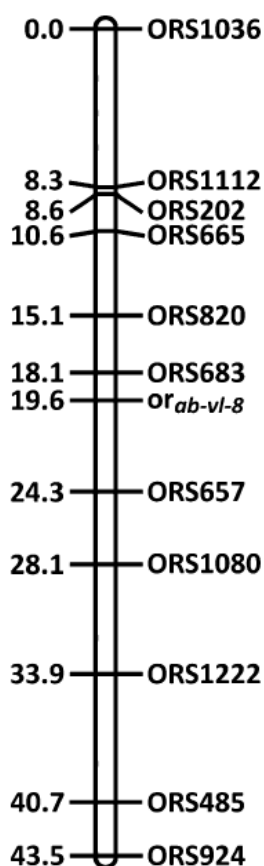


Рисунок 1 – Генетическая карта микросателлитных локусов 3-ей группы сцепления генома подсолнечника (Tang, 2003; Imerovski et al., 2015).

Поскольку генетическое картирование основано на анализе сцепления и показывает лишь относительные расстояния между исследуемыми локусами, дополнительно был проведен анализ физических расстояний между отобранными локусами. Для этого было проведено выравнивание последовательностей микросателлитных локусов на референсную, на тот момент, сборку генома подсолнечника HanXRQr1.0 из базы данных Refseq (NCBI, 2019) с помощью инструмента Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). На основе полученных данных была составлена карта физической локализации отобранных локусов (рисунок 2).

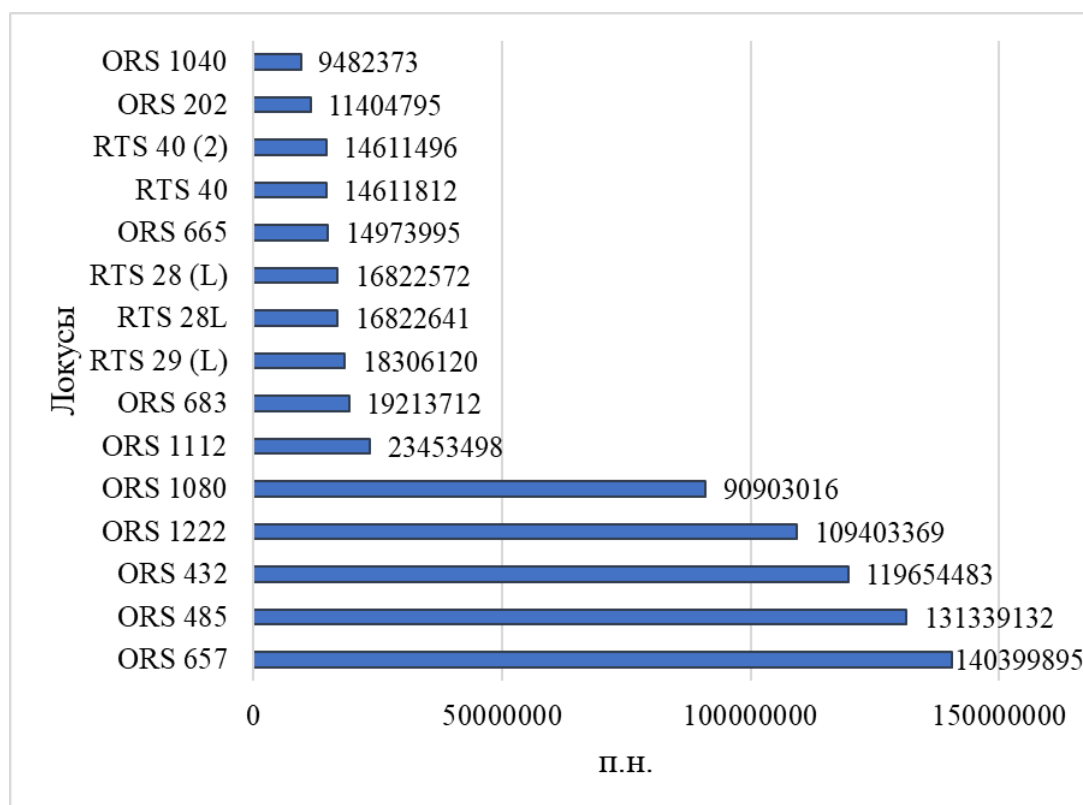


Рисунок 2 – Положение SSR и SCAR локусов, локализованных в 3-ей группе сцепления сборки генома HanXRQr1.0 (NCBI, 2019).

В группе сцепления 3 не было обнаружено сайтов связывания праймеров для локусов ORS1036, RTS05, ORS1021 и ORS777. Это может говорить как о местоположении данных локусов в других группах сцепления, так и об отсутствии последовательностей, соответствующих участкам в сборке генома HanXRQr1.0. Распределение локусов на карте физических расстояний можно условно разделить на две группы, что согласуется с составленной картой сцепления. Верхняя группа локусов расположена выше предполагаемого местоположения гена *Or_{ab-vl-8}* на генетической карте, в то время как нижняя часть – ниже данного гена. Кроме того, локусы в верхней группе располагаются более плотно по отношению друг к другу, в отличие от локусов в нижней группе, что также согласуется с генетической картой (рисунок 1). Таким образом, карта физического расположения локусов может быть эффективным инструментом для более точного анализа и подбора маркеров.

Был проведен анализ полиморфизма как по длине, так и по наличию/отсутствию амплифицированных фрагментов ДНК в зависимости от типа маркера (приложение А, таблица А1).

С целью анализа ассоциации маркеров с признаком устойчивости к расе G_{RU} заразили был проведен гибридологический анализ. Для этого, 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, RTS29 (L). Среди маркеров на наличие/отсутствие амплифицированного фрагмента ДНК полиморфизм был обнаружен по локусам RTS 05 и RTS 40. Остальные маркеры оказались мономорфными для всех рассматриваемых линий, что делает их дальнейшее использование нецелесообразным. Для гибридологического анализа отбирали полиморфные маркеры, прежде всего позволяющие различать устойчивые и восприимчивые родительские формы. Согласно этому были выделены маркеры ORS683 и ORS1112, которые показали полиморфизм между устойчивыми и восприимчивыми к расе G_{RU} заразили линиями. Восприимчивые линии характеризовались аллелем локуса ORS683 длиной 364 п.н. (приложение А) и отсутствием аллеля длиной 375 п.н. у локуса ORS 1112 (рисунок 3).

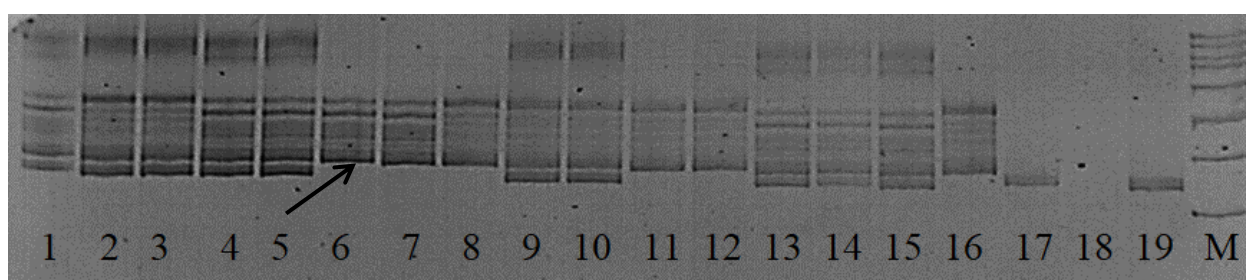


Рисунок 3 – Результаты электрофореза продуктов амплификации маркера ORS 1112 в полиакриламидном геле. Дорожки: 1-16 – устойчивые линии; 17 – ВК678; 18 – ВК680; 19 – ВК101; М – маркер молекулярной массы 100–1000 п.н. Стрелкой обозначен отсутствующий у устойчивых линий, фрагмент ДНК длиной 375 п.н.

Указанные маркеры располагаются относительно близко к гену *or_{ab-vl-8}* на генетической карте, приблизительно на расстоянии 1,5 сМ для ORS 683 и 11,3 сМ для ORS 1112. В свою очередь на физической карте ORS 683 является самым близлежащим локусом к ORS 1112, с расстоянием между ними порядка 4,25 миллионов п.н. (рисунок 2).

На основании описанного, было решено использовать маркеры ORS683 и ORS1112 в качестве основных, а также маркер ORS1040 в качестве дополнительного для проведения гибридологического анализа. Для этой цели были выбраны восприимчивая к заразице расы G_{RU} линия подсолнечника BK678 и устойчивая линия RGP1. В результате скрещивания данных линий получены гибриды F₁ и выполнен анализ наследования микросателлитных локусов. Перед молекулярно-генетическим анализом полученные гибридные растения были проверены на гибридность посредством фенотипической оценки устойчивости к заразице. В результате было установлено, что локусы ORS683 и ORS1112 характеризуются кодоминантным наследованием аллелей. Напротив, локус ORS1040 демонстрировал только одну фракцию, но несмотря на это, было принято решение также проанализировать выборку растений по данному маркеру (таблица 1).

Таблица 1 – Аллельные состояния SSR-локусов ДНК у экспериментального гибрида подсолнечника и его родительских линий

Генотип	Фенотип	SSR-локусы		
		ORS683	ORS1112	ORS1040
♀BK678	восприимчивый	364*	347	192
♂RGP1	устойчивый	400	375	200
F ₁ BK678 × RGP1	устойчивый	364/400	347/375	192

Примечание: * длина фрагмента ДНК в п.н.

Несколько растений были посеяны в поле и оценены на гибридность с помощью маркеров. Одно из гибридных растений было самоопылено для

получения семян F_2 . После этого был проведен анализ расщепления по устойчивости к расе G_{RU} заразики для данной комбинации скрещивания (таблица 2). Результаты показали, что фактическое распределение частот соответствовало теоретически ожидаемой модели 3:1 при моногенном наследовании признака. Это подтверждает ранее полученные в ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК данные о доминантном наследовании устойчивости к расе G_{RU} заразики.

Таблица 2 – Распределение растений F_2 BK678 $\times$ RGP1 по фенотипическим классам устойчивости к расе G_{RU} заразики

Фактически наблюдаемое распределение, шт.	Теоретически ожидаемое распределение	χ^2	df	P
77:30	3:1	0,53	1	0,47

Далее проведен гибридологический анализ распределения генотипов растений подсолнечника по трем микросателлитным локусам ДНК. Анализировались локусы ORS683, ORS1112 и ORS1040, каждый из которых был полиморфным и характеризовал родительскую линию уникальным аллелем (таблица 3). Поскольку локусы ORS683 и ORS1112 были определены как кодоминантные, то при анализе расщепления в поколении F_2 ожидаемое распределение соответствовало модели 1:2:1. Для локуса ORS1040 ожидалось распределение, соответствующее модели 3:1, что обычно характерно для моногенного наследования с проявлением признака при наличии доминантного аллеля. В случае SSR-маркеров такой эффект может объясняться одно- и полинуклеотидными мутациями у некоторых генотипов в зоне гибридизации с ДНК матрицей одного или сразу двух праймеров. Это может привести к тому, что при присутствии двух аллелей гибридизация праймера в ПЦР будет происходить предпочтительно на полностью комплементарную последовательность. Различия в количестве растений в

таблице объясняются отсутствием качественного результата ПЦР, вследствие чего часть растений было исключено из анализа.

Таблица 3 – Распределения генотипов растений F_2 ВК678 $\times$ RGP1 по трем микросателлитным локусам ДНК ORS683, ORS1112 и ORS1040

Локус	Всего растений, шт.	Фактически наблюдаемое соотношение, шт.	Теоретически ожидаемое соотношение	χ^2	df	P
ORS683	100	30:47:23	1:2:1	1.34	2	0,51
ORS1112	89	25:48:16	1:2:1	2,37	2	0,31
ORS1040	97	67:30	3:1	1.82	1	0,18

Для оценки соответствия фактического распределения теоретически ожидаемому был применен χ^2 -критерий. Анализ показал, что наблюдаемое распределение генотипов растений F_2 статистически значимо не отличается от ожидаемых частот по моделям 3:1 и 1:2:1. Полученные результаты позволили провести тест на совместное наследование с геном устойчивости к расе G_{RU} заразики Or_7 (таблица 4).

Таблица 4 – Результаты анализа сцепления гена Or_7 с SSR-локусами в поколении F_2 от скрещивания ВК678 $\times$ RGP1 по критерию χ^2

Пары локусов	Всего растений, шт.	Фактически наблюдаемое соотношение, шт.	Теоретически ожидаемое соотношение	χ^2	df	P
Or_7 –ORS683	100	23:35:12:7:12:11	3:6:3:1:2:1	7,28	5	0,20
Or_7 – ORS1112	89	18:39:8:8:9:7	3:6:3:1:2:1	7,42	5	0,19
Or_7 – 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. Другими словами ген устойчивости к расе G_{RU} заразики

не находится в достаточной близости к локусам, которые анализировались в этом исследовании.

Таким образом, ген, контролирующий устойчивость к расе G_{RU} заразики у линии RGP1, не локализуется в верхнем плече хромосомы 3. Исходя из литературных данных, было выдвинуто предположение, что этот ген может локализоваться в нижней части той же хромосомы.

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

Поскольку предположение о нахождении гена устойчивости подсолнечника к расе G_{RU} заразики в верхней части хромосомы 3 не нашло подтверждения, на основании литературных данных было сделано несколько предположений. В исследовании, опубликованном Imerovski и соавторами (2019) было обнаружено два основных локуса количественных признаков (QTL), локализованных в хромосоме 3, один из которых находился в нижней части третьей группы сцепления. Для проверки предположения о локализации гена устойчивости к расе G_{RU} заразики в данном участке генома подсолнечника были разработаны новые ДНК-маркеры микросателлитных локусов. С помощью программного обеспечения GMATA (Wang X., Wang L., 2016), доступного на GitHub (<https://github.com/XuewenWangUGA/GMATA>, дата обращения 28.03.2021), был проведен поиск последовательностей микросателлитных локусов референсного генома подсолнечника NanXRQr2.0-SUNRISE, хранящегося в базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI, 2021). Поиск проводился по последовательности 3-ей группы сцепления, доступной в базе Genbank под номером NC_035435.2, в пределах 20 млн п.н. от QTL (NCBI, 2021). Далее с помощью программного обеспечения Primer-BLAST были подобраны фланкирующие праймеры для каждого микросателлитного локуса (NCBI, 2021).

Параллельно, в результате анализа литературных источников было обнаружено, 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 заразице расы F_{GV} (Duriez et al., 2019). Поскольку в данном исследовании не изучалась устойчивость к другим расам заразицы, нами было выдвинуто предположение о возможной связи данного гена с устойчивостью подсолнечника и к расе G_{RU} заразицы. Для экспериментальной проверки предположения были *in silico* разработаны новые аллель-специфичные маркеры RORS1, RORS2 и SORS1 на наличие/отсутствие последовательности ДНК для каждого из аллелей на основе данных из базы генетической информации Genbank и референсного генома подсолнечника HanXRQr2.0-SUNRISE. Для разработки аллель-специфичных маркеров проведено выравнивание нуклеотидных последовательностей – Or7-1 (название последовательности устойчивого аллеля гена *HaOr7*) (номер в базе данных NCBI: MN219479.1) и предполагаемого гена LOC110867090 (номер в базе данных NCBI: NC_035439.2 (143278893..143280718, complement)), который кодирует белок, подобный рецепторной киназе Xa21 (receptor kinase-like protein Xa21), который, в отличие от *HaOr7*, лишен киназного домена. Ген LOC110867090 определен как аллель дикого типа для гена устойчивости *HaOr7* и локализован на 7-й хромосоме референсного генома подсолнечника HanXRQr2.0-SUNRISE. Обе последовательности находятся в открытом доступе в базе данных нуклеотидных последовательностей NCBI (NCBI, 2025).

Аллель-специфичные праймеры были сконструированы таким образом, чтобы пары праймеров RORS1 F/R и RORS2 F/R приводили к амплификации только последовательности ДНК, уникальной для последовательности Or7-1, а пары праймеров SORS1 F/R и SORS2 F/R только последовательности референсного генома подсолнечника HanXRQr2.0-SUNRISE. Идея заключалась в создании кодоминантной системы ДНК-маркеров, что

достигается за счет проведения мультиплексной ПЦР с двумя доминантными (наличие/отсутствие) аллель-специфичными маркерами. Аллель-специфичные маркеры были предварительно проанализированы с использованием инструмента Multiple Primer Analyzer от Thermo Fisher Scientific, путем проведения *in silico* анализа всех четырех праймеров. Этот этап позволил оценить совместимость праймеров по температурному режиму и вероятности образования вторичных структур. Учитывая, что эти параметры могут значительно влиять на результаты ПЦР и вызвать появление артефактов, их оценка являлась важным этапом подготовки к созданию системы. Результаты анализа показали возможность объединения маркеров в систему для мультиплексной ПЦР, которая предполагает одновременную амплификацию сразу двух аллелей гена *HaOr7*.

В результате проведенной работы было разработано 10 новых SSR и 4 аллель-специфичных маркера.

В дальнейшем по тексту, для удобства описания генотипов, функциональный ген *HaOr7* (Duriez et al., 2019), ассоциированный с устойчивостью к заразице расы F_{GV}, будет упоминаться как «устойчивый аллель *HaOr7*», а LOC110867090, представляющий укороченный вариант данного гена, как «восприимчивый аллель *HaOr7*» несмотря на то, что в литературе под *HaOr7* чаще подразумевается именно устойчивый аллель.

Для анализа взаимосвязи каждого маркера с признаком устойчивости было проведено исследование на выборке из 20 генотипов подсолнечника. В эту выборку входили генотипы: 1 устойчивый к расе G_{RU} заразицы коммерческий гибрид и 19 линий селекции ФНЦ ВНИИМК. Из них десять характеризовались устойчивостью к расе G_{RU} заразицы, а девять имели восприимчивый фенотип. Основные первоначальные критерии отбора маркеров включали: способность к стабильной амплификации и исключение возможности неспецифичной гибридизации с ДНК-матрицей для предотвращения амплификации нежелательных продуктов ПЦР. Далее рассматривалась связь между маркером и изучаемым признаком.

В результате анализа из 10 SSR-маркеров 6 были исключены из-за отсутствия целевого продукта ПЦР, а два – из-за отсутствия полиморфизма по длине фрагментов. Таким образом, для дальнейшего исследования были отобраны только два SSR-маркера. Среди четырех аллель-специфичных маркеров один не показывал амплификации и был исключен из дальнейшего анализа (приложение Б, таблица Б1).

По результатам анализа маркера SSR11 было выявлено 2 аллеля микросателлитного локуса, которые распределились случайным образом среди 20 различных генотипов подсолнечника, характеризующихся разной степенью устойчивости. Сходным образом, три аллеля маркера SSR27 также были распределены случайным образом. Несмотря на высокую специфичность маркеров и выявленный с их помощью полиморфизм оба маркера не проявили связь с признаком устойчивости к расе G_{RU} заразики и были исключены из исследования. Это свидетельствует о том, что предположение о локализации гена устойчивости к расе G_{RU} заразики в нижней части хромосомы 3 не получило подтверждения, однако необходимы дополнительные исследования для окончательного заключения.

Параллельно в рамках проверки второго предположения был проведен анализ аллель-специфичных маркеров гена *HaOr7*. Несмотря на то, что маркер SORS2 и проявил ассоциацию с исследуемым признаком на рассматриваемых генотипах, он был исключен из дальнейшего исследования в связи с амплификацией неспецифичного продукта ПЦР при анализе устойчивых линий. В отличие от SORS2, маркер SORS1 показал только специфичную амплификацию у всех восприимчивых генотипов. Маркер RORS1 демонстрировал наличие ПЦР-продукта у всех устойчивых генотипов и его отсутствие у восприимчивых генотипов подсолнечника. Амплифицированные фрагменты ДНК у обоих маркеров визуально соответствовали ожидаемым: SORS1 – 322 п.н., а RORS1 – 168 п.н. Такие размеры обеспечивают их эффективное совместное разделение в агарозном геле.

Далее на выборке из 29 генотипов подсолнечника, включавшей устойчивые и восприимчивые линии и гибриды, была проведена мультиплексная ПЦР с маркерами RORS1 и SORS1, с целью оценки согласованности результатов, кодоминантности и ассоциации с признаком (рисунок 4).

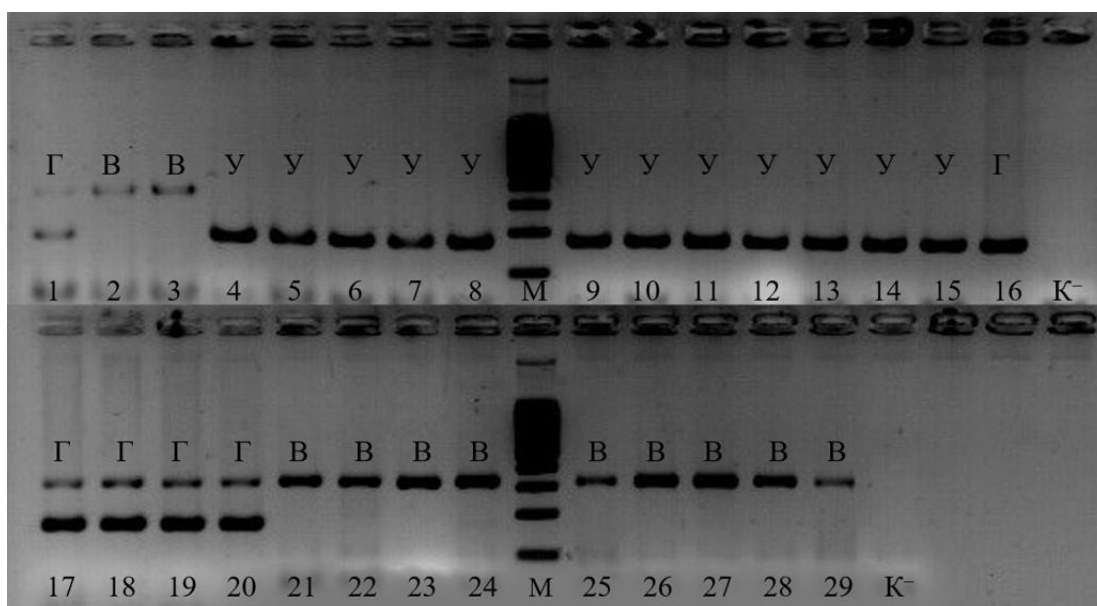


Рисунок 4 – Амплифицированные фрагменты ДНК в мультиплексной ПЦР с маркерами RORS1/SORS1. М – маркер молекулярного веса; К⁻ – отрицательный контроль; Г – гибрид; У – устойчивая линия; В – восприимчивая линия; описание генотипов в приложении В (таблица В1)

В ходе анализа было обнаружено наличие амплифицированных фрагментов ДНК, соответствующих маркеру RORS1, у всех исследованных устойчивых генотипов, включая устойчивый к расе G_{RU} заразики коммерческий гибрид. Это указывает на наличие у данных растений по крайней мере одной копии устойчивого аллеля *HaOr7*. Все восприимчивые линии имели амплифицированный фрагмент ДНК только маркера SORS1, что характеризует их как гомозиготы по восприимчивому аллелю гена *HaOr7*. Гибриды характеризовались наличием фрагментов ДНК обоих маркеров и подтвердили ожидаемый гетерозиготный генотип. Таким образом, на

изученной выборке генотипов созданная маркерная система показала кодоминантность и ассоциацию с признаком устойчивости к расе G_{RU} заразили.

Однако согласованность полученных и ожидаемых результатов была не полной: на дорожке №16 электрофореграммы, на которой представлен гибрид материнской восприимчивой линии ВК678 и устойчивой линии RGM отсутствовал фрагмент ДНК, характерный для восприимчивого фенотипа материнской линии. Поскольку сама линия ВК678 не вошла в ранее изученные выборки, был проведен дополнительный эксперимент. В новую выборку были включены: линия ВК678 и два экспериментальных гибрида с ее участием – F_1 ВК678 $\times$ RGB и F_1 ВК678 $\times$ RGP2. В качестве контроля использовалась уже изученная гибридная комбинация F_1 ВК680 $\times$ RGP1 – гетерозиготная по маркерной системе. Для исследования влияния эффекта объединения маркеров в мультиплекс на результаты были проведены две ПЦР: одна с использованием только маркера SORS1, а другая – мультиплексная с маркерами RORS1/SORS1 (рисунок 5).

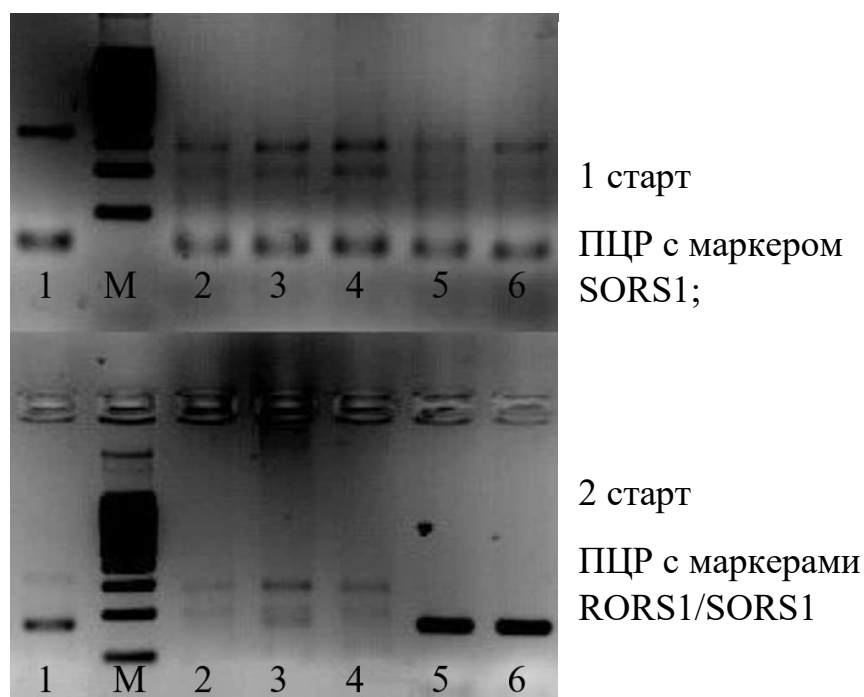


Рисунок 5 – Амплифицированные фрагменты ДНК, разделенные в агарозном геле. Дорожки: 1 – F_1 ВК680 $\times$ RGP1; М – маркер молекулярного веса; 2-4 – ВК678; 5 – F_1 ВК678 $\times$ RGB; 6 – F_1 ВК678 $\times$ RGP1

В обеих реакциях ПЦР контрольная гибридная комбинация F₁ BK680 × RGP1 продемонстрировала ожидаемые результаты: при использовании маркера SORS1 – был получен один ПЦР-продукт длиной 322 п.н., а в мультиплексной реакции RORS1/SORS1 были выявлены два фрагмента ДНК размером 168 и 322 п.н. соответственно. Однако, при анализе как линии BK678, так и гибридов F₁ BK678 × RGB и F₁ BK678 × RGP1 в ПЦР с использованием маркера SORS1, наблюдалось образование двух неспецифичных продуктов ПЦР длиной около 200 и 300 п.н. Этот эффект был отмечен также и в мультиплексной ПЦР, но только у линии BK678. С гибридами F₁ BK678 × RGB и F₁ BK678 × RGP1 в мультиплексной ПЦР амплифицировался специфичный для отцовских линий RGB и RGP2 фрагмент ДНК длиной 168 п.н., соответствующий ПЦР-продукту маркера RORS1. Эти данные указывают на то, что линия BK678 содержит альтернативный аллель дикого типа, который отличается по нуклеотидному составу от аллеля, присутствующего в референсном геноме HanXRQ-SUNRISE, что препятствует специфичному отжигу одного или обоих праймеров маркера SORS1. Это делает данный маркер неподходящим для анализа данной линии и гибридных комбинаций с ее участием, что снижает надежность и ограничивает применение мультиплексной системы RORS1/SORS1 в практической селекции.

Для устранения данного ограничения был проведен *in silico* анализ последовательности LOC110867090 и дополнительно разработано 7 экспериментальных аллель-специфичных маркеров аллеля дикого типа в качестве альтернативы маркеру SORS1. При разработке новых маркеров учитывалась их совместимость с праймерами маркера RORS1, чтобы сохранить возможность объединения их в мультиплексную ПЦР систему. Новые маркеры были протестированы на выборке из 30 линий и гибридов подсолнечника селекции ВНИИМК, включая материнскую линию BK678. В результате был отобран маркер SORS9, который характеризовался стабильной амплификацией фрагмента ДНК ожидаемого размера – приблизительно 217

п.н. у восприимчивых генотипов, а также отсутствием неспецифичных ПЦР-продуктов при анализе устойчивых линий. После этого была проверена согласованность результатов мультиплексной ПЦР с использованием маркеров RORS1/SORS9 на 13 линиях и гибридах селекции ВНИИМК (рисунок 6).

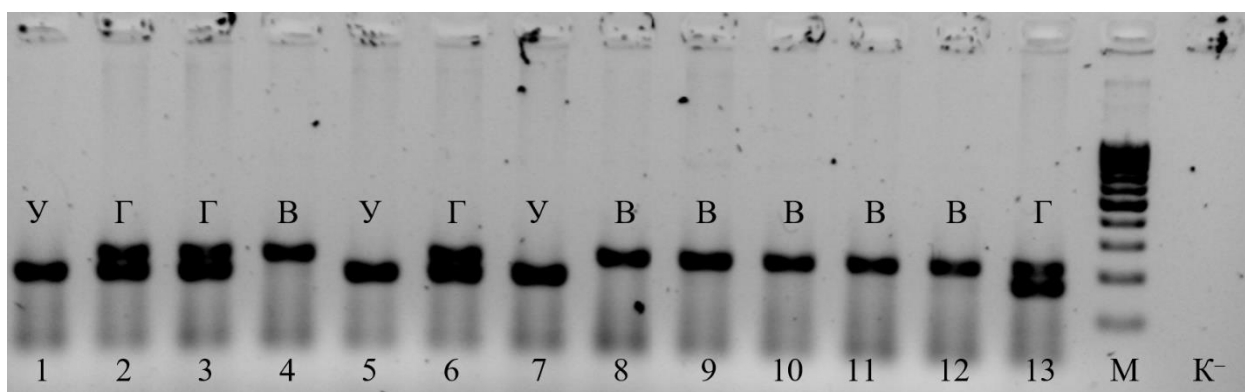


Рисунок 6 – Амплифицированные фрагменты ДНК мультиплексной ПЦР с маркерами RORS1/SORS9, разделенные в агарозном геле. Г – гибрид; У – устойчивая линия; В – восприимчивая линия; М – маркер молекулярного веса; К⁻ – отрицательный контроль. Описание изученных генотипов в приложении 4

Анализ результатов мультиплексной ПЦР с использованием маркеров RORS1/SORS9 на 13 генотипах подсолнечника показал полное соответствие между ожидаемыми данными, предсказанными *in silico*, и полученными ПЦР-продуктами. Ожидаемые размеры фрагментов составляли 168 п.н. для маркера RORS1 и 217 п.н. для маркера SORS9 (таблица 5). Гибридные растения подсолнечника, полученные от скрещивания восприимчивых и устойчивых растений, демонстрировали наличие обоих фрагментов ДНК, включая гибриды, в которых материнской формой выступала линия ВК678.

Для дальнейшей валидации разработанной системы маркеров был проведен анализ по наличию/отсутствию ПЦР-продуктов каждого маркера мультиплексной системы на 70 генотипах подсолнечника: 66 устойчивых и восприимчивых к расе G_{RU} заразили линий и гибридах селекции ВНИИМК,

двух линиях-дифференциаторах к расе F заразили, и двух устойчивых гибридов иностранной селекции (рисунок 7).

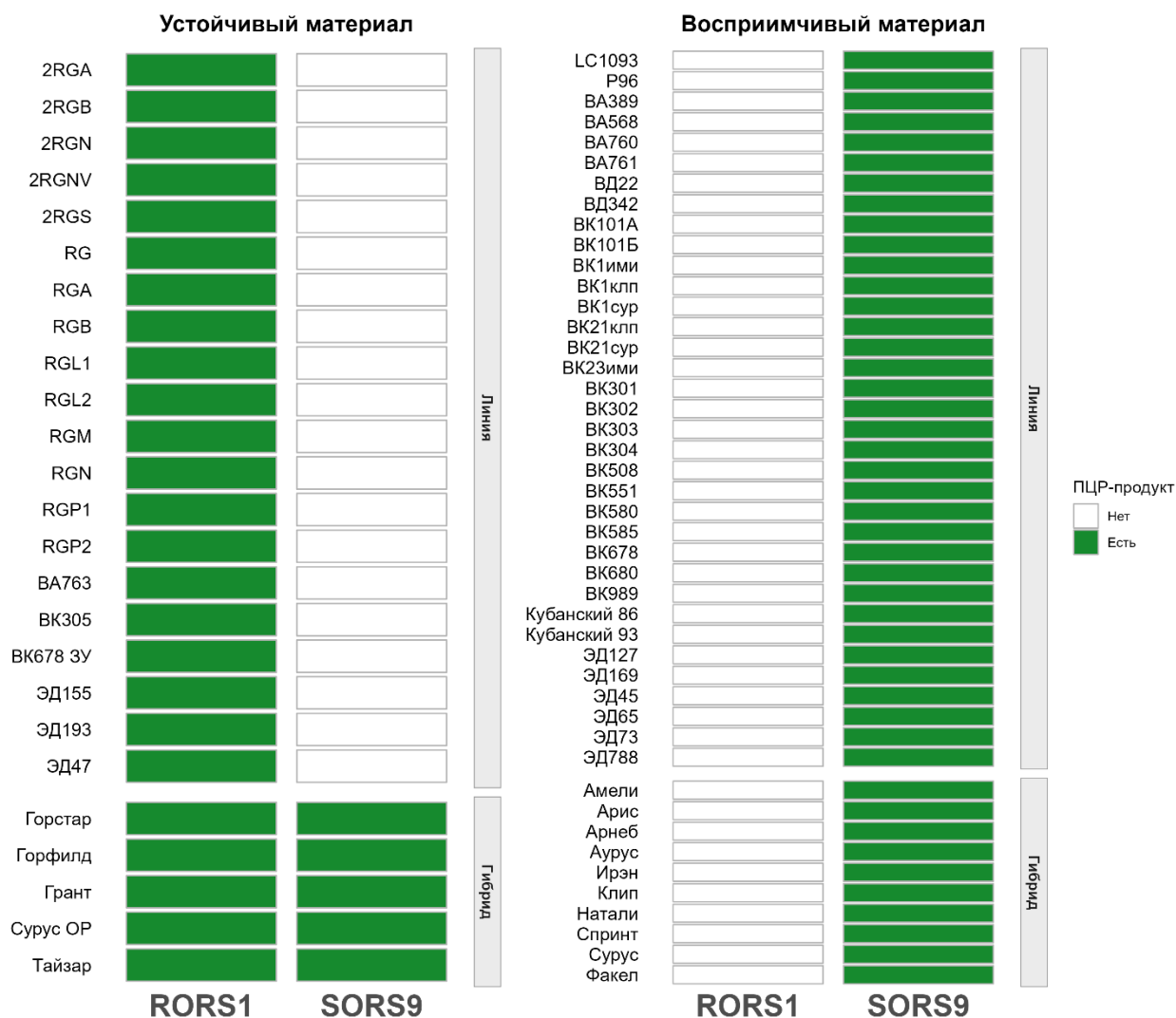


Рисунок 7 – Результаты анализа 70 генотипов подсолнечника с помощью системы ДНК-маркеров для мультиплексной ПЦР

Все устойчивые к расе G заразили линии подсолнечника характеризовались наличием ПЦР-продукта маркера RORS1 и отсутствием фрагмента ДНК, характерного для маркера SORS9. Все восприимчивые линии, в том числе две линии-дифференциатора к расе F, а также восприимчивые гибриды показали наличие амплификации только маркера SORS9. Устойчивые гибриды характеризовались наличием обоих фрагментов ДНК

маркеров RORS1 и SORS9, что говорит их о гетерозиготности. Таким образом, результаты анализа набора линий и гибридов полностью соответствовали ожидаемым на основании характеристик устойчивости генотипов.

Таблица 5 – Характеристика разработанных маркеров RORS1 и SORS9

Название маркера	Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Длина амплифицируемого фрагмента ДНК, п.н.
RORS1	RORS1 F	ACCATCTTTGCTTCCTATGGCA	168
	RORS1 R	CGTCACCCTTCTATGTCTGCT	
SORS9	SORS9 F	AGTGCATTTCGCAATCTTCGC	217
	SORS9 R	TGCCATCCTCATCATTAAGGG	

Таким образом, проблема низкой надежности и повторяемости результатов предыдущей мультиплексной системы была успешно решена посредством использования маркеров RORS1/SORS9. Также на большей выборке генотипов наблюдалась связь данных маркеров с признаком устойчивости к расе G_{RU} заразики. Для проведения валидации разработанной маркерной системы были самоопылены гибриды F_1 от скрещиваний BK680 $\times$ RGL1 и BK680 $\times$ RGM и получены семена расщепляющихся популяций F_2 .

3.3 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} заразики, был проведен фитопатологический анализ более 200 растений из двух расщепляющихся популяций – F_2 BK680 $\times$ RGL1 и F_2 BK680 $\times$ RGM. По результатам этого анализа растения были разделены на 3 класса: устойчивые, промежуточно-устойчивые и восприимчивые. Растения считались устойчивыми, если они были лишены признаков поражения заразигой – клубеньков на корнях. Промежуточно-устойчивыми растениями признавались те, на корнях которых было обнаружено от 1 до 6 клубеньков, в то время как

у восприимчивых растений наблюдалось более 6 клубеньков. Выбор данных критериев классов был обусловлен гипотезой о возможном неполном доминировании гена устойчивости к расе G_{RU} заразики, что предполагало, что класс промежуточно-устойчивых растений в основном должен состоять из гетерозиготных генотипов. Выбор порога в 6 клубеньков для разделения классов основан на практическом опыте сотрудников лаборатории иммунитета ФНЦ ВНИИМК. Результаты распределения растений по фенотипу были проверены на соответствие наблюдаемых частот теоретически ожидаемым с помощью критерия χ^2 .

Для комбинации скрещивания BK680 $\times$ RGL1 выборка составила 103 растения F_2 , которые были оценены на устойчивость к расе G_{RU} заразики и генотипированы с помощью маркерной системы RORS1/SORS9 (таблица 6).

Таблица 6 – Соответствие распределения растений F_2 BK680 $\times$ RGL1 по фенотипическим классам и генотипам по маркерной системе теоретической модели 1:2:1 (количество растений в классе, шт.)

Соотношение фенотипических классов					
восприимчивые	промежуточно-устойчивые	устойчивые	Теоретически ожидаемое соотношение	χ^2	P
29	48	26	1:2:1	0,39	0,82
Соотношение генотипов по маркерной системе					
S*	RS*	R*	Теоретически ожидаемое соотношение	χ^2	P
29	46	28	1:2:1	1,19	0,55

S – наличие продукта ПЦР только маркера SORS9 (восприимчивая гомозигота); R – наличие продукта ПЦР только маркера RORS1 (устойчивая гомозигота); RS – Наличие продукта обоих маркеров (гетерозигота).

Распределение растений подсолнечника F_2 BK680 $\times$ RGL1 как по фенотипу, так и по маркерной системе, согласовывалось с теоретически ожидаемым 1:2:1. Все растения из восприимчивого фенотипического класса были охарактеризованы как восприимчивые гомозиготы (S) по маркерной

системе. Все остальные растения, несущие устойчивый аллель гена *HaOr7*, характеризовались повышенной устойчивостью к расе G_{RU} заразики. Для проверки предположения о соответствии классов промежуточно-устойчивых и гетерозиготных по гену *HaOr7* растений, было проанализировано их распределение (таблица 7).

Таблица 7 – Соответствие распределения растений F₂ BK680 × RGL1 по фенотипическим классам и генотипам по маркерной системе (количество растений в классе, шт.)

Класс по фенотипу	Восприимчивые			Промежуточно-устойчивые			Устойчивые		
Класс по маркерной системе	RS	R	S	RS	R	S	RS	R	S
Количество растений в классе, шт.	0	0	29	33	15	0	13	13	0

S – наличие продукта ПЦР только маркера SORS9 (восприимчивая гомозигота); R – наличие продукта ПЦР только маркера RORS1 (устойчивая гомозигота); RS – Наличие продукта обоих маркеров (гетерозигота).

Результаты анализа показали, что среди промежуточно-устойчивых растений доля гетерозигот и гомозигот по гену *HaOr7* составила 2:1, а в классе устойчивых 1:1. Полученные при анализе растений F₂ BK680 × RGL1 данные показывают связь устойчивости к расе G_{RU} заразики и наличия устойчивого аллеля гена *HaOr7*. Одновременно с этим не было найдено подтверждений предположению о том, что класс промежуточно-устойчивых растений составляют гетерозиготные растения за счет неполного доминирования гена *HaOr7*.

Для комбинации скрещивания RGM × BK680 была проведена фитопатологическая оценка 101 растения F₂ – определена фенотипическая устойчивость к заразики расы G_{RU}, а также установлен генотип каждого растения по маркерной системе (таблица 8).

Таблица 8 – Соответствие распределения растений F₂ RGM × BK680 по фенотипическим классам и по маркерной системе (количество растений в классе, шт.)

Соотношение фенотипических классов					
восприимчивые	промежуточно-устойчивые	устойчивые	Теоретически ожидаемое соотношение	χ^2	P
26	44	31	1:2:1	0,39	0,82
Соотношение генотипов по маркерной системе					
S*	RS*	R*	Теоретически ожидаемое соотношение	χ^2	P
21	57	23	1:2:1	1,19	0,55

S – наличие продукта ПЦР только маркера SORS9 (восприимчивая гомозигота); R – наличие продукта ПЦР только маркера RORS1 (устойчивая гомозигота); RS – Наличие продукта обоих маркеров (гетерозигота).

Частоты распределения растений по классам изученной комбинации при расщеплении по фенотипу и маркерной системе соответствовали теоретически ожидаемым по модели 1:2:1 (P = 0,82 и 0,55, соответственно). Однако, в отличие от первой комбинации скрещивания, наблюдалось несоответствие в количестве растений восприимчивого класса и гомозигот по восприимчивому аллелю. Был проведен анализ соответствия распределения растений по классам (таблица 9).

Таблица 9 – Соответствие распределения растений F₂ RGM × BK680 по фенотипическим классам и генотипическим классам по маркерной системе

	Класс по фенотипу																	
	восприимчивые			промежуточно-устойчивые												устойчивые		
Количество клубеньков, шт.	≥ 7			4-6			3			2			1			0		
Класс по маркерной системе	RS*	R*	S*	RS	R	S	RS	R	S	RS	R	S	RS	R	S	RS	R	S
Количество растений в классе, шт.	5	0	21	7	0	0	11	0	0	7	1	0	10	8	0	17	14	0

S – наличие продукта ПЦР только маркера SORS9 (восприимчивая гомозигота); R – наличие продукта ПЦР только маркера RORS1 (устойчивая гомозигота); RS – Наличие продукта обоих маркеров (гетерозигота).

В устойчивом фенотипическом классе соотношение гетерозигот к устойчивым гомозиготам составило приблизительно 1:1, что согласуется с комбинацией скрещивания BK680 × RGL1. В промежуточно-устойчивом классе данное отношение составило почти 4:1, что значительно выше, чем в другой комбинации скрещивания (2:1). Для данной комбинации скрещивания промежуточно-устойчивый класс был разделен на 4 подкласса в зависимости от количества клубеньков заразили. При анализе этой информации было установлено, что 8 из 9 растений, определенных как устойчивые гомозиготы, показали степень поражения на уровне одного клубенька заразили и 1 растение – двух. В остальные подклассы попали только гетерозиготные растения, в частности, у 7 растений наблюдалась степень поражения от 4 до 6 клубеньков. Все гомозиготные по восприимчивому аллелю растения были определены в восприимчивый класс. Однако в этот класс также были определены 5 гетерозиготных растений. Так как при фенотипическом анализе не фиксировалось точное количество клубеньков для каждого растения, степень поражения можно оценить только по принадлежности к классу или подклассу. Это не позволило установить степень поражения гетерозиготных растений восприимчивого класса. Однако, учитывая тот факт, что 7 из 57 гетерозиготных растений имели степень поражения 4–6 клубеньков на растение и то, что в восприимчивый класс попадали растения со степенью поражения выше 7 клубеньков, шанс наблюдения у 5 гетерозиготных растений степени поражения в пределах 7–10 клубеньков является высоким. По этой причине, данное расхождение в распределении классов нельзя считать доказательством несоответствия ассоциации между генотипическим классом по гену *HaOr7* и признаком устойчивости, поскольку оно может быть связано с недостаточной дифференцирующей способностью используемых фенотипических классов. Несмотря на эффективность подобного фенотипического распределения растений в рамках практической селекции, данный подход не обладает достаточной информативностью для проведения генетических исследований. Для дальнейшей работы было предложено

подсчитывать точное количества клубеньков у каждого растения, а также проводить молекулярно-генетический анализ до фитопатологической оценки, что будет соответствовать принципу слепого метода, так как позволит исключить влияние субъективных оценок при анализе данных.

Несмотря на вышеописанные недостатки, было установлено, что ни одно гомозиготное по восприимчивому аллелю растение не проявляло фенотипической устойчивости к расе G_{RU} заразики. Одновременно с этим, гомозиготные по устойчивому аллелю растения комбинации скрещивания RGM × BK680 не поражались выше значений в 2 клубенька на растение. Таким образом, по результатам изучения 204 растений F₂ была установлена ассоциация маркерной системы аллельного состояния гена *HaOr7* с устойчивостью подсолнечника к расе G_{RU} заразики.

С учетом предложенных изменений был проведен дополнительный эксперимент. Изучены 37 растений F₂ устойчивого к расе G гибрида иностранной селекции СИ Честер (Syngenta) и 20 растений F₂ BK680 × RG, где донором устойчивости была линия RG, гомозиготная по устойчивому аллелю гена *HaOr7*. Результаты соответствия распределения по генотипу (маркерной системе) модели 1:2:1 проверяли с помощью χ^2 -критерия (таблица 10).

Таблица 10 – Распределение растений F₂ по генотипическим классам

Гибридная комбинация	Всего растений, шт.	Теоретически ожидаемое соотношение	Наблюдаемое соотношение	df	χ^2	P
F ₂ СИ Честер	37	1:2:1	12:16:9	2	1,16	0,56
F ₂ BK680 × RG	20	1:2:1	4:10:6	2	0,40	0,82

Для обеих расщепляющихся популяций результаты χ^2 показали соответствие фактического распределения теоретически ожидаемым для моделей 1:2:1. В популяции F₂ СИ Честер значение P = 0,56, а в популяции F₂ BK680 × RG – 0,82, что выше порогового уровня 0,05. Каждое проанализированное растение было пронумеровано и проведена

фитопатологическая оценка на устойчивость к расе G_{RU} заразики (табл. 2). Информацию о генотипе каждого индивидуального растения по маркеру и количестве клубеньков заразики, внесли в 2 независимых набора данных, и провели визуальный анализ этого распределения (рисунок 8).

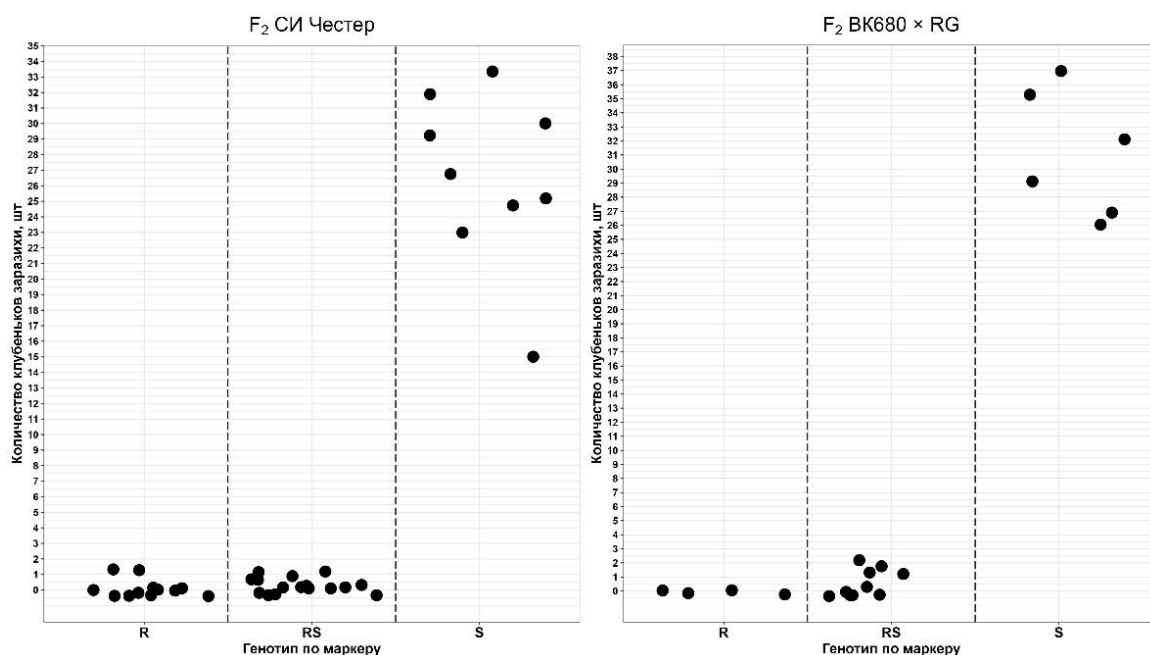


Рисунок 8 – Степень поражения растений подсолнечника расой G_{RU} заразики, выраженная в количестве клубеньков на корнях. R – устойчивая гомозигота *HaOr7*, RS – гетерозигота, S – восприимчивая гомозигота

Все растения, несущие устойчивый аллель гена *HaOr7*, показали повышенную устойчивость к расе G_{RU} заразики со средней степенью поражения 0,13 для устойчивых гомозигот и 0,42 для гетерозигот обеих расщепляющихся популяций. Восприимчивые гомозиготы показали среднюю степень поражения 28,3. Нарушение предположений о равенстве дисперсий и нормальности распределения остатков не отвечало критериям проведения дисперсионного анализа, поэтому был применен непараметрический тест Краскела-Уоллиса, который показал статистически значимое влияние генотипа на степень поражения ($P < 0,001$) при отсутствии зависимости от гибридной комбинации ($P = 0,38$). Для оценки различий между классами

провели попарные сравнения с помощью теста Манна-Уитни с поправкой Бонферрони на множественные сравнения (таблица 11).

Таблица 11 – Попарные сравнения разных генотипических классов по степени поражения

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.

Результаты сравнения показали статистически значимые различия между классом восприимчивых гомозигот и двумя другими классами. В свою очередь не было установлено различий между устойчивыми гомозиготами и гетерозиготами. Однако необходимо принимать во внимание малый размер выборки, который мог привести к недостаточной мощности эксперимента для выявления менее существенных различий.

Проведенная валидация разработанной кодоминантной системы аллель-специфичных маркеров аллелей гена *HaOr7* для мультиплексной ПЦР показала связь между генотипом и степенью поражения растений подсолнечника заразихой расы G_{RU}. Таким образом, результаты анализа четырех расщепляющихся популяций F₂, показывают, что ген *HaOr7* ассоциирован с устойчивостью подсолнечника к расе G_{RU} заразихи. Маркерная система была рекомендована для применения в маркер-вспомогательной селекции с параллельной оценкой эффективности в условиях реального селекционного процесса.

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

Одними из главных требований к ДНК-маркерам в рамках маркер-вспомогательной селекции являются точность, пропускная способность, а также повторяемость и воспроизводимость результатов.

На данный момент существует возможность использования автоматических станций для экстракции и очистки нуклеиновых кислот, позволяющих одному специалисту в течение 2–3 часов подготовить глубоколоночный планшет с очищенной ДНК 95 растительных образцов и одного отрицательного контроля, что соответствует стандартному планшету для ПЦР (96 лунок). Несмотря на то, что ранее разработанная в рамках исследования маркерная система является мультиплексной – не требует проведения двух отдельных ПЦР, ее использование подразумевает визуализацию размеров амплифицированных фрагментов. Проведение классического гель-электрофореза в агарозном геле для 95 образцов значительно увеличивает время проведения анализа и лимитирует объем селекционного материала для оценки. Поэтому актуальной задачей является разработка маркерной системы с возможностью автоматизации и оптимизации этапов анализа для массовой и быстрой оценки селекционного материала. Одним из решений может выступить капиллярный гель-электрофорез, однако он имеет высокую стоимость одного анализа и целесообразен для фрагментного анализа сразу нескольких маркеров. Принимая во внимание все задачи и условия проведения анализа был выбран метод ПЦР в реальном времени. Использование данного метода позволит получать результат в два этапа: выделение ДНК из растительных образцов и проведение ПЦР в реальном времени для образцов ДНК. К преимуществам данного метода также относится возможность автоматизации интерпретации результатов и создания отчетов, а также контролю ложноположительных результатов. Таким образом,

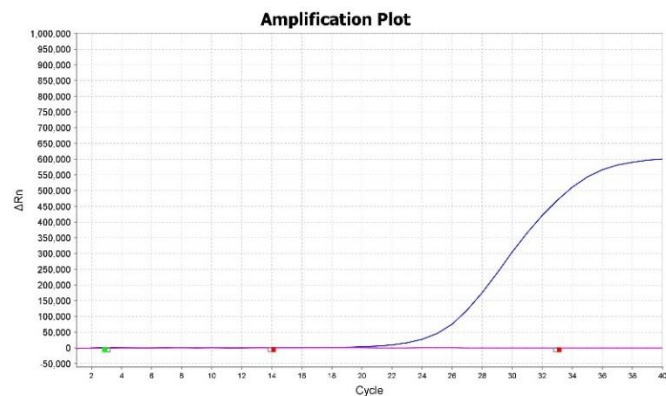
данный метод отвечает требованиям проведения маркер-вспомогательной селекции. Для разработки ДНК-маркера для ПЦР в реальном времени был выбран метод TaqMan.

Для *in silico* разработки указанных олигонуклеотидов было проведено выравнивание нуклеотидных последовательностей устойчивого и восприимчивого аллелей гена *HaOr7*, идентичных использованным для разработки системы ДНК-маркеров для классической ПЦР. Специфичные олигонуклеотидные праймеры и зонды были подобраны таким образом, что пара общих праймеров для амплификации связывалась с обеими последовательностями (Or7-1 и LOC110867090 HanXRQr2.0-SUNRISE), а аллель-специфичные зонды только с одной из них. Учитывались параметры температуры отжига праймеров, отсутствия образования вторичных структур между праймерами и зондами, а также температура плавления зондов, которая выше температуры плавления праймеров приблизительно на 5-7 °С.

В результате был разработан экспериментальный ДНК-маркер, который включал пару общих олигонуклеотидных праймеров и два аллель-специфичных олигонуклеотидных зонда – для устойчивого (Or7-1) и восприимчивого (LOC110867090) аллелей гена *HaOr7*, содержащих на 5'-конце флуорофоры FAM для устойчивого аллеля и ROX для восприимчивого, а также гасители флуоресценции на 3'-конце BHQ1 и BHQ2 соответственно. Примеры амплификации всех аллельных состояний представлены на рисунке 9. Нуклеотидные последовательности праймеров и флуоресцентных зондов представлены в таблице 12.

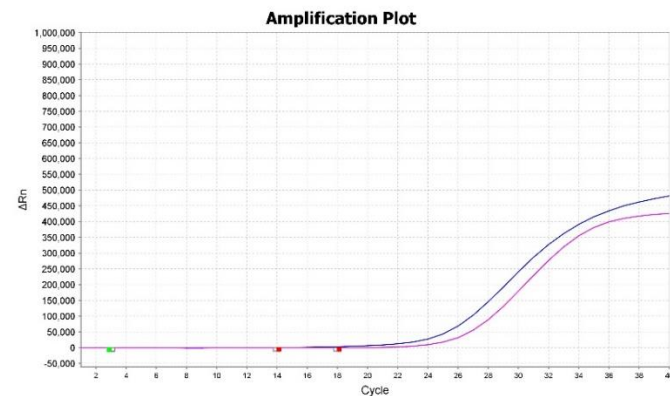
Таблица 12 – Нуклеотидные последовательности праймеров и флуоресцентных зондов Taqman.

Название	Тип	Модификация 5'	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Модификация 3'
RSOR F	праймер	–	ACTTGGTCGTCTTTCCAGGC	–
RSOR R	праймер	–	GACAAATTAGTTGGAATGACTCCG	–
NRSORwt	зонд	ROX	ACGCGTCCTTCGTCTTGGTGACA	BHQ2
NRSORr	зонд	FAM	CTACGTAACCTCACTCTCGGTGACAACAA	BHQ1



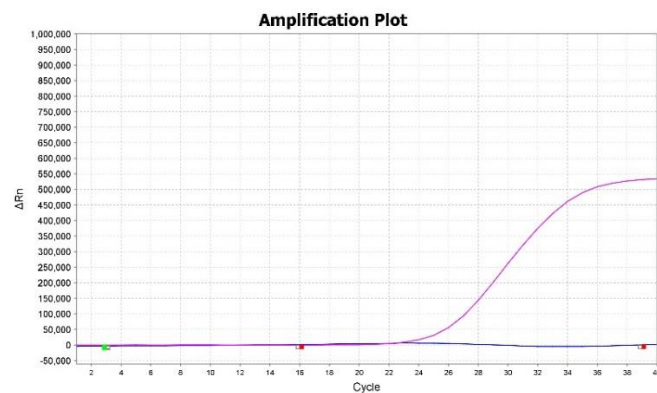
A

■ S ■ R



Б

■ S ■ R



В

■ S ■ R

Рисунок 9 – Результаты амплификации геномной ДНК растений подсолнечника с разным аллельным состоянием гена *HaOr7* с помощью разработанного ДНК-маркера для ПЦР в реальном времени; А – Сигнал только по каналу FAM (устойчивая гомозигота (R)) ; Б – Сигнал по обоим каналам (гетерозигота (RS)) ; В – Сигнал только по каналу ROX (восприимчивая гомозигота (S))

Для валидации разработанного маркера для ПЦР в реальном времени и маркерной системы для мультиплексной ПЦР, а также для проверки согласованности их результатов был проведен анализ 80 генотипов подсолнечника селекции ФНЦ ВНИИМК: 11 устойчивых и 10 восприимчивых гибридов; 59 устойчивых и восприимчивых к расе G_{RU} заразили линий. Также проанализированы 2 линии-дифференциатора к расе F заразили – LC1093 и P96. Всего было проанализировано 82 образца подсолнечника (рисунки 10–11)

Устойчивый материал		
	Мультиплексная классическая ПЦР	ПЦР в реальном времени
2RGA	R	R
2RGB	R	R
2RGN	R	R
2RGNV	R	R
2RGS	R	R
RG	R	R
RGA	R	R
RGB	R	R
RGL1	R	R
RGL2	R	R
RGM	R	R
RGN	R	R
RGP1	R	R
RGP2	R	R
BA763	R	R
BK301-ор	R	R
BK305	R	R
BK305-во	R	R
BK305-вс	R	R
BK305-лмру	R	R
BK305-про	R	R
BK305-сур	R	R
BK678 3У	R	R
ЭД155	R	R
ЭД193	R	R
ЭД47	R	R
Арсенал ОР	RS	RS
Горстар	RS	RS
Горфилд	RS	RS
Грант	RS	RS
Лаврус	RS	RS
Протектор	R	R
Ризор	R	R
Стеарин	RS	RS
Сурус ОР	RS	RS
Тайзар	RS	RS
Фогор	R	R

Рисунок 10 – Результаты генотипирования устойчивых к расе G_{RU} заразили линий и гибридов подсолнечника с использованием обеих маркерных систем

У всех 26 устойчивых к расе G_{RU} заразили линий подсолнечника наблюдалось наличие специфичного ПЦР-продукта маркера RORS1 и накопление флуоресцентного сигнала по каналу FAM – маркеров устойчивого аллеля, и одновременно с этим, отсутствие как фрагмента маркера SORS9, так и сигнала по каналу ROX – маркеров восприимчивого аллеля (рисунок 10). Таким образом, все устойчивые линии подсолнечника были определены как гомозиготные (R) по устойчивому аллелю. Оценка согласованности результатов, полученных по обеим маркерным системам, составила 100 %. Среди устойчивых гибридов 8 из 11 были определены как гетерозиготы (RS), а 3 гибрида – Ризор, Протектор и Фогор как гомозиготы по устойчивому аллелю (R), что согласуется с внутренней информацией о родительских линиях и комбинациях скрещиваний. У гомозиготных гибридов обе родительские линии являются устойчивыми гомозиготами, а у гетерозиготных гибридов – только одна из родительских линий.

Все 35 линий и 10 гибридов, восприимчивые к расе G_{RU} заразили, в том числе две линии-дифференциатора к расе F, характеризовались наличием только специфичного ПЦР-продукта маркера SORS9 и накоплением флуоресцентного сигнала по каналу ROX – маркеров восприимчивого аллеля (рисунок 11). Таким образом, они были охарактеризованы как гомозиготные по восприимчивому аллелю. Полученные данные по аллельному состоянию гена *HaOr7* у линий-дифференциаторов к расе F из международного набора также согласуются с информацией из литературных источников (Duriez et al., 2019). Несмотря на то, что в оригинальной работе данный ген описывается как контролирующий устойчивость к заразили расы F_{GV} , описываемые линии-дифференциаторы для расы F не несли устойчивый аллель данного гена, что было подтверждено в текущей работе с помощью разработанных маркерных систем.

Восприимчивый материал		
	Мультиплексная классическая ПЦР	ПЦР в реальном времени
LC1093 (Дифференциатор)	\$	\$
P96 (Дифференциатор)	\$	\$
BA389	\$	\$
BA568	\$	\$
BA760	\$	\$
BA761	\$	\$
ВД22	\$	\$
ВД342	\$	\$
ВК101А	\$	\$
ВК101Б	\$	\$
ВК1ими	\$	\$
ВК1клп	\$	\$
ВК1сур	\$	\$
ВК21клп	\$	\$
ВК21сур	\$	\$
ВК23ими	\$	\$
ВК301	\$	\$
ВК302	\$	\$
ВК303	\$	\$
ВК304	\$	\$
ВК508	\$	\$
ВК551	\$	\$
ВК580	\$	\$
ВК585	\$	\$
ВК678	\$	\$
ВК680	\$	\$
ВК989	\$	\$
Кубанский 86	\$	\$
Кубанский 93	\$	\$
ЭД127	\$	\$
ЭД169	\$	\$
ЭД45	\$	\$
ЭД65	\$	\$
ЭД73	\$	\$
ЭД788	\$	\$
Амели	\$	\$
Арис	\$	\$
Арнеб	\$	\$
Аурус	\$	\$
Ирэн	\$	\$
Клип	\$	\$
Натали	\$	\$
Спринт	\$	\$
Сурус	\$	\$
Факел	\$	\$

Линия

Гибрид

Рисунок 11 – Результаты генотипирования восприимчивых к расе G_{RU} заразики линий и гибридов подсолнечника с использованием обеих маркерных систем

Результаты валидации и сравнительной оценки двух маркерных систем показали 100 % согласованность результатов между маркерными системами. Одновременно с этим, обе системы показали связь с признаком устойчивости. Все устойчивые линии и гибриды показали наличие маркера устойчивого аллеля *HaOr7*, а восприимчивые – его отсутствие. Таким образом, с помощью обеих

маркерных систем удалось разделить селекционный материал ФНЦ ВНИИМК по устойчивости к расе G_{RU} заразики.

Дальнейшая валидация обеих маркерных систем проведена на расщепляющихся выборках двух гибридных комбинаций – 48 растений F_2 ВК508 × ВК305 и 50 растений F_2 ВК305 × ВК678-S. Линия ВК305 устойчива к расе G_{RU} заразики, а ВК508 и ВК678-S восприимчивы. Все 98 растений были оценены по обеим маркерным системам (рисунок 12).

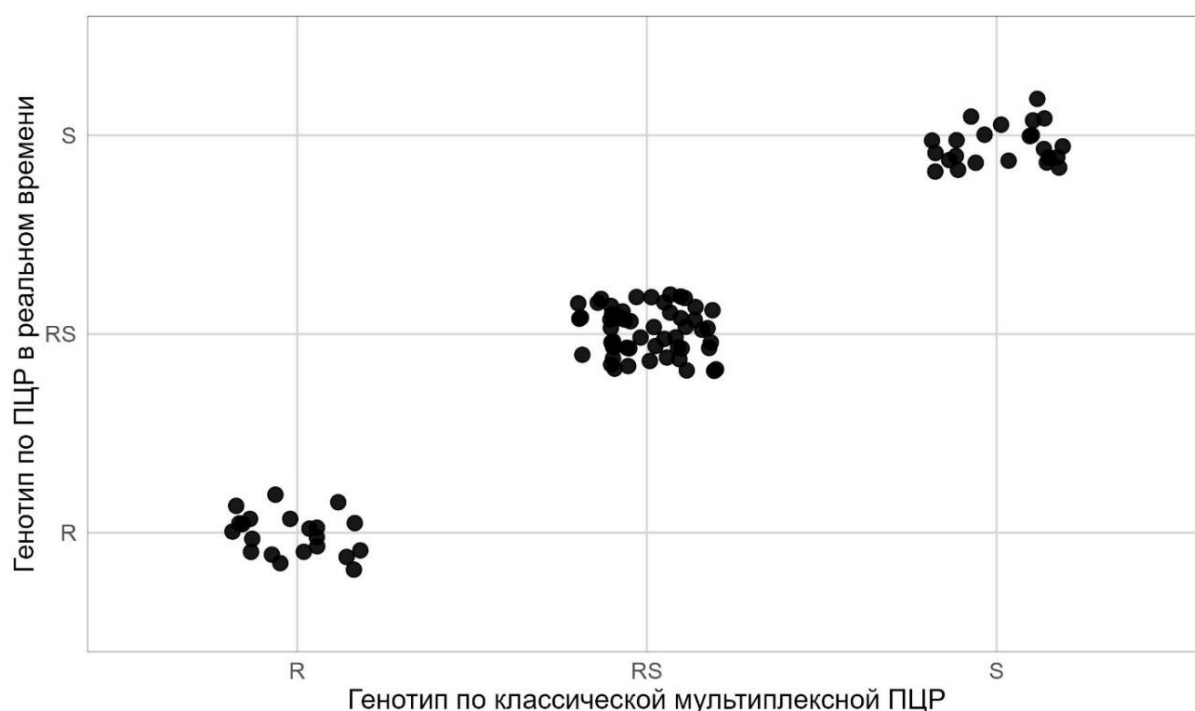


Рисунок 12 – Проверка согласованности результатов двух маркерных систем для растений F_2 ВК508 × ВК305 и F_2 ВК305 × ВК678-S; S – восприимчивая гомозигота; R – устойчивая гомозигота; RS – гетерозигота

Полная согласованность результатов по обеим маркерным системам позволяет рассматривать их как эквивалентные. Поэтому далее в тексте при анализе результатов этих гибридных комбинаций метод анализа уточняться не будет. Была проведена оценка соответствия наблюдаемого расщепления ожидаемому согласно теоретической модели 1:2:1 по критерию χ^2 , отдельно для каждой из гибридных комбинаций (таблица 13).

Таблица 13 – Распределение растений F_2 из двух гибридных комбинаций по генотипическим классам

Гибридная комбинация	Всего растений, шт.	Теоретически ожидаемое соотношение	Наблюдаемое соотношение, шт.	df	χ^2	P
BK508 × BK305	48	1:2:1	9:26:13	2	1,00	0,61
BK305 × BK678-S	50	1:2:1	12:28:10	2	0,88	0,64

Распределение растений по генотипическим классам в F_2 обеих гибридных комбинаций соответствовали теоретически ожидаемым, что позволяет перейти к анализу ассоциации генотипических групп со степенью поражения заразной расы G_{RU} (рисунок 13).

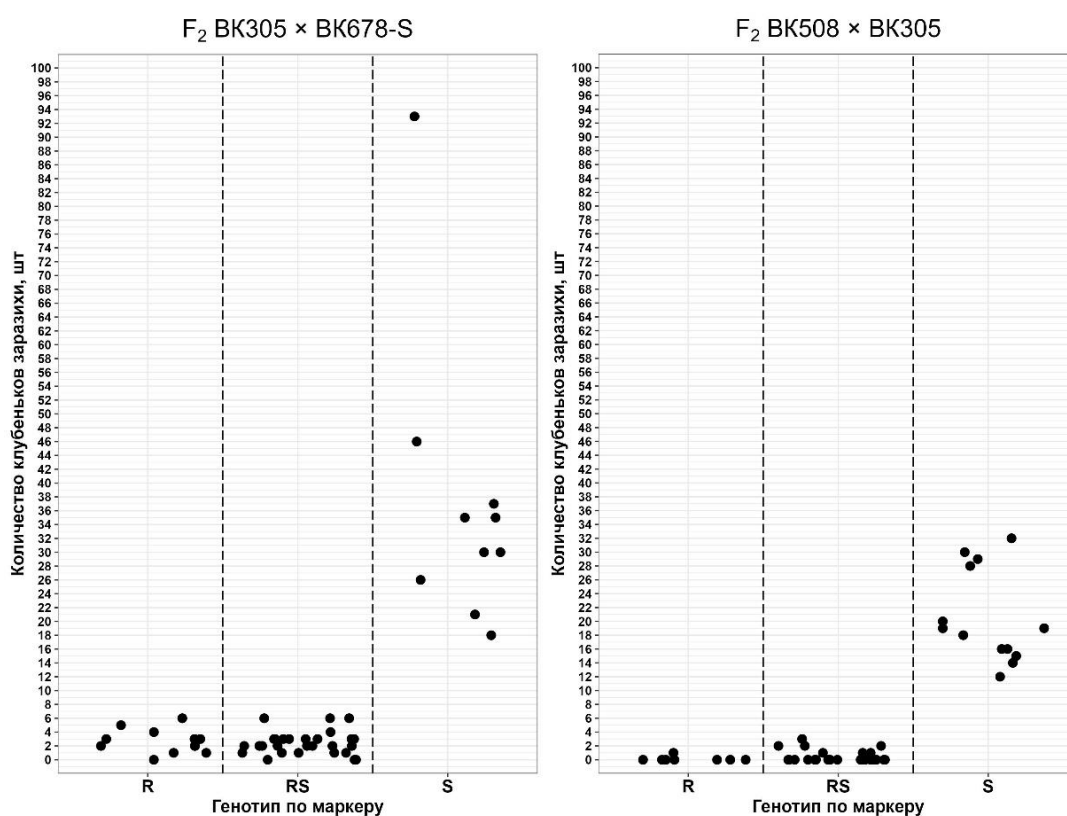


Рисунок 13 – Степень поражения растений подсолнечника расой G_{RU} зарази, выраженное в количестве клубеньков на корнях; S – восприимчивая гомозигота; R – устойчивая гомозигота; RS – гетерозигота.

При визуальном анализе данных было выдвинуто предположение о различиях в устойчивости не только в зависимости от генотипических групп, но также от комбинации скрещивания. Проверка предположения методом дисперсионного анализа (ANOVA) не являлась корректной вследствие неравенства дисперсий и ненормальности распределения остатков из-за присутствия в данных большой доли нулевых значений (полностью устойчивых растений подсолнечника).

Для решения этой задачи была выбрана модель с завышением нулей и отрицательным биномиальным распределением (Zero-Inflated Negative Binomial model, ZINB). Основания для выбора модели – зависимая переменная является счетными значениями; широкий диапазон неравномерной вариации от 0 до 46 с единичным значением 93 клубенька на растении; большая доля нулевых значений, что в совокупности не позволяет корректно использовать другие модели.

Модель состояла из двух частей: основная моделировала степень поражения растений с использованием отрицательно биномиального распределения, а дополнительная часть нулевого завышения учитывала вероятность появления дополнительных нулевых значений (полностью устойчивых растений). В основной части модели использовалась формула: влияние на зависимую переменную (количество клубеньков на растении) взаимодействия факторов «комбинация скрещивания» и «генотип по маркеру». Также в формуле был исключен перехват, поскольку ни один уровень фактора не рассматривался в качестве стандарта. В части нулевого завышения использовалась формула с одинаковой вероятностью нуля для всех наблюдений. Это обусловлено малым размером выборки, при котором включение дополнительных факторов приводило к проблемам сходимости.

Оценка параметра в модели нулевого завышения оказалась статистически незначимой ($P = 0,998$), что указывает на отсутствие необходимости рассматривать дополнительную причину формирования нулевых значений, другими словами – случаи полного отсутствия клубеньков (полностью

устойчивые растения), могут быть корректно объяснены различиями между генотипическими классами и комбинациями скрещивания.

Симуляционная проверка модели с помощью пакета «DHARMA» показала, что распределение стандартизированных остатков статистически значимо не отличалось от ожидаемого равномерного распределения (тест Колмогорова–Смирнова (KS test), $P = 0,263$); соблюдалось равенство дисперсий (Dispersion test, $P = 0,144$), выбросы отсутствовали (Outlier test, $P = 0,720$), наблюдаемая доля нулей не превышала ожидаемую (Zero-Inflation test, $P = 0,616$). В совокупности эти результаты показывают, что модель соответствует основным требованиям (рисунок 14).

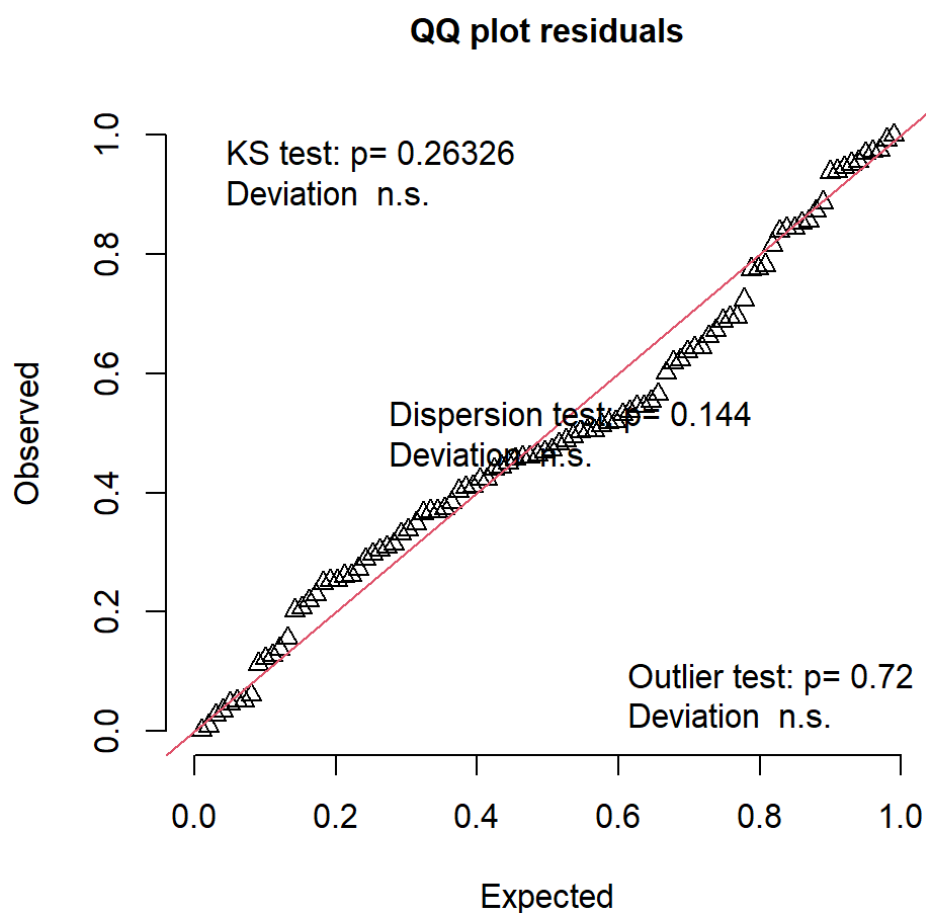


Рисунок 14 – Оценка соответствия распределения остатков теоретически ожидаемому

В результате построения модели были получены оценки коэффициентов и их статистической значимости для каждой комбинации факторов, выраженные в логарифмической шкале (β) (таблица 14)

Таблица 14 – Коэффициенты модели и средние значения фенотипа

Комбинация (Фактор А)	Генотип по маркеру (Фактор Б)	Лог-среднее (β)	Вероятность (P)
BK305×BK678-S	R	0,981	$1,12 \times 10^{-6}$
	RS	0,873	$2,26 \times 10^{-10}$
	S	3,614	$2,00 \times 10^{-16}$
BK508×BK305	R	-2,197	0,03
	RS	-0,773	0,01
	S	3,026	$2,00 \times 10^{-16}$

Все полученные коэффициенты статистически значимо отличались от нуля при уровне значимости 0,05, что означает существенное отклонение среднего значения степени поражения в основной части модели от 1 клубенька на растение для каждой комбинации факторов. Однако, обсуждаемые коэффициенты характеризуют каждую комбинацию факторов по отдельности и не предназначены для сравнений между собой. Поэтому для проверки значимости различий между комбинациями факторов были выполнены попарные сравнения маргинальных средних значений (estimated marginal means, EMMs) степени поражения, полученной из модели путем обратного преобразования из логарифмической шкалы. Для удобства интерпретации проведена группировка в зависимости от статистической значимости различий (таблица 15) и визуализация (рисунок 15).

Таблица 15 – Множественные сравнения средних значений количества клубеньков для комбинаций факторов

Комбинация скрещивания (Фактор А)	Генотип по маркеру (Фактор А)	Оценка маргинального среднего (ЕММ) шт. ($\exp(\beta)$)	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

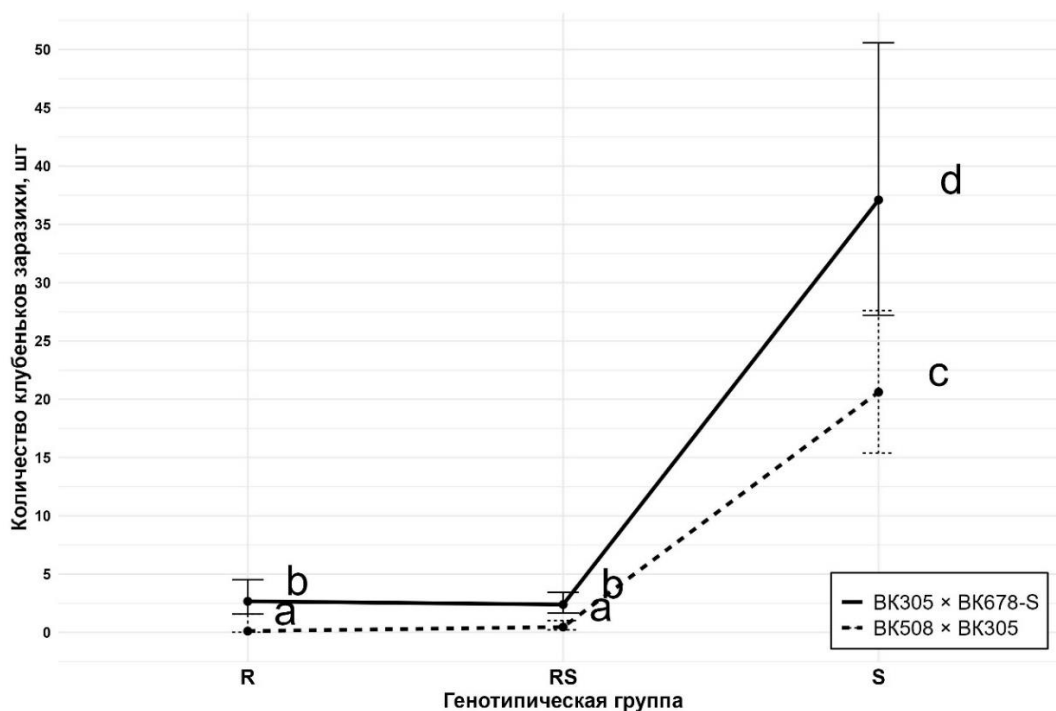


Рисунок 15 – Влияние комбинации скрещивания и аллельного состояния гена *HaOr7* на количество клубеньков зарази на корнях подсолнечника.

Одинаковые буквы означают отсутствие статистически значимых различий между вариантами. Точками отмечены оцененные маргинальные средние, усы отражают 95 % доверительные интервалы оцененных маргинальных средних (ЕММ), обратно преобразованных с логарифмической шкалы.

В результате математического анализа были установлены статистически значимые различия по среднему количеству клубеньков заразики на растение между комбинациями факторов. Всего выделено 4 группы: в первую вошли устойчивые гомозиготы и гетерозиготы комбинации скрещивания ВК508 × ВК305, во вторую группу, устойчивые гомозиготы и гетерозиготы комбинации ВК305 × ВК678-S, а в последние две группы вошли восприимчивые гомозиготы обеих комбинаций, где самой восприимчивой была ВК305 × ВК678-S. Это показывает сильное влияние устойчивого аллеля гена *HaOr7* на устойчивость подсолнечника к расе G_{RU} заразики.

Как видно из рисунка 15, комбинация ВК508 × ВК305 статистически значимо показала большую устойчивость к заразики чем ВК305 × ВК678-S, что соблюдается во всех генотипических группах. Одновременно с этим, внутри комбинаций скрещивания устойчивые гомозиготы и гетерозиготы значимо не отличались. Это может говорить об отсутствии эффекта неполного доминирования в изученных комбинациях скрещивания, однако ввиду малой выборки, для этого недостаточно оснований. Различия по степени поражения заразики разных комбинаций могут свидетельствовать о влиянии не только устойчивого аллеля гена *HaOr7*, но и влияния других генов устойчивости или совокупности генов организма – генетического фона. Другими словами, можно предположить, что не все линии являются одинаково хорошими реципиентами гена устойчивости. Таким образом, целесообразно вести массовый отбор растений с помощью разработанных маркеров, но с обязательной дальнейшей проверкой отобранных линий на искусственном инфекционном фоне. Также можно предположить, что даже при использовании в скрещиваниях одной и той же полностью устойчивой линии, полученные гибридные комбинации будут контрастными по устойчивости за счет вариаций генетического фона восприимчивых родительских компонент.

Для апробации разработанных маркеров в реальном селекционном процессе, маркер-вспомогательный отбор был внедрен в работу лаборатории генетики ФНЦ ВНИИМК. При помощи системы ДНК-маркеров для

классической ПЦР и ДНК-маркера для ПЦР в реальном времени были проанализированы 137 растений F₂ пяти гибридных комбинаций. Результаты, полученные с помощью обеих маркерных систем, полностью сошлись, поэтому далее они рассматриваются как эквивалентные (таблица 16).

Результат проверки соответствия наблюдаемого соотношения теоретически ожидаемому показал отсутствие статистически значимых отклонений во всех комбинациях скрещивания. Несмотря на то, что в некоторых комбинациях скрещивания выборка растений была недостаточна для надежной оценки, все значения Р были достаточно высокими ($\geq 0,49$) и не приближались к пороговому уровню значимости (0,05).

Таблица 16 – Распределение генотипов растений разных гибридных комбинаций в F₂ по результатам обеих маркерных систем

Номер делянки	Всего растений, шт.	Теоретически ожидаемое соотношение	Наблюдаемое соотношение, шт. (R:RS:S)	df	χ^2	Р
1073	38	1:2:1	9:19:10	2	0,05	0,97
1129	19	1:2:1	4:8:7	2	1,42	0,49
1217	18	1:2:1	4:9:5	2	0,11	0,94
24	46	1:2:1	12:21:13	2	0,39	0,82
27	16	1:2:1	3:9:4	2	0,38	0,83

Использование ДНК-маркеров открывает возможность отбора гомозиготных по устойчивому аллелю растений напрямую в F₂ для сокращения объема пересеваемого материала в среднем на 75 %. Однако, устойчивость к заразице является хоть и важным, но дополнительным признаком. К примеру, главной целевой характеристикой в одном из направлений селекционной работы являлся измененный состав жирных кислот в масле семян. По этой причине, после получения информации об аллельном состоянии гена *HaOr7* был проведен анализ жирнокислотного состава масла семян. Приоритет оценки образцов был скорректирован согласно информации по маркеру – в первую очередь были

проанализированы устойчивые гомозиготы, а восприимчивые гомозиготы исключались из оценки и дальнейшей работы. В результате в каждой комбинации скрещивания удалось отобрать гомозиготные устойчивые растения с подходящим жирнокислотным составом масла семян и перспективные гетерозиготные образцы для дальнейшей полевой оценки по другим селекционно-ценным признакам.

Для достижения аналогичного результата с использованием фенотипической оценки на искусственном зараженном фоне необходимо сначала получить поколение I_1 (F_3) – потомство всех самоопыленных растений F_2 . После этого высеять семена, полученные от каждого из самоопыленных растений на искусственный, зараженный семенами заразихи с преобладанием расы G_{RU} , фон и провести оценку фенотипической устойчивости. Растения, потомство которых не поразились заразихой – гомозиготны по устойчивому аллелю, а там, где наблюдалось расщепление – гетерозиготны. Таким образом, получить аналогичные результаты оценки можно после года ведения масштабной работы со всеми растениями из расщепляющихся популяций, как в поле, так и в условиях закрытого грунта с привлечением специалистов по фитопатологии.

Эксперимент по применению ДНК-маркеров в реальном селекционном процессе показал их высокую эффективность, что выражено в значительном сокращении трудозатрат селекционеров и специалистов по фитопатологии. Также к преимуществам такого подхода относится скорость получения результатов и одинаковая эффективность вне зависимости от типа биологического материала и фазы вегетации растений.

Всего в процессе валидации ДНК-маркеров в реальном селекционном процессе гибридного подсолнечника, с помощью маркер-вспомогательного отбора были созданы 5 новых селекционных линий, устойчивых к расе G_{RU} заразихи (таблица 17).

Таблица 17 – Описание новых селекционных линий, созданных с применением разработанных маркерных систем

№ деланки	Название линии	Описание
1073	ВК551-зу-лмру	Устойчивая к заразихе А-Г и ложной мучнистой росе
1129	ВК101-зу-лмру	Устойчивая к заразихе А-Г и ложной мучнистой росе
1217	ВК934-вс-зу	Устойчивая к заразихе А-Г, высокое содержание стеариновой кислоты в масле семян
24-25	ВК101-зу-во	Устойчивая к заразихе А-Г, высокое содержание олеиновой кислоты в масле семян
27	ВК101-вс-зу	Устойчивая к заразихе А-Г, высокое содержание стеариновой кислоты в масле семян

В результате проведенных исследований был разработан и валидирован новый ДНК-маркер для ПЦР в реальном времени. Показана полная согласованность результатов обеих разработанных маркерных систем и их ассоциация с признаком устойчивости подсолнечника к расе G_{RU} заразихи. Таким образом, установлено, что ранее изученный и обозначенный как Or_7 ген устойчивости к расе G_{RU} заразихи соответствует идентифицированному на молекулярном уровне гену *HaOr7*, кодирующему рецептороподобную киназу с лейцин-богатыми повторами (LRR-RLK). Также показаны различия в степени поражения разных гибридных комбинаций, несущих устойчивый аллель гена *HaOr7*, что говорит о влиянии генетического фона на фенотипическую устойчивость растений. Разработанные маркерные системы отвечают требованиям надежной экспресс оценки селекционного материала на устойчивость к заразихе расы G_{RU} . Система маркеров для классической ПЦР подходит для лабораторий, не оснащенных прибором для проведения ПЦР в реальном времени, а ДНК-маркер для ПЦР в реальном времени является более быстрым и эффективным аналогом. Обе маркерные системы были внедрены в практическую селекцию гибридного подсолнечника, где показали свою эффективность. В результате применения маркер-вспомогательного отбора созданы новые устойчивые к расе G_{RU} заразихи линии подсолнечника. В дальнейшем для данного гена другими исследователями были разработаны

альтернативные маркерные системы (Патент № 2851225 С1, 2025; Патент № 2850478 С1, 2025), при создании которых авторы ссылались на опубликованные результаты настоящего исследования (Савиченко и др. 2023). Также, параллельно, с помощью методов высокопроизводительного генотипирования были найдены SNP, ассоциированные с признаком устойчивости к расе G и локализующиеся в том же регионе хромосомы 7 что и ген *HaOr7*. Тем самым данный ген был повторно и независимо картирован и на основании этих данных запатентован способ определения устойчивости растений подсолнечника посредством проведения петлевой изотермической амплификации (Патент № 2823806 С1, 2023). Это дополнительно подтверждает актуальность, практическую значимость и востребованность полученных результатов.

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

Ранее в ФНЦ ВНИИМК был разработан и активно применяется селекционно-генетический метод борьбы с болезнью расы G в популяциях кондитерского подсолнечника (Хатнянский и др. 2023). Он заключается в переносе гена устойчивости – *Or₇* (*HaOr7*) от линии-донора в популяцию кондитерского подсолнечника путем однократного скрещивания и последующих возвратных скрещиваний с сортом-реципиентом. На каждом этапе скрещиваний проводят контроль устойчивости на искусственно созданном инфекционном фоне с преобладанием расы G_{RU} болезни. Благодаря такому подходу уже во втором цикле отмечается резкое увеличение устойчивости – с 29 до 44 % (Хатнянский и др. 2023). Однако данный подход имеет существенный недостаток, заключающийся в высокой трудоемкости фитопатологической оценки. Также принципиальным отличием селекции сортов-популяций от селекции гибридного подсолнечника является необходимость поддержания значительного уровня внутрисортного полиморфизма за счет опыления при свободном цветении. В связи с этим, в схеме селекционного процесса сортов кондитерского подсолнечника отсутствуют этапы самоопыления. Таким

образом, единственной возможностью для получения гомозиготной по гену устойчивости популяции выступает отбор. Однако, для генов с доминантным наследованием проведение такого отбора является сложной задачей. Единственный доступный подход – элиминация рецессивных гомозиготных генотипов. Однако, с каждым этапом скрещивания скорость снижения частоты встречаемости рецессивного аллеля в популяции падает, а вместе с ней и эффективность такого подхода. В конечном итоге, отсутствие возможности отбора доминантных гомозигот означает невозможность получения 100 % гомозиготной по гену устойчивости популяции при условии массового отбора при свободном цветении. Для решения данной проблемы были протестированы разработанные и прошедшие валидацию кодоминантные маркерные системы.

Оценка фенотипической устойчивости растений была проведена на искусственном инфекционном фоне заразики расы G_{RU} . Семена популяции F_5 $RG \times$ СПК плюс высевали в короба рядами по 15 семян в каждом. После всходов проводилось прореживание для обеспечения равномерности инфекционной нагрузки. На стадии первой пары настоящих листьев были удалены растения с признаками нарушения развития. Оставшиеся растения были пронумерованы. Среднее число оставшихся растений в рядке составило 6,2. В этой же фазе вегетации были отобраны образцы листовой ткани для выделения ДНК. На 27-й день вегетации растения были выкопаны, и проведен подсчет клубеньков заразики на корнях. Результаты оценки считали корректными на основании ожидаемо высокой степени поражения растений контрольного восприимчивого сорта ВНИИМК 8883 улучшенный (рисунок 16).

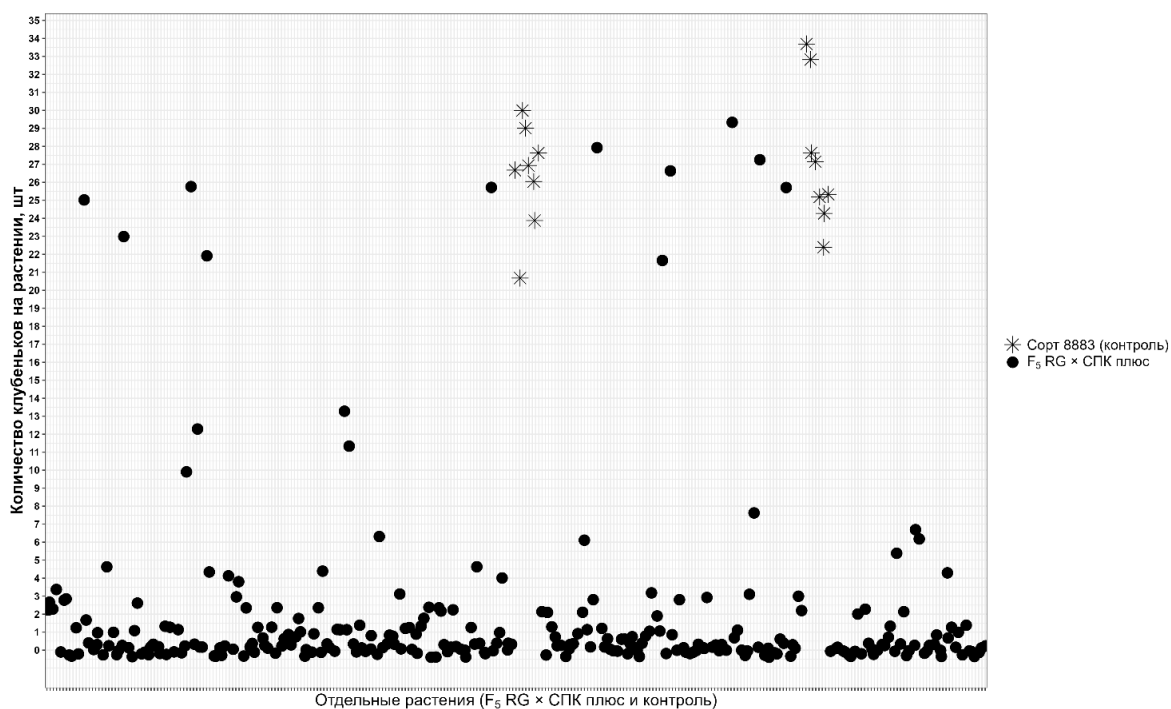


Рисунок 16 – Степень поражения растений F₅ RG × СПК плюс и контрольного сорта ВНИИМК 8883 улучшенный на искусственном инфекционном фоне заразили расы G_{RU}

По результатам фенотипической оценки на инфекционном фоне 11 растений изучаемой популяции показали степень поражения на уровне контроля – от 21 до 34 клубеньков заразили на корнях подсолнечника. У 18 растений показатель варьировал от 5 до 13 клубеньков. Остальные 244 растения показали высокую устойчивость к паразиту – от 0 до 4 клубеньков на растение.

При помощи обеих маркерных систем был определен генотип каждого из 273 растений изучаемой популяции по аллелям гена *HaOr7*. Гомозиготными по устойчивому аллелю *HaOr7* было 151 растение, а по восприимчивому аллелю – 11 растений, остальные 111 растений были гетерозиготами.

Независимо полученные данные о количестве клубеньков на корнях каждого растения были сопоставлены с информацией о его генотипе по гену *HaOr7* (рисунок 17, таблица 18).

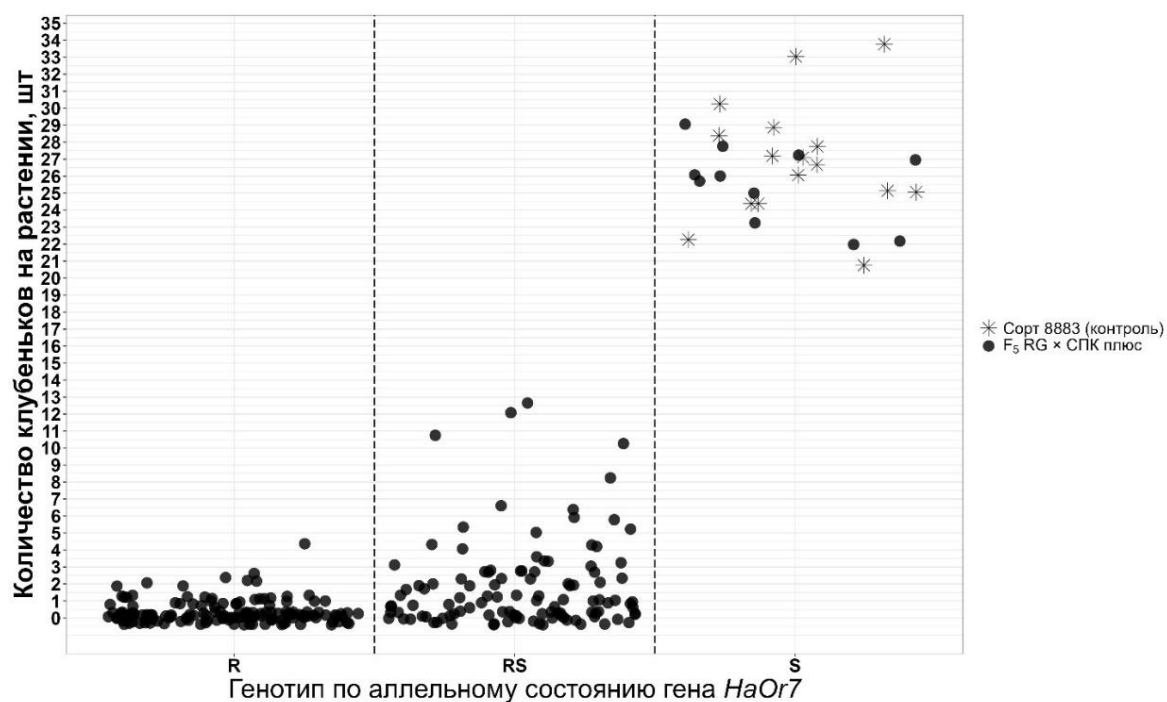


Рисунок 17 – Распределение растений в зависимости от фенотипа и генотипа по аллелям гена *HaOr7*; «R» – гомозигота по устойчивому аллелю, «S» – гомозигота по восприимчивому аллелю, «RS» – гетерозигота

Таблица 18 – Описательная статистика количества клубеньков для каждой группы растений подсолнечника

Параметры	Генотип		
	Устойчивая гомозигота (R)	Гетерозигота (RS)	Восприимчивая гомозигота (S)
Количество растений, шт (n)	151	111	11
	Количество клубеньков на растении, шт		
Среднее арифметическое	0,32	1,80	25,54
Стандартное отклонение (Sd)	0,65	2,59	2,34
Медиана	0	1	26
Минимум	0	0	22
Максимум	4	13	29
Асимметрия	2,53	2,23	-0,31
Экссесс	8,02	5,52	-1,34
Стандартная ошибка (SE)	0,05	0,25	0,71

Все гомозиготные по восприимчивому аллелю растения, показали восприимчивый фенотип со средней степенью поражения растений изучаемой популяции 25,54 клубенька на растение, что находится близко к степени поражения восприимчивого сорта – 26,88. Гомозиготные по устойчивому аллелю *HaOr7* растения проявили устойчивый фенотип со средним поражением 0,32 клубенька на растение. Гетерозиготные растения также характеризовались устойчивым фенотипом, но с большей средней степенью поражения – 1,80 клубенька на растение и наибольшим из всех групп размахом вариации – 13 клубеньков.

Класс растений, гомозиготных по аллелю дикого типа, отличалась отрицательной асимметрией и отрицательным эксцессом, что указывает на более плоское и симметричное распределение по сравнению с двумя другими классами и нормальным распределением. Высокая положительная асимметрия в группе гомозиготных по устойчивому аллелю растений – 2,53, указывает на то, что большая часть растений данной группы характеризуется показателем числа клубеньков ниже среднего (0,32) и является полностью устойчивыми с поражением 0 клубеньков заразили на растение. Одновременно с этим, высокий положительный эксцесс – 8,02 указывает на выраженную концентрацию наблюдений в области низких значений признака и наличие длинного правого хвоста распределения, однако размах признака составляет всего 4 клубенька. Такое низкое значение размаха вариации говорит о том, что такие растения считаются выбросами ввиду своей редкости относительно полностью устойчивых растений. В группе гетерозиготных растений данная тенденция сохраняется, но менее выражено.

Для проверки зависимости количества клубеньков от аллельного состояния гена *HaOr7* был проведен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и тест на нормальность остатков модели методом Шапиро-Уилка с помощью функции `shapiro.test` в программной среде R. Результаты теста показали, что остатки модели не следуют нормальному распределению ($W = 0,72578$; $P < 0,001$). Таким образом, значительное отклонение от нормального

распределения не позволило корректно провести дисперсионный анализ. Поэтому дальнейший анализ был проведен с использованием непараметрических тестов – теста Краскела-Уоллиса для оценки статистической значимости различий между генотипическими классами и теста Манна-Уитни для парных сравнений. По результатам теста Краскела-Уоллиса были обнаружены значимые различия между классами ($\chi^2 = 78,022$; $df = 2$; $P < 0,001$). Проведенный далее тест Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения методом Бонферрони дал следующие результаты (таблица 19).

Таблица 19 – Результаты попарных сравнений между генотипическими классами растений

Сравниваемый генотип 1	Сравниваемый генотип 2	Вероятность (P)
Устойчивая гомозигота (R)	Гетерозигота (RS)	< 0,001
Устойчивая гомозигота (R)	Восприимчивая гомозигота (S)	< 0,001
Гетерозигота (RS)	Восприимчивая гомозигота (S)	< 0,001

Все генотипические группы растений статистически значимо отличались друг от друга по фенотипу – количеству клубеньков заразили на растение при $\alpha = 0,05$. Различия в степени поражения между устойчивыми гомозиготами и гетерозиготами свидетельствуют о наличии эффекта неполного доминирования устойчивого аллеля гена *HaOr7*. Однако, при интерпретации различий важно анализировать не только общее изменение средней степени поражения, но и отдельные компоненты, составляющие эти изменения. Снижение среднего арифметического может происходить как за счет увеличения доли полностью устойчивых (нулевые значения), при равном среднем количестве клубеньков среди пораженных растений, так и из-за меньшего количества клубеньков у пораженных при неизменной доле полностью устойчивых растений. Первичный визуальный анализ графиков распределения позволяет предположить одновременную изменчивость обеих компонент. В связи с этим возникла необходимость в использовании статистических методов, позволяющих анализировать их раздельное влияние на показатель средней степени поражения.

Ранее в работе было показано, что нулевые значения (отсутствие поражения растений) обусловлены аллельным состоянием гена *HaOr7* и поэтому были рассмотрены как отдельный компонент признака, соответствующий полностью устойчивым растениям. Для изучения влияния двух генотипических групп (устойчивые гомозиготы и гетерозиготы) на проявление признака была использована двухкомпонентная Hurdle-модель с отрицательным биномиальным распределением. Первая компонента модели оценивала вероятность появления полностью устойчивых растений в зависимости от генотипической группы, принимая все нулевые значения как проявление влияния генотипа (аллельного состояния). Вторая компонента оценивала различия в количестве клубеньков заразики на корнях только пораженных растений.

Каждая из компонент Hurdle-модели была проверена отдельно с использованием пакета «DHARMA». Результаты для первой: тест на нормальное распределение стандартизированных остатков ($P = 0,587$), на равенство дисперсий ($P = 0,856$), и отсутствие выбросов ($P = 1,000$); для второй компоненты: тест на нормальное распределение стандартизированных остатков ($P = 0,054$), на равенство дисперсий ($P = 0,144$), и отсутствие выбросов ($P = 0,660$). Таким образом, по результатам симуляционной проверки не было выявлено нарушений, свидетельствующих о некорректности модели.

Проведенный анализ подтвердил наличие статистически значимых различий между классами устойчивых гомозигот и гетерозигот, как в вероятности появления полностью устойчивых растений ($z = 5,45$; $P < 0,001$), так и в количестве клубеньков заразики на корнях среди растений, подвергшихся поражению ($z = 4,96$; $P < 0,001$) (рисунок 18).

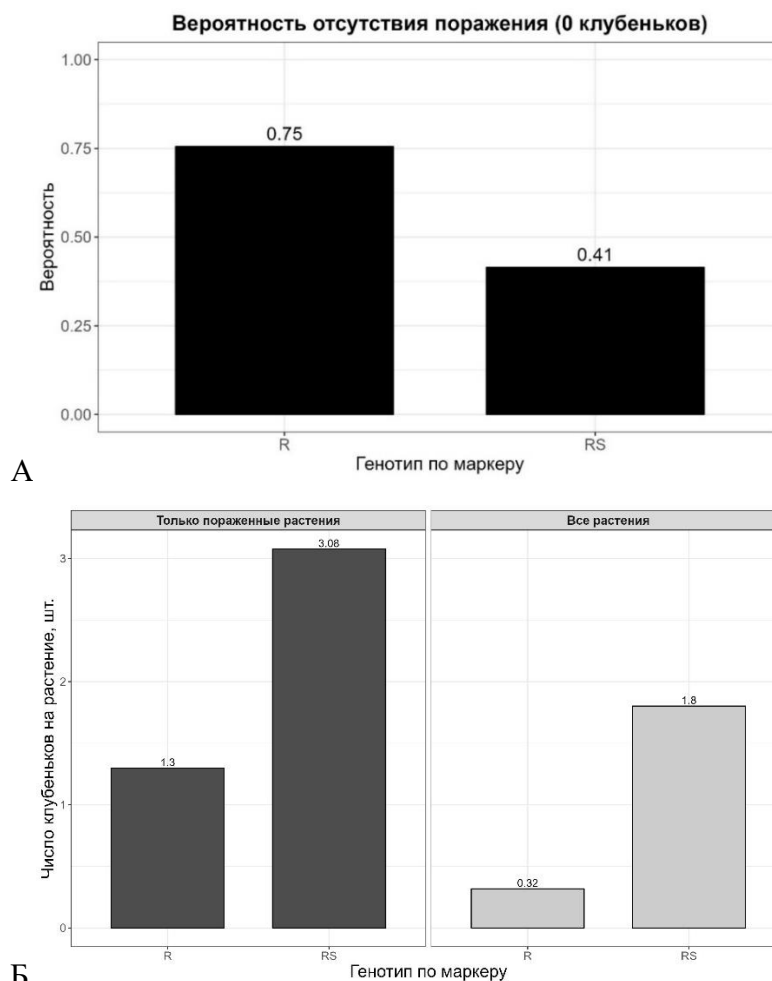


Рисунок 18 – Различия в степени поражения устойчивых гомозигот (R) и гетерозигот (RS) расой *G_{RU}* заразики. А – вероятность появления растений с полной устойчивостью. Б – среднее количество клубеньков заразики на корнях только пораженных растений и всех растений, включая полностью устойчивые

По результатам анализа Hurdle-модели установлено, что группа устойчивых гомозигот характеризовалась более высокой вероятностью (75 %) появления полностью устойчивых растений, чем группа гетерозигот (41 %) и, одновременно с этим, меньшим количеством клубеньков заразики на корнях пораженных растений – 1,3 шт. против 3,1 шт. у гетерозигот. Таким образом, было установлено неполное доминирование устойчивого аллеля *HaOr7* и 2 статистически значимых источника вариации средней степени поражения. В дополнение к этому, расчет коэффициента доминирования также показал, что эффект устойчивого аллеля *HaOr7* проявляется в форме неполного

доминирования ($h/d = 0,88$). При этом, гетерозиготы демонстрируют фенотип, близкий к устойчивым гомозиготам.

Для количественной оценки различий между двумя генотипическими классами – устойчивыми гомозиготами и гетерозиготами были вычислены размеры эффектов (effect size) по каждой из компонент признака: (1) доля полностью устойчивых растений и (2) количество клубеньков заразики на корнях пораженных. Различия между генотипическими классами по доле устойчивых растений и оценивали с использованием коэффициента Cohen's h , основанного на оценке вероятностей отсутствия поражения в сравниваемых группах, с помощью функции ES.h из пакета «pwr». Полученное значение коэффициента $h = 0,71$, согласно Cohen (1988), соответствует среднему размеру эффекта (от 0,50), приближающимся к большому (0,80).

Для оценки различий в количестве клубеньков заразики использовали только пораженные (> 0 клубеньков) растения двух генотипических групп: устойчивых гомозигот и гетерозигот. Размер эффекта рассчитывали с использованием коэффициента Hedges' g , который является скорректированной оценкой стандартизованного различия между классами. Полученное значение $g = 0,46$ соответствует малому размеру эффекта, близкому к пороговому значению среднего эффекта (0,5). При включении в анализ всех растений обеих сравниваемых генотипических групп, коэффициент составил $g = 0,80$, что соответствует большому эффекту.

Таким образом, было установлено, что статистически значимое снижение степени поражения устойчивых гомозигот, по сравнению с гетерозиготами, обусловлено совокупным вкладом как повышения доли полностью устойчивых растений, так и уменьшения количества клубеньков заразики на корнях пораженных растений. Это указывает на то, что эффект устойчивого аллеля гена *HaOr7* проявляется одновременно в двух компонентах устойчивости, каждая из которых имеет средний размер эффекта, а обе в совокупности – большой.

С помощью комбинации маркер-вспомогательного отбора и фенотипической оценки было выявлено 114 гомозиготных полностью

устойчивых растений, из которых было отобрано 66 для пересадки в индивидуальные сосуды и получения семян в условиях свободного цветения.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что 5 ранее проведенных циклов отбора на искусственном инфекционном фоне привели к тому, что всего 4,0 % растений из популяции характеризовались восприимчивым фенотипом (на уровне контроля), 6,6 % имели промежуточную степень поражения (5–13 клубеньков на растение), а 30,8 и 58,6 % растений показали слабое поражение и полную устойчивость к расе G_{RU} заразики, соответственно. Однако, несмотря на эффективность данного метода, дальнейшее повышение устойчивости популяции с его помощью является затруднительным. Причиной этого является сама суть метода, которая заключается в отборе фенотипически устойчивых растений. Оценить эффективность такого подхода можно рассмотрев доли гетерозигот среди прошедших отбор растений (рисунок 19).

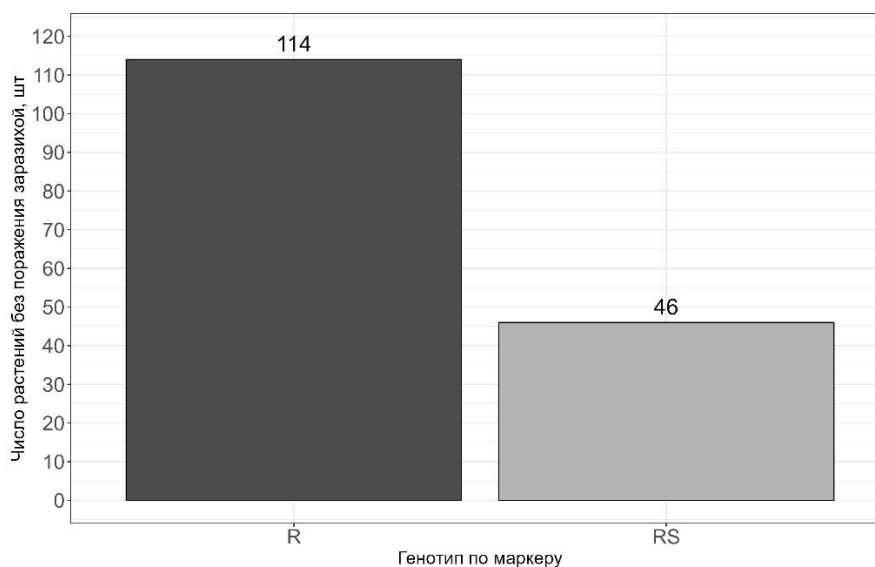


Рисунок 19 – Распределение полностью устойчивых к расе G_{RU} заразики растений подсолнечника по аллельному состоянию гена *HaOr7*; «R» – гомозигота по устойчивому аллелю, «RS» – гетерозигота.

Из 160 растений, полностью устойчивых к расе G_{RU} заразики (со степенью поражения 0 клубеньков), 46 были гетерозиготными, что составляет 28,8 %. При условии их отбора и случайного скрещивания при свободном цветении в

следующем поколении по закону Харди-Вайнберга ожидаемые частоты генотипов в популяции – 73,2 % устойчивых гомозигот, 24,5 % гетерозигот и 2,1 % восприимчивых гомозигот в сравнении с частотами 55,3, 40,7 и 4,0 % соответственно, в изученном поколении. Кроме того, поскольку полностью устойчивые растения фенотипически не отличаются, то при отборе только части растений в новую выборку, существует вероятность случайного повышения доли гетерозигот, что приведет к повышению частот рецессивного аллеля и, как следствие, восприимчивых гомозигот в следующем поколении и утрате прогресса в создании устойчивой популяции. Таким образом, использование такого подхода является наиболее эффективным на первых этапах селекционного процесса, но в совокупности с высокой трудоемкостью оценки становится менее экономически целесообразным с каждым циклом отбора.

Применение ДНК-маркера, позволяющего определить аллельное состояние гена устойчивости, открывает возможность получить гомозиготную по целевому гену популяцию за один цикл отбора после скрещивания с донором устойчивости. Однако необходимо учитывать, что моногенные признаки, такие как вертикальная устойчивость к патогенам или толерантность к гербицидам, являются второстепенными характеристиками при создании кондитерских сортов подсолнечника. Главное внимание уделяется таким селекционно-ценным признакам как: урожайность, лужистость и масса 1000 семян. Признак «масса 1000 семян» характеризуется тем, что поддерживается в гетерогенной популяции подсолнечника и имеет тенденцию к сильному снижению при скрещивании с линиями или самоопылении (Лукомец и др., 2022). Поэтому, несмотря на имеющуюся возможность получить устойчивую популяцию от скрещивания с донором уже в поколении F_2 , перед проведением отбора гомозиготных по гену устойчивости растений необходимо выполнить достаточное количество возвратных скрещиваний с участием большой выборки растений для обеспечения генетического разнообразия в популяции. Маркер-вспомогательный отбор на этих этапах также будет иметь высокую эффективность, так как может применяться для контроля наличия гена на

протяжении нескольких лет без использования оценки на искусственном инфекционном фоне. Однако, на завершающих этапах селекционного процесса необходимо провести фенотипическую оценку реальной устойчивости и финальный отбор полностью устойчивых к заразице гомозиготных по гену устойчивости субпопуляций с лучшими хозяйственно-ценными признаками.

Таким образом, было установлено влияние устойчивого аллеля гена *HaOr7* на среднюю степень поражения растений из популяции кондитерского подсолнечника. Показано, что снижение средней степени поражения обусловлено совокупностью повышения вероятности появления полностью устойчивых растений и снижения количества клубеньков заразицы у пораженных растений. Разработанные маркерные системы показали высокую эффективность в селекции устойчивых к заразице расы G_{RU} сортов подсолнечника. Рекомендуется использование маркерных систем для проведения массового отбора в процессе создания субпопуляций и последующая финальная оценка лучших на искусственном инфекционном фоне. Объединение двух методик отбора растений подсолнечника на устойчивость к расе G_{RU} заразицы значительно повысит эффективность селекционного процесса кондитерских сортов подсолнечника.

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

В предыдущей части работы было показано, что устойчивость к расе G_{RU} заразицы в высокой степени обусловлена наличием устойчивого аллеля гена *HaOr7*. Однако данные выводы основаны на результатах изучения только селекционного материала ФНЦ ВНИИМК, что не позволяет исключить существование альтернативных генетических детерминант вертикальной устойчивости к расе G_{RU} заразицы у коммерческих гибридов подсолнечника других селекционных компаний, разрешенных к выращиванию в Российской Федерации. В связи с этим актуальной задачей является изучение

распространенности устойчивого аллеля гена *HaOr7* среди коммерческих гибридов, возделываемых на территории РФ.

Был изучен 71 гибрид подсолнечника 12 различных оригинаторов. Сведения об устойчивости гибридов к заразице взяты с открытых источников, преимущественно с официальных интернет-ресурсов селекционных организаций. Несмотря на отсутствие валидации устойчивости путем фенотипирования, используемая информация позволяет проанализировать позиционирование гибридов по устойчивости к заразице самими оригинаторами. Особого внимания заслуживает маркировка устойчивости к расам А–G⁺ и ее связь с аллельным состоянием гена *HaOr7*.

Все изученные гибриды были оценены с помощью как ДНК-маркера для ПЦР в реальном времени, так и системы ДНК-маркеров для классической ПЦР (рисунок 20)

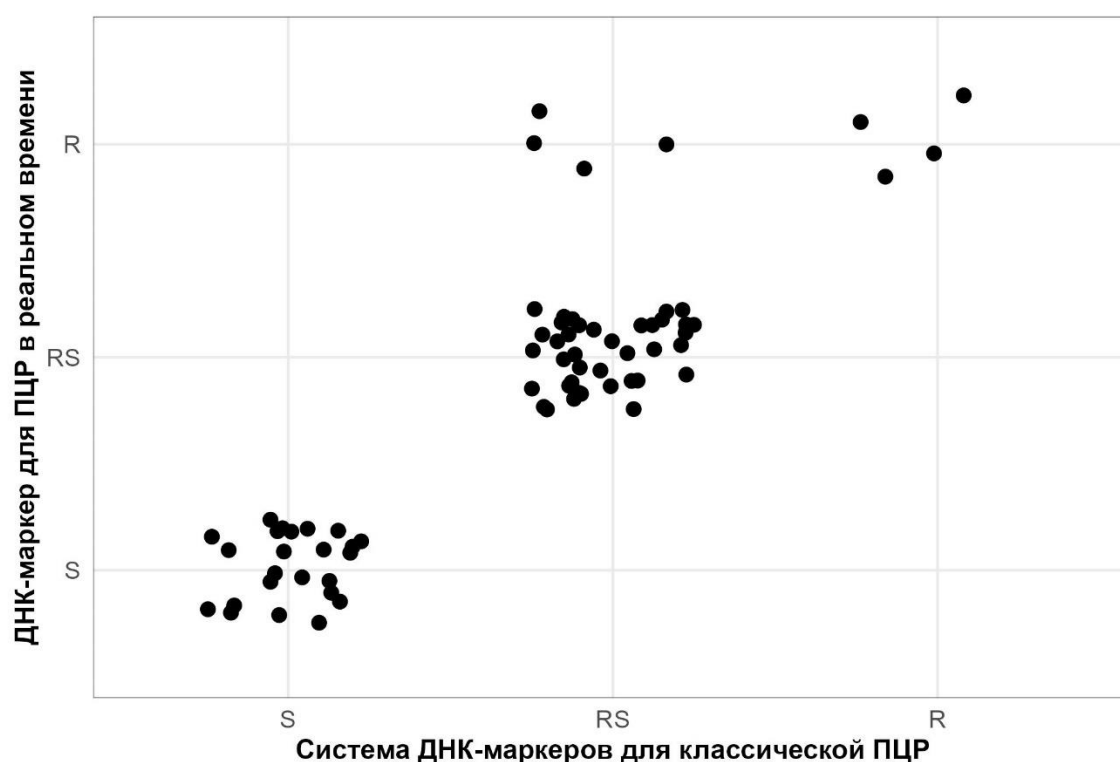


Рисунок 20 – Соотношение результатов оценки 71 коммерческого гибрида подсолнечника по разным маркерным системам

Результаты, полученные с помощью обеих маркерных систем, сошлись для 67 из 71 исследованного гибрида. Четыре гибрида: Суоми, Генезис, Новамис и Целсо были определены как устойчивые гомозиготы по ДНК-маркеру для ПЦР в реальном времени, а по системе ДНК-маркеров для классической ПЦР как гетерозиготы. Таким образом, речь идет о «выпадении» восприимчивого аллеля по маркеру для ПЦР в реальном времени. Это, в совокупности с ранее полученными данными, свидетельствует о наличии в генофонде подсолнечника не менее трех разных восприимчивых аллелей гена *HaOr7*, отличающихся последовательностью нуклеотидов. Один из них наиболее распространен и соответствует последовательности, представленной в референсном геноме подсолнечника NanXRQr2.0-SUNRISE. Второй аллель несет линия ВК678, что было установлено отсутствием амплификации маркера SORS1. Третий аллель несут гибриды Суоми, Генезис, Новамис и Целсо, что выражалось в отсутствии амплификации ДНК-маркера для ПЦР в реальном времени. Аллели у линии ВК678 и этих гибридов не идентичны, так как ДНК-маркер для ПЦР в реальном времени показывал амплификацию восприимчивого аллеля у данной линии, в отличие от гибридов. Также не исключено, что таких аллелей может быть значительно больше.

Были определены две основных причины отсутствия флуоресцентного сигнала восприимчивого аллеля у ДНК-маркера для ПЦР в реальном времени. Первая причина – полиморфизм последовательности нуклеотидов в зоне гибридизации праймеров, приводящий к отсутствию амплификации, а вторая – полиморфизм в последовательности участка посадки флуоресцентного зонда.

Для устранения причин и исправления этого недостатка была разработана новая пара праймеров, специфичных восприимчивому аллелю *HaOr7*, для секвенирования методом Сэнгера. Полученные данные о нуклеотидной последовательности будут использованы для доработки или разработки дополнительного флуоресцентного зонда, комплементарного второму восприимчивому аллелю *HaOr7* или доработки фланкирующих праймеров.

Несмотря на выявленное ограничение, данный маркер можно использовать в большинстве задач практической селекции, не сопряженных с анализом неизвестных генотипов, без риска получения ложных результатов. В качестве примера можно рассмотреть анализ расщепляющейся популяции F_2 . В случае, если восприимчивая родительская форма имела «невидимый» маркером аллель, будет одновременно наблюдаться как полное отсутствие флуоресцентного сигнала у части образцов, так и исчезновение целого класса гетерозигот. Аналогично этому, при анализе популяций, полученных в результате возвратных скрещиваний F_1 с реципиентом устойчивости, первая половина образцов покажет отсутствие флуоресцентного сигнала, а вторая будет определена как устойчивые гомозиготы, при ожидаемом результате – 50 % гетерозигот и 50 % восприимчивых гомозигот. Таким образом, в случаях, предполагающих определенный паттерн распределения генотипов, его нарушение будет явно заметно, из чего следует возможность применения данного маркера без риска получения скрытых недостоверных результатов. В свою очередь, для задач, предполагающих изучение неизвестных образцов, необходимо использовать систему ДНК-маркеров для классической ПЦР, для которой, на данный момент, не было выявлено подобного недостатка.

На фоне существования обширного генофонда сельскохозяйственных культур, интенсивности селекционного процесса и обмена генетическим материалом, следует признать невозможность достижения абсолютной надежности ДНК-маркеров. Даже функциональные маркеры, имеющие в своей основе мутации, непосредственно приводящие к проявлению признака, нельзя назвать надежными на 100 %. Несмотря на то, что это самый точный тип маркеров, все же существует вероятность возникновения дополнительных точечных мутаций в зонах гибридизации праймеров, что может привести к отсутствию амплификации даже уникального мутантного аллеля. Но самой уязвимой частью таких маркеров является вторая компонента – маркер аллеля дикого типа. Это обусловлено тем, что разнообразие аллелей дикого типа в природе остается неизвестным. Исходя из этого, невозможно предсказать

работоспособность маркера для всех существующих аллелей дикого типа. В рамках работы со стабильным селекционным материалом и в рамках одной селекционной компании риск является контролируемым за счет предварительного скрининга всей коллекции. Однако при расширении генетического разнообразия за счет образцов из генетических банков, других селекционных центров или стран возрастает вероятность обнаружения других аллелей гена с отличающимися нуклеотидными последовательностями. Это может привести к некорректной работе маркера и ошибочным результатам анализа.

Отдельную группу риска представляют собой сцепленные с признаком маркеры. Даже низкая вероятность рекомбинации маркера с целевым геном в рамках одного-двух поколений значительно возрастает при многократном размножении и, как следствие, удалении от донора целевого гена, что в конечном итоге приводит к потере сцепления. В таких случаях маркер полностью теряет селекционную (предсказательную) ценность.

Исходя из описанных причин, оптимальной стратегией для всех ДНК-маркеров, участвующих в маркер-вспомогательной селекции, является предварительный скрининг коллекции с помощью маркера и сопоставление результатов с фенотипической оценкой, а также анализ родительских форм перед оценкой потомства. Эти подходы позволят минимизировать риски интерпретационных ошибок и обеспечат наибольшую достоверность результатов в рамках маркер-вспомогательной селекции.

Ввиду выявленного недостатка ДНК-маркера для ПЦР в реальном времени, данные по аллельному состоянию гена *HaOr7* представлены согласно системе ДНК-маркеров для классической ПЦР (рисунок 21).

A-E		A-F		A-G		A-G+	
Воллкан КЛП	S	ЛГ 50479 CX	RS	П 64 ЛЕ 25	S	ЕС Аргентик СУ	RS
Имидор	S	Целсо	RS	ЕС Аркадия СУ	RS	Волльф	RS
Интерстеллар	S			Баско	RS	ЕС Белфис	RS
Конквест	S			Генезис	RS	Макстор	RS
Кречет	S			Дункан КЛП	RS	П 64 ЛЦ 108	RS
MAC 82.A	S			ЕС Андромеда	RS	СИ Левис	RS
MAC 87.A	S			ЕС Ароматик	RS	СИ Честер	RS
Mac 80 IP	S			ЕС Артик	RS	Таллиман	R
Mac 83 P	S			ЕС Белла	RS		
Mac 85 СУ	S			ЕС Бесана	RS		
Mac 92 КП	S			ЕС Ниагара	RS		
Мугли	S			ЕС Новамис	RS		
НК Брио	S			ЕС Старбелла	RS		
НК Неома	S			ЕС Электрик	RS		
П 63 ЛЕ 10	S			ЛГ 5400 ХО	RS		
П 64 ЛЛ 155	S			ЛГ 5452 ХО КП	RS		
П 64 ХЕ 118	S			ЛГ 5580	RS		
П 64 ХЕ 144	S			ЛГ 59580	RS		
СИ Таленто	S			MAC 880.CY	RS		
Субаро НТС	S			MAC 96.П	RS		
Тутти	S			Марисан	RS		
Фаусто	S			Орфео	RS		
Экселент	S			П 64 ЛЕ 137	RS		
				П 64 ЛЕ 20	RS		
				П 64 ЛП 130	RS		
				П 64 ЛП 140	RS		
				Романтик	RS		
				СИ Авенджер	RS		
				СИ Арко	RS		
				СИ Катана	RS		
				СИ Розета	RS		
				СИ Эдисон	RS		
				Серджио	RS		
				Сузука НТС	RS		
				Суоми	RS		
				НС × 6054	R		
				Суматра НТС	R		
				Эпсилон	R		

Рисунок 21 – Соотношение аллельного состояния гена *HaOr7* и информации оригинаторов гибридов об устойчивости к болезням. Информация о гибридах представлена в приложении 5.

Среди 24 гибридов, гомозиготных по восприимчивому аллелю *HaOr7*, только гибрид П64ЛЕ25 заявлен оригинатором как устойчивый к расам болезни выше Е. Среди гетерозигот два гибрида охарактеризованы как устойчивые к расам А–F, 34 гибрида к А–G, а семь гибридов к А–G+. Как устойчивые гомозиготы определены четыре гибрида, среди которых один заявлен как устойчивый к расам А–G+, а остальные к А–G. Таким образом, можно сказать, что устойчивый аллель гена *HaOr7* присутствует во всех устойчивых к расам выше Е гибридах подсолнечника за исключением гибрида П64ЛЕ25, который несет ген *Or_{SH}*. В отличие от *HaOr7*, данный контролирует постгаусториальную устойчивость, что проявляется не в отсутствии поражения а ограничении развития паразита на поздних этапах, начиная со стадии формирования клубеньков, что снижает его вредоносность.

Наиболее распространенными среди устойчивых являются гетерозиготные гибриды. Это можно объяснить меньшей сложностью их создания – введением гена устойчивости только в линию-восстановитель фертильности. В то время как создание гомозиготного гибрида требует введение гена одновременно в ЦМС-линию и линию-закрепитель стерильности. Одновременно с этим, данный ген имеет высокий коэффициент доминирования, что может быть основанием считать незначительной разницу в устойчивости между гомозиготным и гетерозиготным генотипом.

На данный момент нет общепринятых линий-дифференциаторов для рас выше G. Для рассмотрения этой проблемы можно привести в пример недавнее исследование, проведенное Kaundun et al. (2024) при участии компании Syngenta. В нем: «в качестве дифференциаторов были использованы 5 гибридов: Гибрид 1 без какого-либо известного гена устойчивости и восприимчивого ко всем оцененным популяциям заразики; Гибрид 2, устойчивый к расам А-Е (ген устойчивости *Or₅*); Гибрид 3, устойчивый к расам А-Е (*Or₇*); Гибрид 4, устойчивый к расам А-Е (*Or₅* и *Or₇*); и Гибрид 5 (*Or₅*, *Or₇* и другие неизвестные гены устойчивости), устойчивый к популяциям заразики, которые более агрессивны, чем раса G» Линией-дифференциатором к расе F в данном исследовании выступила инбредная линия Р96, которая входит международно-принятый набор. Популяции заразики были представлены разным происхождением и вирулентностью: Севилья, Испания (SP-SE1); Тулча, Румыния (RO-TU1 и RO-TU2) и Драма, Греция (GR-DRA) были охарактеризованы как раса G+. Популяции из Хасковской области, Болгария (BU-HAS) и Орестиады, Греция (GR-ORE) были отнесены к расе G; а популяция SP-SE2 (Севилья, Испания) к расе F (рисунок 22).

GENOTYPE	SP-SE2	BU-HAS	RO-TU2	SP-SE1	RO-TU1	GR-ORE	GR-DRA
Hybrid 1	21.3 ± 1.0	16.8 ± 1.0	4.3 ± 0.7	20.2 ± 1.3	10.3 ± 0.9	17.0 ± 1.6	14.6 ± 1.5
Hybrid 2	20.8 ± 1.4	19.3 ± 1.2	5.8 ± 0.7	16.0 ± 0.9	14.7 ± 1.4	14.2 ± 1.0	18.4 ± 1.5
Hybrid 3	0.0	6.7 ± 1.5	12.0 ± 0.9	20.4 ± 1.4	13.0 ± 0.8	2.7 ± 0.8	12.8 ± 1.3
Hybrid 4	0.0	0.0	3.5 ± 1.4	8.8 ± 0.9	10.3 ± 0.7	0.0	5.3 ± 0.4
Hybrid 5	0.0	0.0	0.0	6.3 ± 0.6	9.5 ± 0.8	0.0	0.0
P96	0.0	5.0 ± 0.6	7.0 ± 1.0	0.0	1.4 ± 0.4	21.2 ± 1.4	26.0 ± 1.3
RACE	F	G	G+	G+	G+	G	G+

Рисунок 22 – Среднее количество прикреплений заразики из 7 разных популяций с различной вирулентностью и происхождением у шести гибридов и линий подсолнечника (данные Kaundun et al., 2024)

При анализе этих данных видно отсутствие прямых закономерностей между степенью поражения гибридов 1–5 и линии P96, которые были использованы для дифференциации рас заразики. Так, популяция SP-SE1, отнесенная к G+ поражала самый устойчивый Гибрид 5, но не поражала линию-дифференциатор к расе F – P96, что повторилось также для популяции RO-TU1 (G+), но выражалось не в полной устойчивости, а самой низкой степени поражения среди всех генотипов. Напротив, для популяций из Греции, чей расовый состав изучался в рассматриваемом исследовании, проблем с определением не возникло. Популяция GR-ORE слабо поражала Гибрид 3 (*Or*₇) и совсем не поражала Гибриды 4 и 5, что позволило отнести ее к расе G. В свою очередь популяция GR-DRA не поражала только Гибрид 5 и была определена как G+. Степень поражения линии P96 был выше, чем у восприимчивого Гибрида 1, что не согласуется с результатами, полученными на популяциях G и G+ из других стран.

Отдельной темой для дискуссии является характеристика гибридов, используемых для дифференцирования рас заразики. В особенности интересен Гибрид 5, отличие которого от Гибрида 4, по мнению авторов исследования, заключается в «и другие неизвестные гены устойчивости» («and other unknown resistance genes»). Тем временем, именно эта разница и отличает устойчивость к расе G от G+. Таким образом, на данный момент не существует надежного способа идентификации популяций заразики с обозначением расы G+. Такое

название скорее носит прикладной характер, отражая частные случаи преодоления устойчивости некоторых гибридов подсолнечника, устойчивых к расе G, подчеркивая повышенную устойчивость гибридов, отнесенных к группе устойчивости A–G⁺, и одновременно с этим, характеризуя разницу в вирулентности различных популяций заразики.

Эти данные согласуются с результатами наших исследований, в ходе которых были выявлены различия в степени поражения растений F₂, полученных от скрещивания одного и того же донора гена *Or₇* (*HaOr7*) и разных восприимчивых линий-реципиентов. Из них также можно бы сделать вывод, что более устойчивая гибридная комбинация несет «другие неизвестные гены устойчивости», другими словами, неопределенный генетический фон, который играет значимую роль в проявлении повышенной устойчивости. В дополнение к этому, можно предположить, что данный генетический фон может являться не только генами горизонтальной устойчивости, но и генами, ассоциированными с общей жизнеспособностью растения и, как следствие, более эффективным противодействием паразиту. Так или иначе, селекция гибридов, устойчивых к G⁺ заключается в передаче генов вертикальной устойчивости, в первую очередь *Or₇*, что можно проконтролировать с помощью ДНК-маркеров, в том числе разработанных в рамках данной работы, и дальнейшей фитопатологической оценки для поиска лучших по устойчивости фенотипов. Также, разработанные маркерные системы открывают новые возможности для изучения влияния генетического фона на фенотипическую устойчивость к заразики, так как позволяют контролировать аллельное состояние основного гена вертикальной устойчивости.

Проведенный в настоящей работе скрининг гибридов, возделываемых на территории РФ, показал, что все устойчивые гибриды к расам с большей вирулентностью чем у расы E, несли устойчивый аллель *HaOr7* (*Or₇*), что также полностью согласуется с данными, приведенными в рассмотренной в статье Kaundun et al. (2024), где Гибрид 3, несущий ген *Or₇* был дифференциатором к расе F. В свою очередь Гибрид 4, который выступал дифференциатором к расе

G, был описан как несущий гены *Or₇* и *Or₅*, что может трактоваться как причина повышенной устойчивости. Это может косвенно указывать на возможный дополнительный вклад сочетания данных генов в формирование более высокого уровня устойчивости, в том числе вследствие вероятного аддитивного эффекта или эпистатического взаимодействия. Однако, в настоящее время отсутствуют опубликованные данные, подтверждающие связь эффекта взаимодействия данных генов с повышением устойчивости к расам заразики с вирулентностью выше чем у расы F. Напротив, в статье, посвященной изучению гена *HaOr5* (*Or₅*) указано, что растения, несущие данный ген проявляют устойчивость только к расе E, а на инфекционном фоне заразики рас F и G показывают степень поражения на уровне восприимчивого контроля или выше (Pubert et al., 2024). В связи с этим, необходимы дальнейшие исследования влияния пирамидирования генов *Or₇* и *Or₅* и других известных и актуальных генов – *Or_{deb2}*, *Or_{anom1}*, *Or_{SH}* и *Or_{ab-vl-8}* на устойчивость к высоковирулентным расам заразики.

Таким образом, благодаря разработанным маркерным системам, было показано, что почти все гибриды подсолнечника, охарактеризованные оригинаторами, как устойчивые к расам заразики выше E, несут устойчивый аллель гена *HaOr7*. Исключением был гибрид П64ЛЕ25, несущий ген пост-гаусториальной устойчивости *Or_{SH}*. Тем самым установлено, что основным геном, контролирующим устойчивость подсолнечника к расе G_{RU}, является ген *HaOr7*, кодирующий рецептороподобную киназу с лейцин-богатыми повторами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе решена актуальная задача определения молекулярно-генетического контроля устойчивости к расе G_{RU} заразики, преобладающей на территории Российской Федерации. Установлено, что устойчивость к данной расе у исследованных генотипов подсолнечника контролируется геном *HaOr7*, локализованным на 7-й хромосоме, который является ранее описанным геном *Or7*. Показано, что данный ген несут 46 изученных коммерческих гибрида подсолнечника, которые охарактеризованы как устойчивые к расам заразики с вирулентностью выше расы E, и отсутствует во всех 24 восприимчивых, за исключением гибрида П64ЛЕ25, который несет ген пост-гаусториальной устойчивости *Or_{SH}*. Это указывает на широкое использование гена *HaOr7* в селекции и потенциальную уязвимость современных гибридов к появлению новых вирулентных патотипов заразики. Для снижения рисков преодоления устойчивости патогеном необходимо проводить исследования по вовлечению в селекцию на устойчивость к заразики других генов устойчивости и их пирамидированию с использованием маркер-вспомогательного отбора.

В результате исследования разработаны и валидированы две внутригенные маркерные системы для идентификации аллелей гена *HaOr7*: система ДНК-маркеров для классической мультиплексной ПЦР (Патент № 2830955 С1, 2024) и ДНК-маркер для ПЦР в реальном времени (Патент № 2851468 С1, 2025). Для обеих систем подтверждена высокая надежность, воспроизводимость и статистически значимая ассоциация с признаком устойчивости на селекционном материале и в расщепляющихся популяциях F_2 . Установлена высокая степень согласованности результатов двух маркерных систем, что позволяет использовать их в селекционной практике в зависимости от технического оснащения лаборатории и задач анализа. Вместе с тем показано, что при анализе части коммерческих гибридов результаты двух маркерных систем могут различаться вследствие отсутствия амплификации восприимчивого аллеля в

системе для ПЦР в реальном времени. Данный эффект объясняется наличием в генофонде подсолнечника не менее трех восприимчивых аллелей гена *HaOr7*, различающихся последовательностью нуклеотидов. Один из них соответствует последовательности, представленной в референсном геноме HanXRQr2.0-SUNRISE, второй выявлен у линии ВК678, третий – у четырех коммерческих гибридов. Это указывает на то, что при использовании материала с широким генетическим разнообразием необходимо проводить предварительный анализ материала с помощью системы ДНК-маркеров для классической мультиплексной ПЦР и классического гибридологического анализа. Эти подходы позволят минимизировать риск интерпретационных ошибок, связанных с разнообразием восприимчивых аллелей *HaOr7*, и повысить точность отбора в селекционном процессе.

Установлено, что фенотипическое проявление устойчивости, контролируемой геном *HaOr7*, зависит не только от наличия устойчивого аллеля, но и от его генотипического состояния, а также от генетического фона. Показан эффект неполного доминирования данного гена, проявляющийся у гетерозигот в снижении доли полностью устойчивых растений и увеличении степени поражения по сравнению с гомозиготами по устойчивому аллелю. Также выявлено влияние комбинации скрещивания на степень поражения растений подсолнечника заразой, что указывает на значимую роль генетического фона в формировании фенотипической устойчивости.

Разработанные маркерные системы успешно внедрены в селекционный процесс ФНЦ ВНИИМК и использованы для маркер-вспомогательного отбора устойчивых форм подсолнечника. Показано, что в селекции сортов подсолнечника на устойчивость к заразе в условиях свободного цветения применение ДНК-маркеров является необходимым условием для получения популяции, нерасщепляющейся по признаку. С использованием разработанных маркеров созданы 5 новых линий подсолнечника, устойчивых к расе G_{RU} заразы, а также получена гомозиготная по устойчивому аллелю *HaOr7* популяция кондитерского подсолнечника.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что ген *HaOr7*, локализованный на 7-й хромосоме генома подсолнечника, кодирующий рецептороподобную киназу с лейцин-богатыми повторами, идентичен ранее описанному гену *Or7* и контролирует устойчивость подсолнечника к расе G_{RU} заразики, 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 в популяциях F₂ установлена статистически значимая ассоциация аллельного состояния *HaOr7* с устойчивостью к расе G_{RU} заразики ($P < 0,001$), 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} заразики. 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 заразики 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} заразице, 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 ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ПОНЯТИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

Фенотипическая устойчивость – отсутствие развития заразики на растении подсолнечника, установленное по результатам искусственного заражения в контролируемых условиях;

Вирулентность заразики – способность особей или популяций *Orobancha cymana* Wallr. преодолевать определенную генетическую устойчивость подсолнечника;

Популяция заразики – совокупность особей *O. cymana* определенного происхождения, которая может быть однородной или неоднородной по вирулентности;

Биотип – группа особей *O. cymana*, отличающаяся от других групп одним или несколькими устойчиво проявляющимися биологическими признаками;

Патотип – биотип *O. cymana*, отличающийся характерным спектром или уровнем вирулентности относительно определенных генотипов подсолнечника;

Раса заразики – совокупность популяций *O. cymana*, характеризующихся одинаковым спектром вирулентности относительно набора генотипов-дифференциаторов подсолнечника;

Линия-дифференциатор – инбредная линия подсолнечника с известной генетической устойчивостью и используемая для определения вирулентности и расовой принадлежности популяций заразики;

Инбредная линия – генетически выровненная линия, полученная в результате многократного инбридинга и характеризующаяся высокой степенью гомозиготности;

Генотип-дифференциатор – более широкое понятие чем «линия-дифференциатор», включающее в себя инбредные линии, гибриды и сорта-популяции подсолнечника;

Скрининг – массовая целенаправленная процедура выявления среди исследуемого материала объектов с заданными признаками на основе их оценки по установленным критериям;

Раса G_{RU} заразики – обобщенное обозначение популяций *O. citana*, классифицируемых как раса G и распространенных в Российской Федерации;

Ген Or_7 – ген устойчивости к расе G_{RU} заразики, наличие и наследование которого ранее были установлены на основании фенотипической оценки и гибридологического анализа;

Ген $HaOr7$ – ген подсолнечника, кодирующий рецептороподобную киназу с лейцин-богатыми повторами (LRR-RLK), локализованный на 7-й хромосоме генома подсолнечника и контролирующей устойчивость к заразику F из Испании;

Валидация маркерной системы – комплексная проверка и подтверждение пригодности маркерной системы для практического применения, включающие оценку ее информативности, точности, воспроизводимости, повторяемости и соответствия результатов генотипирования фенотипическим данным

Кодоминантный ДНК-маркер – маркер, позволяющий идентифицировать аллельное состояние исследуемого локуса и различать гомозиготы и гетерозиготы;

Аллельное состояние – состав аллелей определенного локуса/гена в генотипе растения;

Гомозиготное состояние – генотип растения по определенному локусу/гену, при котором в растении присутствует два одинаковых аллеля гена;

Гетерозиготное состояние – генотип растения по определенному локусу/гену, при котором в растении присутствует два разных аллеля гена;

Генетический фон – совокупность всех генов и аллельных сочетаний генотипа, за исключением целевого локуса, которые могут влиять на фенотипическое проявление исследуемого признака;

Степень поражения заразой – в данной работе количественная характеристика развития паразита на растениях подсолнечника, выражаемая через число клубеньков заразики на корнях подсолнечника;

Полностью устойчивое растение – в данной работе растение подсолнечника без клубеньков заразили на корнях при искусственном заражении;

п.н. – пар нуклеотидов;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ПЦР в реальном времени – полимеразная цепная реакция с регистрацией накопления продукта в процессе амплификации.;

ФНЦ ВНИИМК – Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта»;

ЦМС – цитоплазматическая мужская стерильность;

Rf – гены-восстановления фертильности;

FAO – Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций;

LRR-RLK – рецептороподобная киназа с лейцин-богатыми повторами;

QTL – локус количественного признака;

SSR – Simple Sequence Repeats, микросателлитный локус;

SNP – Single Nucleotide Polymorphism, однонуклеотидный полиморфизм;

SCAR – Sequence Characterized Amplified Region, последовательность, характеризующая амплифицированную область;

MAS – Marker-Assisted Selection, маркер-вспомогательный отбор;

NCBI – National Center for Biotechnology Information, Национальный центр биотехнологической информации;

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool, алгоритм поиска сходных участков нуклеотидных или аминокислотных последовательностей;

BSA-seq – Bulk Segregant Analysis Sequencing, анализ объединенных выборок особей с контрастным фенотипом из расщепляющейся популяции с использованием секвенирования;

GBS – Genotyping-By-Sequencing, генотипирование путем секвенирования;

in silico – компьютерный анализ/моделирование.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

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 С1 Российская Федерация, МПК А01Н 1/04, С12Q 1/68. Система внутригенных ДНК-маркеров для детекции в растениях подсолнечника доминантного и рецессивного аллелей гена *HaOr7*, контролирующего устойчивость к расе G заразихи (*Orobanche cumanica* 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 C1HGEV.

2. Патент № 2851468 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/6895. Внутригенный ДНК-маркер для ПЦР в реальном времени, предназначенный для идентификации аллелей гена *HaOr7*, контролирующего устойчивость подсолнечника к расе G заразихи (*Orobanche cumanica* 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, 01–03 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 заразики 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 заразики (*Orobanchе cumanа* 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимова, И. Н. Область пониженной рекомбинации группы сцепления 13 подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) включает кластеры генов восстановления фертильности (*Rfl*) и устойчивости (*Pl*) к ложной мучнистой росе / И. Н. Анисимова, Н. В. Алпатьева, О. Н. Воронова [и др.] // Генетика. – 2023. – Т. 59, № 5. – С. 530–543. – DOI 10.31857/S0016675823050028. – EDN FNMMXS.
2. Анискина, Ю. В. Технология генетической идентификации линий и гибридов подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) на основе мультиплексного микросателлитного анализа / Ю. В. Анискина, О. С. Колобова, Н. С. Велишаева [и др.] // Биотехнология. – 2025. – Т. 41, № 6. – С. 128–139. – DOI 10.56304/S0234275825060031
3. Антонова, Т. С. Новые расы возбудителя ложной мучнистой росы подсолнечника на Северном Кавказе / Т. С. Антонова, Н. М. Арасланова, М. В. Ивебор [и др.] // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2006. – № 1(134). – С. 18–23.
4. Антонова, Т. С. Скрининг образцов культурного и дикорастущего подсолнечника на устойчивость к расе G заразихи (*Orobanchе cumanа* Wallr.), распространяющейся на юге России / Т. С. Антонова, Н. М. Арасланова, Е. А. Стрельников [и др.] // Наука Кубани. – 2016. – № 3. – С. 4–12.
5. Антонова, Т. С. К вопросу о расовой структуре некоторых популяций заразихи (*Orobanchе cumanа* Wallr.), паразитирующей на подсолнечнике в России и Румынии / Т. С. Антонова, Е. А. Стрельников, Н. М. Арасланова // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2015. – № 3(163). – С. 9–15.

6. Антонова, Т. С. К вопросу о засоренности полей в регионах РФ семенами заразихи (*Orobanchе сumana* Wallr.) - облигатного паразита подсолнечника / Т. С. Антонова, Н. М. Арасланова, С. Л. Саукова [и др.] // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2022. – № 4. – С. 29–32. – DOI 10.31857/2500-2082/2022/4/29-32
7. Антонова, Т. С. Расовая принадлежность семян заразихи (*Orobanchе сumana* Wallr.), собранных на полях разных регионов РФ в 2019 году / Т. С. Антонова, Н. М. Арасланова, Ю. В. Питинова // Аграрная наука. – 2020. – № 6. – С. 62–65. – DOI 10.32634/0869-8155-2020-339-6-62-65.
8. Арасланова, Н. М. Определение расовой принадлежности изолятов ржавчины (*Puccinia helianthi* Schwein.), поражающей подсолнечник в некоторых регионах России / Н. М. Арасланова, М. В. Ивебор, Т. С. Антонова [и др.] // Масличные культуры. – 2019. – № 4(180). – С. 107–112. – DOI 10.25230/2412-608X-2019-4-180-107-112.
9. Бейлин И. Г. Расовый состав *O. сumana* Wallr. на подсолнечнике: отчет о работе за 1940 год. – Краснодар : ВНИИМК, 1940. – С. 623–635.
10. Бейлин И. Г. Физиологические расы паразитов, их теоретическое и практическое значение // Памяти академика А. А. Рихтера. Труды Института физиологии растений АН СССР – М.-Л. : изд-во АН СССР, 1948. – Т. 6. – № 2. – С. 58–62.
11. Бочковой, А. Д. Кондитерский подсолнечник: происхождение, история введения в культуру, систематика, направления в селекции и особенности технологии возделывания (обзор) / А. Д. Бочковой, В. И. Хатнянский, В. А. Камардин [и др.] // Масличные культуры. – 2020. – № 3(183). – С. 129–146. – DOI 10.25230/2412-608X-2020-3-183-129-146.
12. Антонова, Т. С. Заразиха на подсолнечнике / Т. С. Антонова. – Краснодар : Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур им. В.С. Пустовойта, 2018. – 60 с. – ISBN 978-5-93491-781-5.
13. Гаврилова, В. А. Линии генетической коллекции подсолнечника ВИР, устойчивые к ложной мучнистой росе / В. А. Гаврилова, Т. Г. Ступникова,

- Л. Г. Макарова [и др.] // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2021. – Т. 182, № 3. – С. 101–110. – DOI 10.30901/2227-8834-2021-3-101-110. – EDN IPINEW.
14. Гучетль, С. З. Генетический анализ устойчивости к расе G *Orobanchе cumana* Wallr. в F₂ и BC₁ линий подсолнечника RGP1, RGP2, RGB, RGL1, RGL2 / С. З. Гучетль, Т. С. Антонова, Н. М. Арасланова [и др.] // Масличные культуры. – 2019. – № 4(180). – С. 23–28. – DOI 10.25230/2412-608X-2019-4-180-23-28.
15. Гучетль, С. З. Генетическое разнообразие линий подсолнечника российской селекции, выявленное с помощью анализа микросателлитных локусов / С. З. Гучетль, А. В. Головатская, С. А. Рамазанова, А. А. Волошко // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2023. – Т. 24, № 2. – С. 173–186. – DOI 10.30766/2072-9081.2023.24.2.173-186. – EDN JQGWMY.
16. Гучетль, С. З. Новые доноры устойчивости подсолнечника к расе G заразихи: изучение наследования признака / С. З. Гучетль, Т. С. Антонова, Н. М. Арасланова [и др.] // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2018. – № 4(176). – С. 3–8. – DOI 10.25230/2412-608X-2018-4-176-3-8.
17. Гучетль, С. З. Характеристика Rf-линий подсолнечника коллекции ВНИИМК с помощью микросателлитных маркеров ДНК / С. З. Гучетль, Е. Д. Логинова, И. В. Рябовол [и др.] // Масличные культуры. – 2024. – № 1(197). – С. 17–23. – DOI 10.25230/2412-608X-2024-1-197-17-23.
18. Гучетль, С. З. Наследование устойчивости к расе G заразихи (*Orobanchе cumana* Wallr.) у новых линий подсолнечника / С. З. Гучетль, Т. С. Антонова, Н. М. Арасланова [и др.] // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2019. – № 80. – С. 104–108. – DOI 10.21515/1999-1703-80-104-108.
19. Гучетль, С. З. Генетический контроль устойчивости к расе G заразихи (*Orobanchе cumana* Wallr.) у линии подсолнечника RG / С. З. Гучетль,

- Т. С. Антонова, Т. А. Челюстникова [и др.] // Наука Кубани. – 2017. – № 2. – С. 13–20. – EDN XZLYDZ.
20. Демурин, Я. Н. Передача гена устойчивости к имидазолиноновым гербицидам в селекционный материал подсолнечника во ВНИИМК / Я. Н. Демурин, А. А. Перстенева // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2007. – № 2(137). – С. 18–22.
 21. Жданов Л. А. Итоги селекционной работы по масличным культурам на Дону // Достижения отечественной селекции. М. : Колос. С. – 1967. – С. 231–242.
 22. Жданов Л.А. Подсолнечник и зарази́ха // Бюл. Сессии ВАСХНИЛ. – Воронеж, 1933. – С. 12–15.
 23. Ивебор, М. В. К вопросу о возбудителях альтернариоза подсолнечника / М. В. Ивебор, Т. С. Антонова, С. Л. Саукова // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2013. – № 1(153-154). – С. 90–100.
 24. Купцов А. И. Подсолнечник // М.-Л. : Госсельхозиздат. – 1931.
 25. Лакин Г. Ф. Биометрия : учеб. пособие для биол. спец. вузов / Г. Ф. Лакин. – Москва : Высшая школа, 1990. – 352 с.
 26. Лебедева, М. А. Молекулярно-генетические основы устойчивости подсолнечника к зарази́хе / М. А. Лебедева, М. С. Ганчева, М. Р. Лосев [и др.] // Физиология растений. – 2023. – Т. 70, № 5. – С. 451–460. – DOI 10.31857/S0015330323600158.
 27. Лукомец, В. М. Современные сорта и технологии возделывания крупноплодного (кондитерского) подсолнечника / В. М. Лукомец, М. В. Трунова, В. И. Хатнянский [и др.]. – Краснодар : ООО «Просвещение-Юг», 2022. – 59 с. – ISBN 978-5-93491-912-3.
 28. Лукомец, В. М. Современные тренды селекционно-генетического улучшения сортов и гибридов подсолнечника во ВНИИМК /

- В. М. Лукомец, М. В. Трунова, Я. Н. Демури́н // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2021. – Т. 25, № 4. – С. 388–393. – DOI 10.18699/VJ21.042.
29. Маркин, Н. В. Определение информативных ДНК-маркеров гена *Rfl* – восстановителя фертильности пыльцы ЦМС РЕТ1 подсолнечника / Н. В. Маркин, Т. В. Усатенко, А. В. Усатов [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4. – С. 280.
 30. Морозов В. К. Спутник солнца // Саратов : Приволжское книжное изд-во. – 1964. – 79 с.
 31. Панченко А. Я. Ранняя диагностика зарази́хоустойчивости при селекции и улучшающем семеноводстве подсолнечника // Вестник сельскохозяйственной науки. – 1975. – № 2. – С. 107–115.
 32. Патент № 2823806 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, А01Н 1/00. Способ определения устойчивости растений подсолнечника однолетнего к зарази́хе кумской расы G: № 2023117635 : заявл. 04.07.2023 : опубл. 30.07.2024 / С. В. Болдырев, Е. У. Мартынова, Р. Ф. Губаев, А. И. Чернова ; заявитель Публичное акционерное общество «Татнефть» имени В. Д. Шашина. – EDN QNCUYG.
 33. Патент № 2850478 С1 Российская Федерация, МПК А01Н 1/02, С12Q 1/68. Способ выявления аллелей гена *HaOr7*, связанных с устойчивостью и восприимчивостью подсолнечника к зарази́хе подсолнечника : заявл. 28.11.2024 : опубл. 12.11.2025 / М. Г. Дивашук, П. Ю. Крупин, Г. И. Карлов [и др.] ; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии».
 34. Патент № 2851225 С1 Российская Федерация, МПК А01Н 1/04, С12N 5/04. Способ определения устойчивости подсолнечника к зарази́хе подсолнечника : заявл. 10.04.2025 : опубл. 21.11.2025 / М. Г. Дивашук, П. Ю. Крупин, Г. И. Карлов [и др.] ; заявитель ООО "НПО «Семеноводство Кубани».

35. Перетягина, Т. М. Сорт декоративного подсолнечника Жемчужный / Т. М. Перетягина, О. М. Борисенко, Я. Н. Демуриной // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2018. – № 1(173). – С. 114–115. – DOI 10.25230/2412-608X-2018-1-173-114-115. –
36. Фонопсис – опасная болезнь подсолнечника / В. Т. Пивень, С. Г. Бородин, И. И. Шуляк [и др.] // Защита и карантин растений. – 2013. – № 7. – С. 30–34.
37. Плачек Е.М. К вопросу об иммунитете подсолнечника // Маслобойно-жировое дело. – 1928. – 3. – С. 29–34.
38. Пустовойт В. С. Основные направления селекционной работы // Подсолнечник. М. : Колос. – 1975. – С. 153–163.
39. Пустовойт В.С. Краткий обзор работ с масличным подсолнечником за период 1912–1925 гг. // Труды Кубано-Черноморского НИИ и селекционной станции «Круглик». – КубСХИ, 1926. – Вып. 38. – 16 с.
40. Пустовойт В.С. Результаты работ ВНИИМК по селекции подсолнечника // Селекция и семеноводство. – 1937. – С. 12–20.
41. Пустовойт В.С. Селекция подсолнечника // В кн. : Агротехника и селекция масличных культур. – М., 1939. – С. 75–87.
42. Пустовойт В.С. Селекция подсолнечника // В кн.: Подсолнечник. – Краснодар, 1940. – С. 7–43.
43. Пустовойт Г. В. Межвидовая гибридизация как метод селекции подсолнечника на групповой иммунитет // Генетика. – 1966. – №. 1. – С. 59.
44. Пустовойт Г. В. Селекция подсолнечника на групповой иммунитет методом межвидовой гибридизации // Подсолнечник. – М.: Колос. – 1975. – С. 164–209.
45. Роцин А. М. Изучение расового состава заразики в связи с селекцией подсолнечника // Отчет ВНИИМК. – 1940. – С. 301–334.
46. Сафонова, И. В. База данных генетических ресурсов коллекции озимой ржи Вир как средство классификации генетического разнообразия, анализа истории коллекции и эффективного изучения и сохранения /

- И. В. Сафонова, Н. И. Аниськов, В. Д. Кобылянский // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 23, № 6. – С. 150–156. – DOI 10.18699/VJ19.552.
47. Федеральная служба государственной статистики (Росстат). Сельское хозяйство в России. Официальные статистические данные за 2025 год [Электронный ресурс]. 2026. URL: <https://rosstat.gov.ru/> (дата обращения: 02.03.2026).
48. Хатнянский, В. И. История селекции подсолнечника в России на устойчивость к заразахе (обзор) / В. И. Хатнянский // Масличные культуры. – 2020. – № 3 (183). – С. 147–156. – DOI 10.25230/2412-608X-2020-3-183-147-156.
49. Хатнянский, В. И. Селекционно-генетический метод борьбы с заразахой расы G из популяции кондитерского подсолнечника / В. И. Хатнянский, Т. С. Антонова, А. А. Децына [и др.] // Защита и карантин растений. – 2023. – № 4. – С. 40–42.
50. Хлесткина, Е. К. Генетические ресурсы России: от коллекций к биоресурсным центрам / Е. К. Хлесткина // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2022. – Т. 183, № 1. – С. 9–30. – DOI 10.30901/2227-8834-2022-1-9-30.
51. Abdel-Rahem, M. Heterosis for seed, oil yield and quality of some different hybrids sunflower / M. Abdel-Rahem, T. H. A. Hassan, H. A. Zahran // Oilseeds and Fats, Crops and Lipids. – 2021. – Vol. 28. – P. 25. – DOI 10.1051/ocl/2021010.
52. Akhtouch, B. Genetic study of recessive broomrape resistance in sunflower / B. Akhtouch, L. Del Moral, A. Leon [et al.] // Euphytica. – 2016. – Vol. 209, No. 2. – P. 419–428. – DOI 10.1007/s10681-016-1652-z.
53. Akhtouch, B. Inheritance of resistance to race F of broomrape in sunflower lines of different origins / B. Akhtouch, J. Munoz-Ruz, J. Melero-Vara [et al.] // Plant Breeding. – 2002. – Vol. 121, No. 3. – P. 266–268. – DOI 10.1046/j.1439-0523.2002.00701.x.

54. Alcántara, E. Effects of broomrape parasitism on sunflower plants: growth, development, and mineral nutrition / E. Alcántara, M. Morales-García, J. Díaz-Sánchez // Journal of Plant Nutrition. – 2006. – Vol. 29, No. 7. – P. 1199–1206.
55. Al-Khatib, K. Imazethapyr resistance in common sunflower (*Helianthus annuus*) / K. Al-Khatib, J. R. Baumgartner, D. E. Peterson [et al.] // Weed Science. – 1998. – Vol. 46, No. 4. – P. 403–407. – DOI 10.1017/S0043174500090809.
56. Allinne, C. Genetic control of physiological traits associated to low temperature growth in sunflower under early sowing conditions / C. Allinne, P. Maury, A. Sarrafi [et al.] // Plant Science. – 2009. – Vol. 177, No. 4. – P. 349–359. – DOI 10.1016/j.plantsci.2009.07.002.
57. Alonso, L. C. Chemical control of broomrape (*Orobanche cernua* Loeffl.) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) resistant to imazethapyr herbicide / L. C. Alonso, M. I. Rodríguez-Ojeda, J. E. Fernández-Escobar [et al.] // Helia. – 1998. – Vol. 21. – P. 45–53.
58. Altschul, S. F. Basic local alignment search tool / S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller [et al.] // Journal of Molecular Biology. – 1990. – Vol. 215, No. 3. – P. 403–410. – DOI 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
59. Aly, R. Gene silencing of mannose 6-phosphate reductase in the parasitic weed *Orobanche aegyptiaca* through the production of homologous dsRNA sequences in the host plant / R. Aly, H. Cholakh, D. M. Joel [et al.] // Plant Biotechnology Journal. – 2009. – Vol. 7, No. 6. – P. 487–498. – DOI 10.1111/j.1467-7652.2009.00418.x.
60. Aly, R. Broomrape (*Orobanche cumana*) control in sunflower (*Helianthus annuus*) with imazapic / R. Aly, Y. Goldwasser, H. Eizenberg, [et al.] // Weed Technology. – 2001. – Vol. 15, No. 2. – P. 306–309.
61. Amiteye, S. Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding / S. Amiteye // Heliyon. – 2021. – Vol. 7, No. 10. – P. e08093. – DOI 10.1016/j.heliyon.2021.e08093.

62. Amri, M. Detection of the parasitic plant, *Orobanche cumana* on sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Tunisia / M. Amri, Z. Abbès, S. Ben Youssef [et al.] // African Journal of Biotechnology. – 2012. – Vol. 11, No. 18. – P. 4163–4167. – DOI 10.5897/AJB11.3031.
63. Antonova, T. S. Evolution of *Orobanche cumana* Wallr. in intensive sunflower cultivation in regions of Russian Federation / T. S. Antonova, N. Araslanova, M. Iwebor, S. Saukova // Proceedings of the 5th International Symposium on Broomrape in Sunflower, Antalya, Turkey, 1–3 November 2023. – 2023. – P. 49–58.
64. Antonova, T. S. The history of interconnected evolution of *Orobanche cumana* Wallr. and sunflower in the Russian Federation and Kazakhstan / T. S. Antonova // Helia. – 2014. – Vol. 37, No. 61. – P. 215–225. – DOI 10.1515/helia-2014-0017
65. Aziz, M. A. Molecular breakthroughs in modern plant breeding techniques / M. A. Aziz, K. Masmoudi // Horticultural Plant Journal. – 2025. – Vol. 11, No. 1. – P. 15–41.
66. Badouin, H. The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution / H. Badouin, J. Gouzy, C. J. Grassa [et al.] // Nature. – 2017. – Vol. 546, No. 7656. – P. 148–152. – DOI 10.1038/nature22380.
67. Barea, G. First report of *Orobanche cumana* Wallr. (sunflower broomrape) in South America / G. Barea, A. B. García-Carneros, L. Baltazar, D. C. Coimbra-Melgar, M. Zankiz-Salvatierra, P. Zomeño, L. Molinero-Ruiz // Plant Disease. – 2025. – Vol. 109, No. 11. – P. 2448. – DOI 10.1094/PDIS-05-25-1012-PDN.
68. Beckmann, J. S. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs / J. S. Beckmann, M. Soller // Theoretical and Applied Genetics. – 1983. – Vol. 67, No. 1. – P. 35–43. – DOI 10.1007/BF00303919.
69. Blackman, B. K. Sunflower domestication alleles support single domestication center in eastern North America / B. K. Blackman, M. Scascitelli, N. C. Kane [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States

- of America. – 2011. – Vol. 108, No. 34. – P. 14360–14365. – DOI 10.1073/pnas.1104853108.
70. Bohra, A. Cytoplasmic male sterility (CMS) in hybrid breeding in field crops / A. Bohra, U. C. Jha, P. Adhimoolam [et al.] // Plant Cell Reports. – 2016. – Vol. 35, No. 5. – P. 967–993. – DOI 10.1007/s00299-016-1949-3.
71. Boom, R. Rapid and simple method for purification of nucleic acids / R. Boom, C. J. Sol, M. M. Salimans [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 1990. – Vol. 28, No. 3. – P. 495–503. – DOI 10.1128/JCM.28.3.495-503.1990.
72. Bordat, A. Different genetic architectures underlie crop responses to the same pathogen: the *{Helianthus annuus} × {Phoma macdonaldii}* interaction case for black stem disease and premature ripening / A. Bordat, G. Marchand, N. B. Langlade [et al.] // BMC Plant Biology. – 2017. – Vol. 17, No. 1. – P. 167. – DOI 10.1186/s12870-017-1116-1.
73. Brankov, M. A post-emergence herbicide program for weedy sunflower (*Helianthus annuus* L.) control in maize / M. Brankov, M. Simić, T. Piskackova [et al.] // Phytoparasitica. – 2024. – Vol. 52. – P. 12. – DOI 10.1007/s12600-024-01126-w.
74. Brigham, R. D. Inheritance of the «Y»-branched character in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and implication in breeding / R. D. Brigham, J. K. Young // Proceedings of the 9th International Sunflower Conference, Malaga, Spain. – 1980. – Vol. 1. – P. 343–346.
75. Brooks, M. E. glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling / M. E. Brooks, K. Kristensen, K. J. van Benthem [et al.] // The R Journal. – 2017. – T. 9, №2. – C. 378–400.
76. Brown, H. M. Mode of action, crop selectivity, and soil relations of the sulfonylurea herbicides / H. M. Brown // Pesticide Science. – 1990. – Vol. 29, No. 3. – P. 263–281. – DOI 10.1002/ps.2780290304.
77. Bulos, M. Marker assisted selection for herbicide resistance in sunflower / M. Bulos, C. A. Sala, E. Altieri [et al.] // Helia. – 2013a. – Vol. 36, No. 59. – P. 1–16. – DOI 10.2298/HEL1359001B.

78. Bulos M. et al. Molecular mapping of a sunflower rust resistance gene from HAR6 //Breeding science. – 2013b. – T. 63. – №. 1. – C. 141-146.
79. Cadic, E. Combined linkage and association mapping of flowering time in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) / E. Cadic, M. Coque, F. Vear [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2013. – Vol. 126, No. 5. – P. 1337–1356. – DOI 10.1007/s00122-013-2056-2.
80. Calderón-González, Á. Mapping an avirulence gene in the sunflower parasitic weed *Orobancha cumana* and characterization of host selection based on virulence alleles / Á. Calderón-González, B. Fernández-Melero, L. del Moral [et al.] // BMC Plant Biology. – 2024. – Vol. 24, No. 1. – P. 1147. – DOI 10.1186/s12870-024-05855-2.
81. Cao, X. L. First Report of *Orobancha cumana* on Coleus in Xinjiang, China / X. L. Cao, S. F. Zhao, L. Zhang [et al.] // Plant Disease. – 2023. – Vol. 107, No. 10. – P. 3322. – DOI 10.1094/PDIS-04-23-0762-PDN.
82. Casadebaig, P. Using plant phenotypic plasticity to improve crop performance and stability regarding climatic uncertainty: a computational study on sunflower / P. Casadebaig, B. Pouban, R. Trépos [et al.] // Procedia Environmental Sciences. – 2015. – Vol. 29. – P. 142–143. – DOI 10.1016/j.proenv.2015.07.229
83. Chabaud, M. Wild *Helianthus* species: a reservoir of resistance genes for sustainable pyramidal resistance to broomrape in sunflower / M. Chabaud, M.-C. Auriac, M.-C. Boniface [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2022. – Vol. 13. – P. 1038684. – DOI 10.3389/fpls.2022.1038684.
84. Champely, S. pwr: basic functions for power analysis : R package / S. Champely. – 2020. – URL: <https://cran.r-project.org/package=pwr> (дата обращения: 20.07.2025).
85. Chen, J. Biocontrol potential of the antagonistic microorganism *Streptomyces enissocaesilis* against *Orobancha cumana* / J. Chen, Q. H. Xue, C. S. P. McErlean [et al.] // BioControl. – 2016. – Vol. 61, No. 6. – P. 781–791. – DOI 10.1007/s10526-016-9738-z.

86. Chernova, A. I. Genotyping and lipid profiling of 601 cultivated sunflower lines reveals novel genetic determinants of oil fatty acid content / A. I. Chernova, R. F. Gubaev, A. Singh [et al.] // BMC Genomics. – 2021. – Vol. 22, No. 1. – P. 505. – DOI 10.1186/s12864-021-07768-y.
87. Cohen, J. Statistical power analysis for the behavioral sciences / J. Cohen. – 2nd ed. – Hillsdale, N.J. : Lawrence Erlbaum Associates, 1988. – 567 p.
88. Collard, B. C. Y. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century / B. C. Y. Collard, D. J. Mackill // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2008. – Vol. 363, No. 1491. – P. 557–572. – DOI 10.1098/rstb.2007.2170.
89. Concibido, V. C. RFLP mapping and marker-assisted selection of soybean cyst nematode resistance in PI 209332 / V. C. Concibido, R. L. Denny, D. A. Lange [et al.] // Crop Science. – 1996. – Vol. 36, No. 6. – P. 1643–1650. – DOI 10.2135/cropsci1996.0011183X003600060038x.
90. Cvejić, S. Advances in breeding, biotechnology and molecular biology in ornamental sunflower (*Helianthus annuus* L.) / S. Cvejić, N. Ćuk, B. Babec [et al.] // Breeding of Ornamental Crops: Annuals and Cut Flowers / ed. by J. M. Al-Khayri, S. M. Jain, M. A. Wani. – Cham : Springer Nature Switzerland, 2025. – P. 107–141. – DOI 10.1007/978-3-031-78653-2_4.
91. Cvejić, S. Broomrape resistance in newly developed sunflower inbred lines / S. Cvejić, B. Dedić, S. Jocić [et al.] // Proceedings of the 18th International Sunflower Conference, Mar del Plata and Balcarce, Argentina. – Paris : International Sunflower Association, 2012. – P. 1037–1042.
92. Cvejić, S. Genetic and genomic tools in sunflower breeding for broomrape resistance / S. Cvejić, A. Radanović, B. Dedić [et al.] // Genes. – 2020. – Vol. 11, No. 2. – P. 152. – DOI 10.3390/genes11020152.
93. Dauguet, S. Impact of pedoclimatic and agricultural conditions on sunflower seeds characteristics in relation to the dehulling process / S. Dauguet, F. Fine, C. Guillemain [et al.] // OCL. – 2015. – Vol. 22, No. 4. – P. D402.

94. Delavault, P. Knowing the parasite: biology and genetics of *Orobanche* / P. Delavault // *Helia*. – 2015. – Vol. 38, No. 62. – P. 15–29. – DOI 10.1515/helia-2014-0030.
95. Demir, I. The evaluation of confectionery sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars and populations for yield and yield components / I. Demir // *International Journal of Agriculture, Environment and Bioresearch*. – 2021. – Vol. 6, No. 1. – P. 179–187. – DOI 10.35410/IJAEB.2021.5612.
96. Demurin, Y. Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds as a basis of breeding for improved oil quality / Y. Demurin, D. Skoric, D. Karlovic // *Plant Breeding*. – 1996. – Vol. 115, No. 1. – P. 33–36. – DOI 10.1111/j.1439-0523.1996.tb00867.x.
97. Denis, L. Genetical studies of hullability in comparison with other sunflower seed characteristics / L. Denis, J. Dominguez, M. Baldini [et al.] // *Euphytica*. – 1994. – Vol. 79, No. 1. – P. 29–38. – DOI 10.1007/BF00023573.
98. Dimitrijević, A. Oleic acid variation and marker-assisted detection of Pervenets mutation in high-and low-oleic sunflower cross / A. Dimitrijević, S. Jocić, S. Cvejić [et al.] // *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. – 2017. – Vol. 17, No. 3. – P. 235–241.
99. Dimitrijevic, A. Sunflower hybrid breeding: from markers to genomic selection / A. Dimitrijevic, R. Horn // *Frontiers in Plant Science*. – 2018. – Vol. 8. – P. 2238. – DOI 10.3389/fpls.2017.02238.
100. Domínguez, J. Estimating effects on yield and other agronomic parameters in sunflower hybrids infested with the new races of sunflower broomrape / J. Domínguez // *Symposium I: Disease Tolerance in Sunflower*, Beijing, P.R. China, 12–20 June, 1996 / ed. by A. Pouzet. – Paris : International Sunflower Association, 1996. – P. 118–123.
101. Duca, M. Influence of environmental conditions on the virulence and distribution of *Orobanche cumana* Wallr. in the Republic of Moldova / M. Duca, V. Port, N. Țirdea [et al.] // *OCL*. – 2019. – Vol. 26. – P. 3. – DOI 10.1051/ocl/2018049

102. Duca, M. Historical aspects of sunflower researches in the Republic of Moldova / M. Duca // *Helia*. – 2015. – Vol. 38, No. 62. – P. 79–92. – DOI 10.1515/helia-2014-0028
103. Duca, M. Racial status of *Orobanche cumana* Wallr. in some countries of the world / M. Duca, S. Clapco, M. Joița-Păcureanu // *Helia*. – 2022. – Vol. 45, No. 76. – P. 1–22. – DOI 10.1515/helia-2022-0002
104. Duca, M. Current situation of sunflower broomrape in the Republic of Moldova / M. Duca // Proceedings of the 3rd International Symposium on Broomrape (*Orobanche* spp.) in Sunflower, Córdoba, Spain. – Paris : International Sunflower Association, 2014. – P. 44–50.
105. Duriez, P. A receptor-like kinase enhances sunflower resistance to *Orobanche cumana* / P. Duriez, S. Vautrin, M.-C. Auriac [et al.] // *Nature Plants*. – 2019. – Vol. 5, No. 12. – P. 1211–1215. – DOI 10.1038/s41477-019-0556-z.
106. El Sayed, S. Genetic markers for *Orobanche* resistance in sunflower : patent WO2008083198A2 / S. El Sayed, E. Hoeft, Z. Li, L. Tulsieram ; Pioneer Hi-Bred International, Inc. – Publ. 10.07.2008. – URL: <https://patents.google.com/patent/WO2008083198A2/en>
107. Elezovic, I. Yield and yield components of imidazolinone-resistant sunflower (*Helianthus annuus* L.) are influenced by pre-emergence herbicide and time of post-emergence weed removal / I. Elezović, A. Datta, S. Vrbničanin [et al.] // *Field Crops Research*. – 2012. – Vol. 128. – P. 137–146. – DOI 10.1016/j.fcr.2011.12.020.
108. Enns, H. Sunflower research, a progress report / H. Enns, D. G. Dorrell, J. A. Hoes, W. O. Chubb // Proceedings of the 4th International Sunflower Conference, Memphis, Tennessee, USA. – 1970. – P. 162–167
109. Fernández-Aparicio, M. Genetic and physiological characterization of sunflower resistance provided by the wild-derived *Or_{Deb2}* gene against highly virulent races of *Orobanche cumana* Wallr / M. Fernández-Aparicio, B. Pérez-Vich, L. Velasco [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2022. – Vol. 135, No. 2. – P. 501–525. – DOI: 10.1007/s00122-021-03979-9

110. Fernández-Aparicio, M. Recognition of root exudates by seeds of broomrape (*Orobanche* and *Phelipanche*) species / M. Fernández-Aparicio, F. Flores, D. Rubiales // *Annals of Botany*. – 2009. – Vol. 103, No. 3. – P. 423–431. – DOI 10.1093/aob/mcn236.
111. Fernández-Aparicio, M. Broomrape weeds. Underground mechanisms of parasitism and associated strategies for their control: a review / M. Fernández-Aparicio, X. Reboud, S. Gibot-Leclerc // *Frontiers in Plant Science*. – 2016. – Vol. 7. – P. 135. – DOI 10.3389/fpls.2016.00135
112. Fernández-Aparicio, M. Advances in understanding plant root response to weedy root parasites / M. Fernández-Aparicio, D. Rubiales // *Understanding and Improving Crop Root Function* / ed. by T. S. George, P. J. White, J. P. Hammond. – Cambridge, UK : Burleigh Dodds Science Publishing, 2021. – P. 215–230.
113. Fernández-Martínez, J. M. Sunflower / J. M. Fernández-Martínez, B. Pérez-Vich, L. Velasco // *Oil Crops* / ed. by J. Vollmann, I. Rajcan. – New York : Springer, 2009. – P. 155–232.
114. Fernández-Martínez, J. M. Sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) / J. M. Fernández-Martínez, B. Pérez-Vich, L. Velasco // *Sunflower : Chemistry, Production, Processing, and Utilization* / ed. by E. Martínez-Force, N. T. Dunford, J. J. Salas. – Urbana, IL : AOCS Press, 2015. – P. 129–155.
115. Fernández-Martínez, J. Genetic analysis of the high oleic acid content in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) / J. Fernández-Martínez, A. Jiménez, J. Domínguez [et al.] // *Euphytica*. – 1989. – Vol. 41, No. 1–2. – P. 39–51. – DOI 10.1007/BF00022409.
116. Fernández-Melero, B. A novel sunflower broomrape race with unusual virulence potentially caused by a mutation / B. Fernández-Melero, A. Martín-Sanz, L. del Moral [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2023. – Vol. 14. – 1236511. – DOI 10.3389/fpls.2023.1236511.
117. Fernández-Melero, B. Development and characterization of a new sunflower source of resistance to race G of *Orobanche cumana* Wallr. derived from

- Helianthus anomalous* / B. Fernández-Melero, L. del Moral, M. Todesco [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2024. – Vol. 137, No. 3. – P. 56. – DOI 10.1007/s00122-024-04558-4.
118. Fernández-Melero, B. Inbred-race recovery from a mixed population of the parasitic weed sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) / B. Fernández-Melero, A. Martín-Sanz, L. Velasco [et al.] // Weed Research. – 2026. – Vol. 66, No. 1. – e70059. – DOI 10.1111/wre.70059.
119. Flor, H. H. Current status of the gene-for-gene concept / H. H. Flor // Annual Review of Phytopathology. – 1971. – Vol. 9, No. 1. – P. 275–296.
120. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT: Crops and livestock products. – 2025. – URL: <https://www.fao.org/faostat/> (дата обращения: 02.03.2026).
121. Gagne, G. Study of the variability and evolution of *Orobanche cumana* populations infesting sunflower in different European countries / G. Gagne, P. Roeckel-Drevet, B. Grezes-Besset [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 1998. – Vol. 96. – P. 1216–1222. – DOI 10.1007/s001220050859.
122. Gao, W. Molecular markers associated with *Orobanche* resistance in sunflower : patent US 20190085413 A1 / W. Gao, V. L. Ripley, C. C. Aradhya, D. H. Meyer, L. Velasco, R. M. Benson, B. Perez Vich, A. L. Erickson, J. M. Fernandez Martinez ; Dow AgroSciences LLC. – Publ. 21.03.2019.
123. Garcia-Torres, L. Imazapyr applied postemergence in sunflower (*Helianthus annuus*) for broomrape (*Orobanche cernua*) control / L. Garcia-Torres, M. Castejon-Muñoz, F. Lopez-Granados [et al.] // Weed Technology. – 1995. – Vol. 9, No. 4. – P. 819–824. – DOI 10.1017/S0890037X00024271.
124. Gavrilova, V. A. Sunflower genetic collection at the Vavilov Institute of Plant Industry / V. A. Gavrilova, V. T. Rozhkova, I. N. Anisimova // Helia. – 2014. – Vol. 37, No. 60. – P. 1–16.
125. Gil, M. Decoding non-target-site herbicide resistance in sunflower: the beginning of the story / M. Gil, G. Nestares // Helia. – 2019. – Vol. 42, No. 70. – P. 1–16. – DOI 10.1515/helia-2019-0002.

126. Wang, X. GMATA: software for SSR mining, marker designing, genotyping, plot etc. [Электронный ресурс] / X. Wang. – GitHub. – URL: <https://github.com/XuewenWangUGA/GMATA> (дата обращения: 28.03.2021).
127. Gong, L. Molecular tagging of a novel rust resistance gene *R₁₂* in sunflower (*Helianthus annuus* L.) / L. Gong, B. S. Hulke, T. J. Gulya [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2013. – Vol. 126, No. 1. – P. 93–99. – DOI 10.1007/s00122-012-1962-z.
128. González-Cantón, E. First report of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in Portugal / E. González-Cantón, A. Velasco-Sánchez, L. Velasco, A. Martín-Sanz // Plant Disease. – 2019. – Vol. 103, No. 8. – P. 2143. – DOI 10.1094/PDIS-10-18-1723-PDN.
129. Goryunov, D. V. Association mapping of fertility restorer gene for CMS PET1 in sunflower / D. V. Goryunov, A. A. Anisimova, V. G. Gavrilova [et al.] // Agronomy. – 2019. – Vol. 9, No. 2. – P. 49. – DOI 10.3390/agronomy9020049.
130. Gubaev, R. QTL mapping of oleic acid content in modern VNIIMK sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines by using GBS-based SNP map / R. Gubaev, S. Boldyrev, E. Martynova [et al.] // PLOS ONE. – 2023. – Vol. 18, No. 10. – e0288772. – DOI 10.1371/journal.pone.0288772.
131. Gulya, T. Sunflower diseases / T. Gulya, K. Y. Rashid, S. M. Maširević // Sunflower Technology and Production / ed. by A. A. Schneiter. – Madison, WI : American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 1997. – P. 263–379. – DOI 10.2134/agronmonogr35.c6.
132. Gulya, T. Evaluation of broomrape (*Orobanche cumana*) resistance in sunflower germplasm of the USDA Plant Introduction Collection / T. Gulya, A. Aydin, M. Brothers // Proceedings of the 16th Sunflower Research Workshop, Fargo, ND, USA. – Bismarck, ND : National Sunflower Association, 1994. – P. 53–55.

133. Hahn, V. Genetic variation for resistance to *Sclerotinia* head rot in sunflower inbred lines / V. Hahn // *Field Crops Research*. – 2002. – Vol. 77, No. 2–3. – P. 153–159. – DOI 10.1016/S0378-4290(02)00082-5.
134. Hartig, F. DHARMa: residual diagnostics for hierarchical (multi-level / mixed) regression models : R package / F. Hartig. – 2022. – URL: <https://cran.r-project.org/package=DHARMa> (дата обращения: 15.08.2025).
135. Hasan, N. Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes / N. Hasan, G. Choudhary, M. S. Naaz [et al.] // *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. – 2021. – Vol. 19, No. 1. – P. 128. – DOI 10.1186/s43141-021-00231-1.
136. Hassan, E. A. Histochemical aspects of penetration and vascular connection of broomrape haustoria in the host root, and the possible implication of phenylpropanoids / E. A. Hassan, S. S. El-Akkad, S. M. Moustafa [et al.] // *International Journal of Agriculture and Biology*. – 2004. – Vol. 6. – P. 430–434.
137. El Sayed, S. Genetic markers for *Orobanche* resistance in sunflower : WO 2008083198 A2 : published 10.07.2008 / S. El Sayed, E. Hoeft, Z. Li [et al.] ; applicant Pioneer Hi-Bred International, Inc.
138. Hedges, L. V. Distribution theory for Glass's estimator of effect size and related estimators / L. V. Hedges // *Journal of Educational Statistics*. – 1981. – Vol. 6, No. 2. – P. 107–128.
139. Hladni, N. Evaluation of resistance of new sunflower hybrids to broomrape in the breeding programs in Novi Sad / N. Hladni, B. Dedić, S. Jocić [et al.] // *Helia*. – 2012. – Vol. 35, No. 56. – P. 89–98. – DOI 10.2298/HEL1256089H.
140. Horn, R. Development and validation of markers for the fertility restorer gene *Rfl* in sunflower / R. Horn, A. Radanović, L. Fuhrmann [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20, No. 6. – P. 1260. – DOI 10.3390/ijms20061260.
141. Horn, R. Molecular mapping of the *Rfl* gene restoring pollen fertility in PET1-based F1 hybrids in sunflower (*Helianthus annuus* L.) / R. Horn, B. Kusterer,

- E. Lazarescu [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2003. – Vol. 106, No. 4. – P. 599–606. — DOI 10.1007/s00122-002-1078-y.
142. Huang, K. The genomics of linkage drag in inbred lines of sunflower / K. Huang, M. Jahani, J. Gouzy [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2023. – Vol. 120, No. 14. – e2205783119. – DOI 10.1073/pnas.2205783119.
143. Imerovski, I. BSA-seq mapping reveals major QTL for broomrape resistance in four sunflower lines / I. Imerovski, B. Dedić, S. Cvejić [et al.] // Molecular Breeding. – 2019. – Vol. 39, No. 3. – P. 41. – DOI 10.1007/s11032-019-0948-9.
144. Imerovski, I. Identification of PCR markers linked to different *Or* genes in sunflower / I. Imerovski, A. Dimitrijević, D. Miladinović [et al.] // Plant Breeding. – 2013. – Vol. 132, No. 1. – P. 115–120. – DOI 10.1111/pbr.12022.
145. Imerovski, I. Mapping of a new gene for resistance to broomrape races higher than F / I. Imerovski, A. Dimitrijević, D. Miladinović [et al.] // Euphytica. – 2016. – Vol. 209, No. 2. – P. 281–289. – DOI 10.1007/s10681-015-1597-7.
146. Iqbal, A. Identification of sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae) hybrids using simple-sequence repeat markers / A. Iqbal, H. A. Sadaqat, A. S. Khan [et al.] // Genetics and Molecular Research. – 2010. – Vol. 10, No. 1. – P. 102–106. – DOI 10.4238/vol10-1gmr918.
147. Jan, C. C. Registration of four sunflower germplasms with resistance to *Orobanche cumana* race F / C. C. Jan, J. M. Fernández-Martínez, J. Ruso [et al.] // Crop Science. – 2002. – Vol. 42, – No. 6. – P. 2217–2218. DOI 10.2135/cropsci2002.2217.
148. Jestin, C. Current situation of sunflower broomrape in France / C. Jestin, V. Lecomte, F. Duroueix // Proceedings of the Third International Symposium on Broomrape (*Orobanche* spp.) in Sunflower, Córdoba, Spain, June 3–6, 2014. Paris : International Sunflower Association, – 2014. – P. 28–31.

149. Jiang, G.-L. Molecular markers and marker-assisted breeding in plants / G.-L. Jiang // Plant Breeding from Laboratories to Fields / S. B. Andersen, ed. Rijeka : InTech, – 2013. – P. 45–83. DOI 10.5772/52583.
150. Bhuvaneswari, S. Discovery of a novel induced polymorphism in *SD1* gene governing semi-dwarfism in rice and development of a functional marker for marker-assisted selection / S. Bhuvaneswari, S. Gopala Krishnan, R. K. Ellur [et al.] // Plants. – 2020. – Vol. 9, No. 9. – P. 1198. DOI 10.3390/plants9091198.
151. Jocković, M. Genetic Improvement in Sunflower Breeding – Integrated Omics Approach / M. Jocković, S. Jocić, S. Cvejić [et al.] // Plants. – 2021. – Vol. 10, No. 6. – P. 1150. DOI 10.3390/plants10061150.
152. Joel, D. M. Parasitic *Orobanchaceae*: parasitic mechanisms and control strategies / D. M. Joel, J. Gressel, L. J. Musselman, eds. Berlin, Heidelberg : Springer, – 2013. XVII, – 513 p. DOI 10.1007/978-3-642-38146-1.
153. Joel, D. M. The attachment organ of the parasitic angiosperms *Orobanche cumana* and *O. aegyptiaca* and its development / D. M. Joel, D. Losner-Goshen // Canadian Journal of Botany. – 1994. – Vol. 72, No. 5. – P. 564–574. DOI 10.1139/b94-075.
154. Juroszek, P. Potential strategies and future requirements for plant disease management under a changing climate / P. Juroszek, A. von Tiedemann // Plant Pathology. – 2011. – Vol. 60, No. 1. – P. 100–112. DOI 10.1111/j.1365-3059.2010.02410.x.
155. Jursík, M. Optimising Clearfield and Expressun sunflower technologies for central european conditions / M. Jursík, V. Fendrychová, M. Kolářová [et al.] // Plant Protection Science. – 2017. – Vol. 53, No. 4. – P. 265–272. DOI 10.17221/2/2017-PPS.
156. Kaundun, S. S. First case of evolved herbicide resistance in the holoparasite sunflower broomrape, *Orobanche cumana* Wallr. / S. S. Kaundun, A. Martin-Sanz, M. Rodríguez [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2024. – Vol. 15. – P. 1420009. DOI 10.3389/fpls.2024.1420009.

157. Kaya, Y. Current situation of sunflower broomrape around the world / Y. Kaya // Proceedings of the Third International Symposium on Broomrape (*Orobanche* spp.) in Sunflower, Córdoba, Spain, June 3–6, 2014. Paris, France : International Sunflower Association, – 2014. – P. 9–18.
158. Kaya, Y. Evaluation of broomrape resistance in sunflower hybrids / Y. Kaya, G. Evci, V. Pekcan [et al.] // *Helia*. – 2009. – Vol. 32, No. 51. – P. 161–169. DOI 10.2298/HEL0951161K.
159. Kinman, M. L. New developments in the USDA and state experiment station sunflower breeding programs / M. L. Kinman // Proceedings of the Fourth International Sunflower Conference, Memphis, Tennessee, USA. – 1970. – P. 181–183.
160. Kirov, I. Genomic and transcriptomic survey provides new insight into the organization and transposition activity of highly expressed LTR retrotransposons of sunflower (*Helianthus annuus* L.) / I. Kirov, M. Omarov, P. Merkulov [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, No. 23. – P. 9331. DOI 10.3390/ijms21239331.
161. Klein, O. Biological control of *Orobanche* spp. with *Phytomyza orobanchia*, a review / O. Klein, J. Kroschel // *BioControl*. – 2002. – Vol. 47, No. 3. – P. 245–277. DOI 10.1023/A:1014862302818.
162. Knezevic, S. Z. Delay in the critical time for weed removal in imidazolinone-resistant sunflower (*Helianthus annuus*) caused by application of pre-emergence herbicide / S. Z. Knezevic, I. Elezovic, A. Datta [et al.] // *International Journal of Pest Management*. – 2013. – Vol. 59, No. 3. – P. 229–235. DOI 10.1080/09670874.2013.830797.
163. Kolkman, J. M. Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonyleurea herbicides in sunflower / J. M. Kolkman, M. B. Slabaugh, J. M. Bruniard [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics*. 2004. Vol. 109, No. 6. P. 1147–1159. DOI 10.1007/s00122-004-1716-7.
164. Krsmanović, S. Diversity and aggressiveness of the *Diaporthe* species complex on sunflower in Serbia / S. Krsmanović, L. Riccioni, B. Dedić [et al.] // *Plant*

- Disease. – 2024. – Vol. 108, No. 9. – P. 2795–2808. DOI 10.1094/PDIS-01-24-0195-RE
165. Krupp, A. Development of phloem connection between the parasitic plant *Orobanche cumana* and its host sunflower / A. Krupp, A. Heller, O. Spring // Protoplasma. – 2019. – Vol. 256, No. 5. – P. 1385–1397. DOI 10.1007/s00709-019-01393-z.
 166. Kucherenko, Ye. Yu. Marker-assisted selection and use of molecular markers in sunflower breeding for resistance to diseases and parasites / Ye. Yu. Kucherenko, A. M. Zviahintseva, L. N. Kobyzeva [et al.] // The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series «Biology». – 2022. – No. 38. – P. 14–29. DOI 10.26565/2075-5457-2022-38-2.
 167. Kumar, R. Advances in genomic tools for plant breeding: harnessing DNA molecular markers, genomic selection, and genome editing / R. Kumar, S. P. Das, B. U. Choudhury [et al.] // Biological Research. – 2024. – Vol. 57, No. 1. – P. 80. DOI 10.1186/s40659-024-00562-6.
 168. Labrousse, P. Analysis of resistance criteria of sunflower recombined inbred lines against *Orobanche cumana* Wallr. / P. Labrousse, M. C. Arnaud, Y. Griveau [et al.] // Crop Protection. – 2004. – Vol. 23, No. 5. – P. 407–413. DOI 10.1016/j.cropro.2003.09.013.
 169. Labrousse, P. Several mechanisms are involved in resistance of *Helianthus* to *Orobanche cumana* Wallr. / P. Labrousse, M. C. Arnaud, H. Serieys [et al.] // Annals of Botany. – 2001. – Vol. 88, No. 5. – P. 859–868. DOI 10.1006/anbo.2001.1520.
 170. Lacombe, S. A dominant mutation for high oleic acid content in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed oil is genetically linked to a single oleate-desaturase RFLP locus / S. Lacombe, A. Bervillé // Molecular Breeding. – 2001. – Vol. 8, No. 2. – P. 129–137. DOI 10.1023/A:1013358711651.
 171. Lakshmi Prasad, M. S. Population structure of *Alternaria* species causing leaf blight of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in India / M. S. Lakshmi Prasad,

- N. Naresh, K. Sujatha [et al.] // *Phytoparasitica*. – 2020. – Vol. 48, No. 3. – P. 335–356. DOI 10.1007/s12600-020-00796-6.
172. Laver, H. K. Mitochondrial genome organization and expression associated with cytoplasmic male sterility in sunflower (*Helianthus annuus*) / H. K. Laver, S. J. Reynolds, F. Monéger [et al.] // *The Plant Journal*. – 1991. – Vol. 1, No. 2. – P. 185–193. DOI 10.1111/j.1365-313X.1991.00185.x.
173. Lechat, M.-M. Seed response to strigolactone is controlled by abscisic acid-independent DNA methylation in the obligate root parasitic plant, *Phelipanche ramosa* L. Pomel / M.-M. Lechat, G. Brun, G. Montiel [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2015. – Vol. 66, No. 11. – P. 3129–3140. DOI 10.1093/jxb/erv119.
174. Leclercq, P. Une stérilité mâle cytoplasmique chez le tournesol / P. Leclercq // *Annales de l'amélioration des plantes*. – 1969. Vol. 19, No. 2. – P. 99–106.
175. Lenth, R. V. emmeans: estimated marginal means, aka least-squares means : R package / R. V. Lenth. 2023. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans> (дата обращения: 10.06.2025).
176. Leon, A. J. Genetic analysis of seed-oil concentration across generations and environments in sunflower / A. J. Leon, F. H. Andrade, M. Lee // *Crop Science*. – 2003. – Vol. 43, No. 1. – P. 135–140. DOI 10.2135/cropsci2003.1350.
177. Li, J. 5-aminolevulinic acid enhances sunflower resistance to *Orobanche cumana* (broomrape) / J. Li, C. Yang, H. Liu [et al.] // *Industrial Crops and Products*. – 2019. – Vol. 140. – P. 111467. DOI 10.1016/j.indcrop.2019.111467.
178. Liu, G.-S. The expression of the Y-branched character in sunflower (*H. annuus* L.) / G.-S. Liu, P. Leclercq // *Proceedings of the 12th International Sunflower Conference, Novi Sad, Yugoslavia, 1988*. – Vol. 2. – P. 443–447.
179. Liu, Z. Molecular mapping of the *Pl₁₆* downy mildew resistance gene from HA-R4 to facilitate marker-assisted selection in sunflower / Z. Liu, T. J. Gulya, G. J. Seiler [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2012. – Vol. 125, No. 1. – P. 121–131. DOI 10.1007/s00122-012-1820-z.

180. Losner-Goshen, D. Pectolytic activity by the haustorium of the parasitic plant *Orobanche* L. (*Orobanchaceae*) in host roots / D. Losner-Goshen, V. H. Portnoy, A. M. Mayer [et al.] // *Annals of Botany*. – 1998. – Vol. 81, No. 2. – P. 319–326. DOI 10.1006/anbo.1997.0563.
181. Louarn, J. Reduced germination of *Orobanche cumana* seeds in the presence of arbuscular mycorrhizal fungi or their exudates / J. Louarn, F. Carbonne, P. Delavault [et al.] // *PLOS ONE*. – 2012. – Vol. 7, No. 11. – e49273. – DOI 10.1371/journal.pone.0049273.
182. Louarn, J. Sunflower resistance to broomrape (*Orobanche cumana*) is controlled by specific QTLs for different parasitism stages / J. Louarn, M.-C. Boniface, N. Pouilly [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2016. – Vol. 7. – P. 590. – DOI 10.3389/fpls.2016.00590.
183. Lu, Y. H. Development of SCAR markers linked to the gene *Or₅* conferring resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower / Y. H. Lu, J. M. Melero-Vara, J. A. García-Tejada [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2000. – Vol. 100, No. 3–4. – P. 625–632. – DOI 10.1007/s001220050083.
184. Lumbroso, A. Simplified strigolactams as potent analogues of strigolactones for the seed germination induction of *Orobanche cumana* Wallr. / A. Lumbroso, E. Villedieu-Percheron, D. Zurwerra [et al.] // *Pest Management Science*. – 2016. – Vol. 72, No. 11. – P. 2054–2068. – DOI 10.1002/ps.4268.
185. Ma, D. T. Distribution and race composition of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in Northern China / D. T. Ma, C.-C. Jan // *Proceedings of the Third International Symposium on Broomrape (*Orobanche* spp.) in Sunflower, Córdoba, Spain, June 3–6, 2014*. – Paris, France : International Sunflower Association, 2014. – P. 65–69.
186. Ma, G. J. Genotyping-by-sequencing targeting of a novel downy mildew resistance gene *Pl₂₀* from wild *Helianthus argophyllus* for sunflower (*Helianthus annuus* L.) / G. J. Ma, S. G. Markell, Q. J. Song [et al.] // *Theoretical and Applied*

- Genetics. – 2017. – Vol. 130, No. 7. – P. 1519–1529. – DOI 10.1007/s00122-017-2906-4.
187. Ma, G. J. High-throughput genotyping-by-sequencing facilitates molecular tagging of a novel rust resistance gene, R_{15} , in sunflower (*Helianthus annuus* L.) / G. J. Ma, Q. J. Song, S. G. Markell [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2018. – Vol. 131, No. 7. – P. 1423–1432. – DOI 10.1007/s00122-018-3087-5.
 188. Ma, G. J. Registration of two double rust resistant germplasms, HA-R12 and HA-R13 for confection sunflower / G. J. Ma, G. J. Seiler, S. G. Markell [et al.] // Journal of Plant Registrations. – 2016. – Vol. 10, No. 1. – P. 69–74. – DOI 10.3198/jpr2015.05.0033crg.
 189. Makarenko, M. S. Mitochondrial genomes organization in alloplasmic lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.) with various types of cytoplasmic male sterility / M. S. Makarenko, I. V. Kornienko, K. V. Azarin [et al.] // PeerJ. – 2018. – Vol. 6. – e5266. – DOI 10.7717/peerj.5266.
 190. Mandel, J. R. Genetic diversity and population structure in cultivated sunflower and a comparison to its wild progenitor, *Helianthus annuus* L. / J. R. Mandel, J. M. Dechaine, L. F. Marek [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2011. – Vol. 123, No. 5. – P. 693–704. – DOI 10.1007/s00122-011-1619-3.
 191. Marchand, G. A biomarker based on gene expression indicates plant water status in controlled and natural environments / G. Marchand, B. Mayjonade, D. Varès [et al.] // Plant, Cell & Environment. – 2013. – Vol. 36, No. 12. – P. 2175–2189. – DOI 10.1111/pce.12127.
 192. Martín-Sanz, A. Characterization of post-haustorial resistance to sunflower broomrape / A. Martín-Sanz, B. Pérez-Vich, S. Rueda [et al.] // Crop Science. – 2020. – Vol. 60, No. 3. – P. 1188–1198. – DOI 10.1002/csc2.20002.
 193. Martín-Sanz, A. Genetics, host range, and molecular and pathogenic characterization of *Verticillium dahliae* from sunflower reveal two differentiated groups in Europe / A. Martín-Sanz, S. Rueda, A. B. García-Carneros [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2018. – Vol. 9. – P. 288. – DOI 10.3389/fpls.2018.00288.

194. Martín-Sanz, A. Increased virulence in sunflower broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.) populations from Southern Spain is associated with greater genetic diversity / A. Martín-Sanz, J. Malek, J. M. Fernández-Martínez [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2016. – Vol. 7. – P. 589. – DOI 10.3389/fpls.2016.00589.
195. Masi, M. Inuloxin E, a new seco-eudesmanolide isolated from *Dittrichia viscosa*, stimulating *Orobancha cumana* seed germination / M. Masi, M. Fernández-Aparicio, R. Zatout [et al.] // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, No. 19. – P. 3479. – DOI 10.3390/molecules24193479.
196. Mathew, F. M. Phomopsis stem canker: a reemerging threat to sunflower (*Helianthus annuus*) in the United States / F. M. Mathew, K. M. Alananbeh, J. G. Jordahl [et al.] // *Phytopathology*. – 2015. – Vol. 105, No. 7. – P. 990–997. – DOI 10.1094/PHYTO-11-14-0336-FI.
197. Mauromicale, G. Soil solarization, a nonchemical method to control branched broomrape (*Orobancha ramosa*) and improve the yield of greenhouse tomato / G. Mauromicale, A. Lo Monaco, A. M. G. Longo [et al.] // *Weed Science*. – 2005. – Vol. 53, No. 6. – P. 877–883. – DOI 10.1614/WS-05-023R1.1.
198. Livak, K. J. Method for detecting nucleic acid amplification using self-quenching fluorescence probe : patent US5538848A / K. J. Livak, S. J. A. Flood, J. Marmaro ; Perkin Elmer Corp. – Publ. 23.07.1996. – URL: <https://patents.google.com/patent/US5538848A/en>.
199. Miladinović, D. Current situation of sunflower broomrape in Serbia / D. Miladinović, S. Jocić, B. Dedić [et al.] // *Proceedings of the Third Symposium on Broomrape (Orobancha spp.) in Sunflower, Córdoba, Spain, June 3–6, 2014*. – Paris, France : International Sunflower Association, 2014. – P. 33–38.
200. Mitsumasu, K. Apoplastic interactions between plants and plant root intruders / K. Mitsumasu, Y. Seto, S. Yoshida // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – Vol. 6. – P. 617. – DOI 10.3389/fpls.2015.00617.
201. Molinero-Ruiz, L. History of the race structure of *Orobancha cumana* and the breeding of sunflower for resistance to this parasitic weed: a review /

- L. Molinero-Ruiz, P. Delavault, B. Pérez-Vich [et al.] // Spanish Journal of Agricultural Research. – 2015. – Vol. 13, No. 4. – e10R01. – DOI 10.5424/sjar/2015134-8080.
202. Molinero-Ruiz, L. Current situation of sunflower broomrape in Spain / L. Molinero-Ruiz, J. Domínguez // Proceedings of the Third International Symposium on Broomrape (*Orobanch* spp.) in Sunflower, Córdoba, Spain, June 3–6, 2014. – Paris, France : International Sunflower Association, 2014. – P. 19–27.
203. Nabloussi, A. Virulence, genetic diversity, and putative geographical origin of sunflower broomrape populations in Morocco / A. Nabloussi, B. Pérez-Vich, L. Velasco // Phytopathologia Mediterranea. – 2023. – Vol. 62, No. 1. – P. 65–72. – DOI 10.36253/phyto-13948.
204. Nabloussi, A. First report of sunflower broomrape, *Orobanch cumana* Wallr., in Morocco / A. Nabloussi, L. Velasco, N. Assissel // Plant Disease. – 2018. – Vol. 102, No. 2. – P. 457. – DOI 10.1094/PDIS-06-17-0858-PDN.
205. National Center for Biotechnology Information. BLAST: basic local alignment search tool [Электронный ресурс]. – URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата последнего обращения: 02.12.2025).
206. National Center for Biotechnology Information (NCBI). GenBank overview [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (дата последнего обращения: 02.12.2025).
207. Okonechnikov, K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov [et al.] // Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28, No. 8. – P. 1166–1167. – DOI 10.1093/bioinformatics/bts091.
208. Păcureanu-Joița, M. The evaluation of the parasite-host interaction in the system *Helianthus annuus* L. – *Orobanch cumana* Wallr. in Romania / M. Păcureanu-Joița, A. V. Vrânceanu, G. Soare [et al.] // Proceedings of the second Balkan symposium on field crops, Novi Sad, Yugoslavia, June 16–20,

1998. – Novi Sad : Institute of Field and Vegetable Crops, 1998. – Vol. 1. – P. 153–158.
209. Panth, M. Methods for management of soilborne diseases in crop production / M. Panth, S. C. Hassler, F. Baysal-Gurel // *Agriculture*. – 2020. – Vol. 10, No. 1. – P. 16. – DOI 10.3390/agriculture10010016.
210. Parker, C. Observations on the current status of *Orobanche* and *Striga* problems worldwide / C. Parker // *Pest Management Science*. – 2009. – Vol. 65, No. 5. – P. 453–459. – DOI 10.1002/ps.1713.
211. Pérez-Vich, B. Marker-assisted and physiology-based breeding for resistance to root parasitic *Orobanchaceae* / B. Pérez-Vich, L. Velasco, P. J. Rich [et al.] // *Parasitic Orobanchaceae: parasitic mechanisms and control strategies* / D. M. Joel, J. Gressel, L. J. Musselman, eds. – Berlin, Heidelberg : Springer, 2013. – P. 369–391. – DOI 10.1007/978-3-642-38146-1_21.
212. Pérez-Vich, B. Quantitative trait loci for broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) resistance in sunflower / B. Pérez-Vich, B. Akhtouch, S. J. Knapp [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2004. – Vol. 109, No. 1. – P. 92–102. – DOI 10.1007/s00122-004-1599-7.
213. Peters, R. D. Developing disease-suppressive soils through crop rotation and tillage management practices / R. D. Peters, A. V. Sturz, M. R. Carter [et al.] // *Soil and Tillage Research*. – 2003. – Vol. 72, No. 2. – P. 181–192. – DOI 10.1016/S0167-1987(03)00087-4.
214. Pfenning, M. The CLEARFIELD® technology – a new broad-spectrum post-emergence weed control system for European sunflower growers / M. Pfenning, G. Palfay, T. Guillet // *Journal of Plant Diseases and Protection*. – 2008. – Special issue XXI. – P. 649–654.
215. Pineda-Martos, R. Genetic diversity of *Orobanche cumana* populations from Spain assessed using SSR markers / R. Pineda-Martos, L. Velasco, J. Fernández-Escobar [et al.] // *Weed Research*. – 2013. – Vol. 53, No. 4. – P. 279–289. – DOI 10.1111/wre.12022

216. Pineda-Martos, R. The genetic structure of wild *Orobanche cumana* Wallr. (*Orobanchaceae*) populations in Eastern Bulgaria reflects introgressions from weedy populations / R. Pineda-Martos, A. J. Pujadas-Salvà, J. M. Fernández-Martínez [et al.] // The Scientific World Journal. – 2014. – Vol. 2014, No. 1. – P. 150432. – DOI 10.1155/2014/150432.
217. Plakhine, D. Broomrape seed conditioning and response to germination stimulants in soil / D. Plakhine, H. Ziadna, D. M. Joel // Proceedings of the 10th World Congress on Parasitic Plants, Kuşadası, Turkey, June 8–12, 2009. – 2009.
218. Ponomarev, A. Impact of soil tillage practices on disease development in winter wheat / A. Ponomarev, O. Kremneva, K. Gasiyan [et al.] // International Journal of Agriculture and Biosciences. – 2025. – Vol. 14, No. 6. – P. 1137–1145. – DOI 10.47278/journal.ijab/2025.106.
219. Putt, E. D. Early history of sunflower / E. D. Putt // Sunflower technology and production / A. A. Schneiter, ed. – Madison, WI : American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 1997. – P. 1–19. – DOI 10.2134/agronmonogr35.c1.
220. Putt, E. D. History and present world status / E. D. Putt // Sunflower science and technology / J. F. Carter, ed. – Madison, WI : American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 1978. – P. 1–29. – DOI 10.2134/agronmonogr19.c1.
221. Qi, L. Identification of resistance to new virulent races of rust in sunflowers and validation of DNA markers in the gene pool / L. Qi, T. J. Gulya, G. J. Seiler [et al.] // Phytopathology. – 2011. – Vol. 101, No. 2. – P. 241–249. – DOI 10.1094/PHYTO-06-10-0162.
222. Qi, L. L. Development and dissection of diagnostic SNP markers for the downy mildew resistance genes *Pl_{Arg}* and *Pl₈* and maker-assisted gene pyramiding in sunflower (*Helianthus annuus* L.) / L. L. Qi, Z. I. Talukder, B. S. Hulke [et al.] // Molecular Genetics and Genomics. – 2017. – Vol. 292, No. 3. – P. 551–563. – DOI 10.1007/s00438-017-1290-8.

223. Qi, L. L. Diversification of the downy mildew resistance gene pool by introgression of a new gene, *Pl₃₅*, from wild *Helianthus argophyllus* into oilseed and confection sunflowers (*Helianthus annuus* L.) / L. L. Qi, G. J. Ma, X. H. Li [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2019. – Vol. 132, No. 9. – P. 2553–2565. – DOI 10.1007/s00122-019-03370-9.
224. Qi, L. L. Genetics and mapping of the *R₁₁* gene conferring resistance to recently emerged rust races, tightly linked to male fertility restoration, in sunflower (*Helianthus annuus* L.) / L. L. Qi, G. J. Seiler, B. S. Hulke [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2012. – Vol. 125, No. 5. – P. 921–932. – DOI 10.1007/s00122-012-1883-x.
225. Qi, L. L. *Pl₁₇* is a novel gene independent of known downy mildew resistance genes in the cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) / L. L. Qi, Y. M. Long, C. C. Jan [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2015. – Vol. 128, No. 4. – P. 757–767. – DOI 10.1007/s00122-015-2470-8.
226. Qi, L. L. Registration of two confection sunflower germplasms, HA-DM5 and HA-DM6, resistant to sunflower downy mildew / L. L. Qi, G. J. Ma, G. J. Seiler // Journal of Plant Registrations. – 2020. – Vol. 14, No. 1. – P. 87–91. – DOI 10.1002/plr2.20014.
227. Qi, L. Marker-assisted gene pyramiding and the reliability of using SNP markers located in the recombination suppressed regions of sunflower (*Helianthus annuus* L.) / L. Qi, G. Ma // Genes. – 2020. – Vol. 11, No. 1. – P. 10. – DOI 10.3390/genes11010010.
228. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing [Электронный ресурс]. – Vienna : R Foundation for Statistical Computing, 2025. – URL: <https://www.R-project.org/> (дата обращения: 12.12.2025).
229. Radanović, A. KASP markers specific for the fertility restorer locus *Rf1* and application for genetic purity testing in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) / A. Radanović, Y. Sprycha, M. Jocković [et al.] // Genes. – 2022. – Vol. 13, No. 3. – P. 465. – DOI 10.3390/genes13030465.

230. Radanović, A. Sunflower genetics from ancestors to modern hybrids – a review / A. Radanović, D. Miladinović, S. Cvejić [et al.] // *Genes*. – 2018. – Vol. 9, No. 11. – P. 528. – DOI 10.3390/genes9110528.
231. Rauf, S. Breeding strategies for sunflower (*Helianthus annuus* L.) genetic improvement / S. Rauf // *Advances in plant breeding strategies: industrial and food crops*. Volume 6 / J. M. Al-Khayri, S. M. Jain, D. V. Johnson, eds. – Cham : Springer, 2019. – P. 637–673. – DOI 10.1007/978-3-030-23265-8_16.
232. Rauf, S. Validated markers for sunflower (*Helianthus annuus* L.) breeding / S. Rauf, M. Warburton, A. Naeem [et al.] // *OCL*. – 2020. – Vol. 27. – P. 47. – DOI 10.1051/ocl/2020042.
233. Raupp, F. M. New sesquiterpene lactones from sunflower root exudate as germination stimulants for *Orobanche cumana* / F. M. Raupp, O. Spring // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2013. – Vol. 61, No. 44. – P. 10481–10487. – DOI 10.1021/jf402392e.
234. Reddy, B. V. Role of molecular based markers methods and their applications in crop improvement / B. V. Reddy, C. V. C. M. Reddy, A. C. Sekhar [et al.] // *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*. – 2021. – Vol. 22, No. 23–24. – P. 38–54.
235. Rîșnoveanu, L. The virulence of broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower crop in Braila area, in Romania / L. Rîșnoveanu, M. Joița-Păcureanu, F. G. Anton // *Helia*. – 2016. – Vol. 39, No. 65. – P. 189–196. – DOI 10.1515/helia-2016-0015.
236. Rodríguez-Ojeda, M. I. A dominant avirulence gene in *Orobanche cumana* triggers *Or₅* resistance in sunflower / M. I. Rodríguez-Ojeda, R. Pineda-Martos, L. C. Alonso [et al.] // *Weed Research*. – 2013. – Vol. 53, No. 5. – P. 322–327. – DOI 10.1111/wre.12034.
237. Rodríguez-Ojeda, M. I. Extent of cross-fertilization in *Orobanche cumana* Wallr. / M. I. Rodríguez-Ojeda, J. M. Fernández-Martínez, L. Velasco [et al.] // *Biologia Plantarum*. – 2013. – Vol. 57, No. 3. – P. 559–562. – DOI 10.1007/s10535-012-0301-1.

238. Sackston, W. E. Downy mildew of sunflower / W. E. Sackston // The downy mildews / D. M. Spencer, ed. – London : Academic Press, 1981. – P. 545–575.
239. Sala, C. A. Genetics and breeding of herbicide tolerance in sunflower / C. A. Sala, M. Bulos, E. Altieri [et al.] // *Helia*. – 2012. – Vol. 35, No. 57. – P. 57–70. – DOI 10.2298/HEL1257057S.
240. Schilling, E. E. *Helianthus* / E. E. Schilling // Flora of North America north of Mexico. Vol. 21 : Magnoliophyta: Asteridae, part 8: Asteraceae, part 3 / Flora of North America Editorial Committee, ed. – New York, Oxford : Oxford University Press, 2006. – P. 141–169.
241. Schnabel, U. Development of markers for the use of the PEF1 cytoplasm in sunflower hybrid breeding / U. Schnabel, U. Engelmann, R. Horn // *Plant Breeding*. – 2008. – Vol. 127, No. 6. – P. 587–591. – DOI 10.1111/j.1439-0523.2008.01516.x.
242. Schuppert, G. F. The sunflower high-oleic mutant *Ol* carries variable tandem repeats of FAD2-1, a seed-specific oleoyl-phosphatidyl choline desaturase / G. F. Schuppert, S. Tang, M. B. Slabaugh [et al.] // *Molecular Breeding*. – 2006. – Vol. 17, No. 3. – P. 241–256. – DOI 10.1007/s11032-005-5680-y.
243. Seiler, G. J. Genetic resources of the sunflower crop wild relatives for resistance to sunflower broomrape / G. J. Seiler // *Helia*. – 2019. – Vol. 42, No. 71. – P. 127–143. – DOI 10.1515/helia-2019-0012.
244. Seiler, G. J. Utilization of sunflower crop wild relatives for cultivated sunflower improvement / G. J. Seiler, L. L. Qi, L. F. Marek // *Crop Science*. – 2017. – Vol. 57, No. 3. – P. 1083–1101. – DOI 10.2135/cropsci2016.10.0856.
245. Serieys, H. Identification, study and utilization in breeding programs of new CMS sources in the FAO sunflower subnetwork / H. Serieys // *Proceedings of the 2005 Sunflower Subnetwork Progress Report*. – Rome : FAO, 2005. – P. 47–53.
246. Shabana, Y. M. Granular Pesta formulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* for biological control of sunflower broomrape: efficacy and shelf-life / Y. M. Shabana, D. Müller-Stöver, J. Sauerborn // *Biological Control*. – 2003. – Vol. 26, No. 2. – P. 189–201. – DOI 10.1016/S1049-9644(02)00130-5.

247. Shevchenko, S. Control of weeds and sunflower broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.) in sunflower crops by crop rotation and tillage / S. Shevchenko, L. Desyatnyk, M. Shevchenko [et al.] // International Journal of Environmental Studies. – 2024. – Vol. 81, No. 1. – P. 382–392. – DOI 10.1080/00207233.2024.2320031.
248. Shi, B. Recent progress on sunflower broomrape research in China / B. Shi, J. Zhao // OCL. – 2020. – Vol. 27. – P. 30. – DOI 10.1051/ocl/2020023.
249. Škorić, D. Sunflower breeding / D. Škorić // Sunflower genetics and breeding: international monography / D. Škorić, Z. Sakač, eds. – Novi Sad : Serbian Academy of Sciences and Arts, Branch in Novi Sad, 2012. – P. 164–344.
250. Škorić, D. Sunflower breeding for resistance to abiotic and biotic stresses / D. Škorić // Abiotic and biotic stress in plants: recent advances and future perspectives / A. K. Shanker, C. Shanker, eds. – IntechOpen, 2016. – P. 585–635. – DOI 10.5772/62159.
251. Škorić, D. Sunflower breeding for resistance to broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.) / D. Škorić, M. Păcureanu // Proceedings of the International Symposium “Sunflower breeding on resistance to diseases”, Krasnodar, Russia. – 2010. – P. 19–30.
252. Soldatov, K. I. Chemical mutagenesis in sunflower breeding / K. I. Soldatov // Proceedings of the 7th International Sunflower Conference, Krasnodar, USSR, June 27–July 3, 1976. – Vlaardingen, the Netherlands : International Sunflower Association, 1976. – P. 352–357
253. Stewart, G. R. The physiology and biochemistry of parasitic angiosperms / G. R. Stewart, M. C. Press // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. – 1990. – Vol. 41. – P. 127–151. – DOI 10.1146/annurev.pp.41.060190.001015.
254. Strelnikov, E. The environmentally safe method of control of broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.) parasitizing on sunflower / E. Strelnikov, T. Antonova, L. Gorlova [et al.] // BIO Web of Conferences. – 2020. – Vol. 21. – P. 00039. – DOI 10.1051/bioconf/20202100039.

255. Talukder, Z. I. A high-density SNP map of sunflower derived from RAD-sequencing facilitating fine-mapping of the rust resistance gene *R₁₂* / Z. I. Talukder, L. Gong, B. S. Hulke [et al.] // PLOS ONE. – 2014. – Vol. 9, No. 7. – e98628. – DOI 10.1371/journal.pone.0098628.
256. Talukder, Z. I. Candidate gene association mapping of Sclerotinia stalk rot resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.) uncovers the importance of COI1 homologs / Z. I. Talukder, B. S. Hulke, L. Qi [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2014. – Vol. 127, No. 1. – P. 193–209. – DOI 10.1007/s00122-013-2210-x.
257. Tang, S. Genetic mapping of the *Or₅* gene for resistance to *Orobanch*e race E in sunflower / S. Tang, A. Heesacker, V. K. Kishore [et al.] // Crop Science. – 2003. – Vol. 43, No. 3. – P. 1021–1028. – DOI 10.2135/cropsci2003.1021.
258. Terzić, S. Gene banks for wild and cultivated sunflower genetic resources / S. Terzić, M.-C. Boniface, L. F. Marek [et al.] // OCL. – 2020. – Vol. 27. – P. 9. – DOI 10.1051/ocl/2020004.
259. Thermo Fisher Scientific. Multiple primer analyzer [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html> (дата последнего обращения: 20.12.2025).
260. Tiwari, A. Use of molecular technologies in plant breeding / A. Tiwari, S. K. Tikoo, S. P. Angadi [et al.] // Market-driven plant breeding for practicing breeders. – Singapore : Springer, 2022. – P. 157–203. – https://doi.org/10.1007/978-981-19-5434-4_5
261. Torchiano, M. effsize: efficient effect size computation : R package / M. Torchiano. – 2020. – R package version 0.8.1. – DOI 10.5281/zenodo.1480624. – URL: <https://CRAN.R-project.org/package=effsize> (дата последнего обращения: 20.07.2025).
262. Tyagi, A. Genomics-assisted breeding: a powerful breeding approach for improving plant growth and stress resilience / A. Tyagi, Z. A. Mir,

- M. A. Almalki [et al.] // *Agronomy*. – 2024. – Vol. 14, No. 6. – P. 1128. – DOI 10.3390/agronomy14061128.
263. Ueno, K. Heliolactone, a non-sesquiterpene lactone germination stimulant for root parasitic weeds from sunflower / K. Ueno, T. Furumoto, S. Umeda [et al.] // *Phytochemistry*. – 2014. – Vol. 108. – P. 122–128. – DOI 10.1016/j.phytochem.2014.09.018.
264. Van Der Plank, J. E. Horizontal (polygenic) and vertical (oligogenic) resistance against blight / J. E. Van Der Plank // *American Potato Journal*. – 1966. – Vol. 43, No. 2. – P. 43–52. – DOI 10.1007/BF02871406.
265. Varshney, R. K. Designing future crops: genomics-assisted breeding comes of age / R. K. Varshney, A. Bohra, J. Yu [et al.] // *Trends in Plant Science*. – 2021. – Vol. 26, No. 6. – P. 631–649. – DOI 10.1016/j.tplants.2021.03.010.
266. Vear, F. Breeding disease-resistant sunflowers / F. Vear // *CABI Reviews*. – 2017. – Vol. 12, No. 035. – P. 1–11. – DOI 10.1079/PAVSNR201712035.
267. Vear, F. The genetics of resistance to five races of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) / F. Vear, L. Gentzbittel, J. Philippon [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1997. – Vol. 95, No. 4. – P. 584–589. – DOI 10.1007/s001220050599.
268. Vear, F. Changes in sunflower breeding over the last fifty years / F. Vear // *OCL*. – 2016. – Vol. 23, No. 2. – D202. – DOI 10.1051/ocl/2016006.
269. Velasco, L. Novel variation for the tocopherol profile in a sunflower created by mutagenesis and recombination / L. Velasco, B. Pérez-Vich, J. M. Fernández-Martínez // *Plant Breeding*. – 2004. – Vol. 123, No. 5. – P. 490–492. – DOI 10.1111/j.1439-0523.2004.01012.x.
270. Velasco, L. Inheritance of resistance to sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in an interspecific cross between *Helianthus annuus* and *Helianthus debilis* subsp. *tardiflorus* / L. Velasco, B. Pérez-Vich, A. A. M. Yassein [et al.] // *Plant Breeding*. – 2012. – Vol. 131, No. 2. – P. 220–221. – DOI 10.1111/j.1439-0523.2011.01915.x.

271. Ventimiglia, M. Genome-wide identification and characterization of exapted transposable elements in the large genome of sunflower (*Helianthus annuus* L.) / M. Ventimiglia, G. Marturano, A. Vangelisti [et al.] // The Plant Journal. – 2023. – Vol. 113, No. 4. – P. 734–748. – DOI 10.1111/tpj.16078.
272. Vieira, R. A. Optimizing the selection of quantitative traits in plant breeding using simulation / R. A. Vieira, A. P. O. Nogueira, R. Fritsche-Neto // Frontiers in Plant Science. – 2025. – Vol. 16. – P. 1495662. – DOI 10.3389/fpls.2025.1495662.
273. Viguié, A. Inheritance of several sources of resistance to Phomopsis stem canker (*Diaporthe helianthi* Munt.-Cvet.) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) / A. Viguié, D. Touvieille de Labrouhe, F. Vear // Euphytica. – 2000. – Vol. 116, No. 2. – P. 167–179. – DOI 10.1023/A:1004006815722.
274. Vrânceanu, A. V. Virulence groups of *Orobanche cumana* Wallr., differential hosts & resistance sources and genes in sunflower / A. V. Vrânceanu, V. A. Tudor, F. M. Stoenescu, N. Pirvu // Proceedings of the 9th International Sunflower Conference, Torremolinos, Spain. – Paris, France : International Sunflower Association, 1980. – Vol. 1. – P. 74–82.
275. Wang, X. GMATA: an integrated software package for genome-scale SSR mining, marker development and viewing / X. Wang, L. Wang // Frontiers in Plant Science. – 2016. – Vol. 7. – P. 1350. – DOI 10.3389/fpls.2016.01350.
276. Wickham, H. Data analysis / H. Wickham // ggplot2: elegant graphics for data analysis. – Cham : Springer, 2016. – P. 189–201. – DOI 10.1007/978-3-319-24277-4_9.
277. Xi, J. Microbial community roles and chemical mechanisms in the parasitic development of *Orobanche cumana* / J. Xi, B. Lei, Y.-X. Liu [et al.] // iMeta. – 2022. – Vol. 1, No. 3. – e31. – DOI 10.1002/imt2.31.
278. Xu, T. Silicon fertilization improves sunflower rhizosphere microbial community structure and reduces parasitism by *Orobanche cumana* Wallr. / T. Xu, J. Ke, Y. Wang [et al.] // Agronomy. – 2024. – Vol. 14, No. 6. – P. 1312. – DOI 10.3390/agronomy14061312

279. Yang, C. Seed treatment with salicylic acid invokes defence mechanism of *Helianthus annuus* against *Orobanche cumana* / C. Yang, L. Y. Hu, B. Ali [et al.] // *Annals of Applied Biology*. – 2016. – Vol. 169, No. 3. – P. 408–422. – DOI 10.1111/aab.12311.
280. Yang, C. Transcriptional profiling of underground interaction of two contrasting sunflower cultivars with the root parasitic weed *Orobanche cumana* / C. Yang, F. Fu, N. Zhang [et al.] // *Plant and Soil*. – 2020. – Vol. 450, No. 1–2. – P. 303–321. – DOI 10.1007/s11104-020-04495-3.
281. Ye, J. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction / J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya [et al.] // *BMC Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 13. – P. 134. – DOI 10.1186/1471-2105-13-134.
282. Ye, X. Assessing the performance of maize (*Zea mays* L.) as trap crops for the management of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) / X. Ye, M. Zhang, M. Zhang [et al.] // *Agronomy*. – 2020. – Vol. 10, No. 1. – P. 100. – DOI 10.3390/agronomy10010100.
283. Yi, L. Chromosome-level genome assemblies of sunflower oilseed and confectionery cultivars / L. Yi, H. Bao, Y. Wu [et al.] // *Scientific Data*. – 2025. – Vol. 12. – P. 24. – DOI 10.1038/s41597-024-04097-z.
284. Yoder, J. I. Host plant resistance to parasitic weeds; recent progress and bottlenecks / J. I. Yoder, J. D. Scholes // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2010. – Vol. 13, No. 4. – P. 478–484. – DOI 10.1016/j.pbi.2010.04.011
285. Yoneyama, K. Characterization of strigolactones exuded by Asteraceae plants / K. Yoneyama, X. Xie, T. Kisugi [et al.] // *Plant Growth Regulation*. – 2011. – Vol. 65, No. 3. – P. 495–504. – DOI 10.1007/s10725-011-9620-z.
286. Zeinalzadeh-Tabrizi, H. Assessment of genetic diversity among sunflower genotypes using microsatellite markers / H. Zeinalzadeh-Tabrizi, K. Haliloglu, M. Ghaffari [et al.] // *Molecular Biology Research Communications*. – 2018. – Vol. 7, No. 3. – P. 143–152. – DOI 10.22099/mbrc.2018.30434.1340.

287. Zhang, W. Some soybean cultivars have ability to induce germination of sunflower broomrape / W. Zhang, Y. Ma, Z. Wang [et al.] // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8, No. 3. – e59715. – DOI 10.1371/journal.pone.0059715.
288. Zhang, Z. W. Discovery and introgression of the wild sunflower-derived novel downy mildew resistance gene *Pl₁₉* in confection sunflower (*Helianthus annuus* L.) / Z. W. Zhang, G. J. Ma, J. Zhao [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2017. – Vol. 130, No. 1. – P. 29–39. – DOI 10.1007/s00122-016-2786-z.
289. Zhao, N. Further investigations on the occurrence patterns of multiple broomrape species in Xinjiang China / N. Zhao, M. Zhong, T. L. Grey [et al.] // Crop Protection. – 2025. – Vol. 197. – P. 107287. – DOI 10.1016/j.cropro.2025.107287.
290. Zuur, A. F. Mixed effects models and extensions in ecology with R / A. F. Zuur, E. N. Ieno, N. J. Walker [et al.]. – New York : Springer, 2009. – XXII, 574 p. – DOI 10.1007/978-0-387-87458-6.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А – Результаты анализа изученных локусов у родительских линий подсолнечника

Таблица А1 – Результаты анализа изученных локусов у 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

Приложение Б – Результаты ПЦР с разработанными ДНК-маркерами

Таблица Б1 – Результаты ПЦР с разработанными ДНК-маркерами

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

*длина амплифицированного фрагмента ДНК

**наличие специфичного ПЦР-продукта

***отсутствие ПЦР-продукта

**Приложение В – Описание линий, проанализированных с помощью
мультиплексной ПЦР с маркерами RORS1/SORS1**

Таблица В1 – Описание линий, проанализированных с помощью мультиплексной ПЦР с маркерами RORS1/SORS1

№ дорожки	Название	Описание
1	СИ Честер	Устойчивый гибрид
2	BK680	Восприимчивая линия
3	Ку686	Восприимчивая линия
4	RGP1	Устойчивая линия
5	RGB	Устойчивая линия
6	RGP2	Устойчивая линия
7	2RGNV	Устойчивая линия
8	RGA	Устойчивая линия
9	RGL1	Устойчивая линия
10	RG	Устойчивая линия
11	RGN	Устойчивая линия
12	RGM	Устойчивая линия
13	RGL2	Устойчивая линия
14	2RGB	Устойчивая линия
15	2RGA	Устойчивая линия
16	F ₁ BK678 × RGM	Гибрид восприимчивой и устойчивой линий
17	F ₁ BK680 × RGP1	Гибрид восприимчивой и устойчивой линий
18	F ₁ BK680 × RGM	Гибрид восприимчивой и устойчивой линий
19	F ₁ BK680 × RGL2	Гибрид восприимчивой и устойчивой линий
20	F ₁ BK680 × RGL1	Гибрид восприимчивой и устойчивой линий
21	BA760	Восприимчивая линия
22	Ку693	Восприимчивая линия
23	BK585	Восприимчивая линия
24	BK508	Восприимчивая линия
25	BK551	Восприимчивая линия
26	BK304	Восприимчивая линия
27	BK580	Восприимчивая линия
28	BA389	Восприимчивая линия
29	BA568	Восприимчивая линия

**Приложение Г – Описание линий, проанализированных с помощью
мультиплексной ПЦП с маркерами RORS1/SORS9**

Таблица Г1 – Описание линий, проанализированных с помощью мультиплексной ПЦП с маркерами RORS1/SORS9

№ дорожки	Название	Описание
1	RGM	Устойчивая линия
2	F ₁ BK680 × RGM	Гибрид восприимчивой и устойчивой линий
3	F ₁ BK680 × RGP1	Гибрид восприимчивой и устойчивой линий
4	BK678	Восприимчивая линия
5	RGB	Устойчивая линия
6	F ₁ BK678 × RGP1	Гибрид восприимчивой и устойчивой линий
7	RG	Устойчивая линия
8	BK304	Восприимчивая линия
9	BK551	Восприимчивая линия
10	BA389	Восприимчивая линия
11	BA568	Восприимчивая линия
12	BK508	Восприимчивая линия
13	F ₁ BK678 × RGM	Гибрид восприимчивой и устойчивой линий

**Приложение Д – Описание коммерческих гибридов различных
селекционных компаний и результаты их анализа**

Таблица Д1 – Описание коммерческих гибридов различных селекционных компаний и результаты их анализа с помощью двух разработанных маркерных систем

Название	Устойчивость к заразихе по информации оригинатора	Генотип по системе ДНК- маркеров для классической ПЦР	Генотип по ДНК- маркеру в реальном времени	Оригинатор
ЕС Аргентик СУ	A-G+	RS	RS	Lidea (Euralis)
ЕС Аркадия СУ	A-G	RS	RS	Lidea (Euralis)
Баско	A-G	RS	RS	Strube
Воллкано КЛП	A-E	S	S	RAGT
Дункан КЛП	A-G	RS	RS	Syngenta
ЕС Андромеда	A-G	RS	RS	Lidea (Euralis)
ЕС Артик	A-G	RS	RS	Lidea (Euralis)
ЕС Белла	A-G	RS	RS	Lidea (Euralis)
ЕС Бесана	A-G	RS	RS	Lidea (Euralis)
ЕС Ниагара	A-G	RS	RS	Lidea (Euralis)
ЕС Старбелла	A-G	RS	RS	Lidea (Euralis)
ЕС Электрик	A-G	RS	RS	Lidea (Euralis)
Имидор	A-F	S	S	Strube
Интерстеллар	A-E	S	S	RAGT
Конквест	A-F	S	S	MAS SEEDS
Кречет	A-E	S	S	АКТИВ АГРО
ЛГ 50479 CX	A-F	RS	RS	Limagrain
ЛГ 5400 XO	A-G	RS	RS	Limagrain
ЛГ 5452 XO КЛ	A-G	RS	RS	Limagrain
ЛГ 5580	A-G	RS	RS	Limagrain
ЛГ 59580	A-G	RS	RS	Limagrain
Макстор	A-G+	RS	RS	MAY Seed

Марисан	A-G	RS	RS	Strube
Мас 80 ИР	A-E	S	S	MAS SEEDS
MAC 82.A	A-E	S	S	MAS SEEDS
Мас 83 Р	A-E	S	S	MAS SEEDS
Мас 85 СУ	A-E	S	S	MAS SEEDS
MAC 880.СУ	A-G	RS	RS	MAS SEEDS
Мас 92 КП	A-E	S	S	MAS SEEDS
MAC 96.П	A-G	RS	RS	MAS SEEDS
Муглли	A-E	S	S	RAGT
НК Брио	A-E	S	S	Syngenta
НК Неома	A-E	S	S	Syngenta
НС X 6054	A-G	R	R	Institut za ratarstvo i povrtarstvo
Орфео	A-G	RS	RS	Strube
П 64 ЛЦ 108	A-G+	RS	RS	PIONEER
П 64 ЛЕ 20	A-G	RS	RS	PIONEER
П 63 ЛЕ 10	A-E	S	S	PIONEER
П 64 ЛЕ 137	A-G	RS	RS	PIONEER
П 64 ЛЛ 155	A-E	S	S	PIONEER
П 64 ЛП 130	A-G	RS	RS	PIONEER
П 64 ЛП 140	A-G	RS	RS	PIONEER
П 64 ХЕ 118	A-E	S	S	PIONEER
П 64 ХЕ 144	A-E	S	S	PIONEER
Романтик	A-G	RS	RS	Lidea (Euralis)
Серджио	A-G	RS	RS	Strube
СИ Авенджер	A-G	RS	RS	Syngenta
СИ Арко	A-G	RS	RS	Syngenta
СИ Катана	A-G	RS	RS	Syngenta
СИ Левис	A-G+	RS	RS	Syngenta
Си Розета	A-G	RS	RS	Syngenta
СИ Таленто	A-E	S	S	Syngenta

СИ Честер	A-G+	RS	RS	Syngenta
СИ Эдисон	A-G	RS	RS	Syngenta
Субаро HTS	A-E	S	S	Syngenta
Сузука HTS	A-G	RS	RS	Syngenta
Суматра HTS	A-G	R	R	Syngenta
Таллисман	A-G+	R	R	RAGT semences
Тутти	A-E	S	S	Syngenta
Фаусто	A-F	S	S	Strube
Экселент	A-E	S	S	Агроплазма
Суоми	A-G	RS	R	Syngenta
Генезис	A-G	RS	R	Lidea (Euralis)
ЕС Новамис	A-G	RS	R	Lidea (Euralis)
Целсо	A-F	RS	R	Strube
П 64 ЛЕ 25	Система 2	S	S	PIONEER
ЕС Ароматик	A-G	RS	RS	Lidea (Euralis)
ЕС Белфис	A-G+	RS	RS	Lidea (Euralis)
Эпсилон	A-G	R	R	Галактика
Волльф	A-G+	RS	RS	RAGT semences
МАС 87.А	A-E	S	S	MAS SEEDS

Приложение Е – Акт о внедрении результатов диссертационной работы

«Утверждаю»

Заместитель директора по научной работе
ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, д-р с.-х. наук

 Трунова М.В.
« 29 » сентября 2026 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы
в производственный процесс

Мы, нижеподписавшиеся, представители Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В. С. Пустовойта», составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы Савиченко Дмитрия Леонидовича на тему «Исследование устойчивости подсолнечника к расе GRU заразики с использованием молекулярно-генетических подходов и разработка ДНК-маркеров данного признака для применения в селекции» внедрены и используются в селекционном процессе по созданию устойчивых к заразики линий, сортов и гибридов подсолнечника.

В период с 2023 года по настоящее время в практическую селекционную работу внедрены разработанные в рамках диссертационного исследования способы молекулярно-генетического анализа, защищенные патентами Российской Федерации на изобретения № 2830955 С1 (2024) и № 2851468 С1 (2025). Разработанные подходы применяются для маркер-вспомогательного отбора селекционного материала подсолнечника по аллельному состоянию гена *HaOr7*, контролирующего устойчивость к расе G заразики.

Практическое применение включает отбор гомозиготных устойчивых растений в популяциях F₂-F₅ при создании сортов и линий подсолнечника, контроль гибридов F₁ и закрепления целевого гена устойчивости у инбредных линий. Массовое генотипирование селекционного материала позволяет проводить предварительный отбор и значительно сокращать объем трудоемкой фитопатологической оценки на зараженном фоне.

В результате применения разработанных методов были созданы устойчивые к заразики: гибриды СТЕАРИН, СУРУС ОР, ПРОТЕКТОР и ЛАВРУС; линии ВК 305 ВС, ВК 305 СУР, ВК 21 СУР ЗУ, ВК 678 ЗУ и ВК551 ЗУ ЛМРУ; крупноплодный кондитерский сорт КАЗАК.

Заведующий лабораторией
генетики, д-р биол. наук

Заведующий лабораторией
селекции сортов подсолнечника,
канд. с.-х. наук

Заведующий отделом селекции и
первичного семеноводства
подсолнечника, канд. с.-х. наук



Демури Я.Н.



Децына А.А.



Хатнянский В.И.