

УДК 575.11.113:854.78

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНОТИПІВ СОНЯШНИКА ГІБРИДНОГО ПОХОДЖЕННЯ ЗА МАРКЕРАМИ ГЕНА Pl_{ARG} СТІЙКОСТІ ДО НЕСПРАВЖНЬОЇ БОРОШНИСТОЇ РОСИ

А.Є. СОЛОДЕНКО, В.І. ФАЙТ

Селекційно-генетичний інститут—Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення Національної академії аграрних наук України
65036 Одеса, Овідіопольська дорога, 3
e-mail: angelika_solo@yahoo.com

Молекулярно-генетичним методом досліджено гібриди F_1 та F_2 соняшника, отримані з метою інтрогресії гена Pl_{ARG} стійкості до несправжньої борошністої роси (НБР). Показано можливість ідентифікації та маркерного добору гібридних рослин від схрещувань лінії-носія гена Pl_{ARG} RHA 419 з лініями селекції СГІ—НЦНС ОС 1019В, ОС 1029В за аелями мікросателітних локусів *ORS610*, *ORS1039*, які фланкують цей ген і зчеплені з ним на генетичних відстанях відповідно 2,1 і 0,3 сМ. Із популяцій F_2 відібрано рослини, які за генотипом відповідають батьківській лінії RHA 419 і в подальшому можуть бути використані для створення інбредних ліній з генетично зумовленою стійкістю до всіх відомих на сьогодні рас НБР.

Ключові слова: *Helianthus annuus*, *Plasmopara halstedii*, ДНК-маркери, ген Pl_{ARG} , несправжня борошніста роса.

Несправжня борошніста роса — одне з найбільш шкочочинних захворювань соняшника у світі. Його збудником є гриб класу ооміцетів *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & de Toni. *P. halstedii* поширений у всіх основних регіонах вирощування соняшника. Щорічно виявляють епіфітотії, за яких рівень ураженості може сягати 60 %, а втрати врожаю — до 50 % [1].

Останні десятиліття ознаменувалися кардинальними змінами у вивченні генетики рослин, що пов'язано з використанням ДНК-маркерів [11]. Розвинулись методи молекулярного маркування і селекція вийшла на якісно новий рівень. ДНК-маркери є основою MAS-технології (MAS — marker assisted selection, добір за допомогою маркерів). MAS сприяє істотному збільшенню ефективності селекційного процесу шляхом переходу від «добору за фенотипом» до «добору за геном», що набуває особливого значення в програмах з інтрогресії конкретних алелів генів, які контролюють стійкість до захворювань, інші адаптивно значущі й господарсько цінні ознаки [18].

Сьогодні більш затребувані маркери, які входять до структури певного гена або щільно зчеплені з ним. Найбільш вживаними в MAS проєктах є мікросателітні, або SSR-маркери (simple sequences repeats, прості за послідовністю повтори), які значно поширені в геномах рослин і характеризуються високим рівнем поліморфізму й кодомінантним типом

успадкування [8]. Для соняшника запропоновано понад 2000 SSR-маркерів, за допомогою яких здійснюють генетичне картування певних генів [9, 16, 19, 22, 25]. Зокрема виявлено маркери для ідентифікації генів стійкості до іржі R_4 , R_5 , R_{13} [18], Or_5 гена стійкості до вовчка [20], а також для ідентифікації локусів, пов'язаних із проявом стійкості до білої гнилі [6, 24]. Запропоновано маркери Pl генів стійкості до НБР [7, 14, 15, 23]. У селекційних програмах на Півдні України основну увагу варто приділяти передусім генам $Pl8$ та Pl_{ARG} [4], з якими пов'язана стійкість до всіх відомих на сьогодні рас $P. halstedii$ у цьому регіоні. Гени $Pl8$ та Pl_{ARG} локалізовані відповідно в 13- і 1-й групах зчеплення генетичної карти геному соняшника [7]. Наявність ДНК-маркерів, за якими можна ідентифікувати ген Pl_{ARG} у різноманітному матеріалі [2–4], надає першочергового значення носіям цього гена при створенні сучасних ліній і гібридів соняшника.

Впровадження у традиційний селекційний процес молекулярних маркерів для підвищення ефективності добору рослин із генетично детермінованою стійкістю та істотного скорочення обсягу польових робіт потребує проведення попередніх досліджень із вивчення їхньої ефективності при доборі. Маркери необхідно верифікувати на матеріалі, який використовують у певних селекційних програмах.

Метою роботи була ідентифікація гетерозиготних у F_1 та гомозиготних за геном Pl_{ARG} у F_2 рослин за мікросателітними маркерами.

Методика

Як вихідний матеріал для дослідження використовували стійку до несправжньої борошнистої роси лінію RHA 419 — носія гена Pl_{ARG} , що походить від ARG 1575-2 (cmsHA89 × *Helianthus argophyllus* L.) [13], самозапилені лінії-відновники фертильності пилку соняшника ОС 1019В та ОС 1029В селекції Селекційно-генетичного інституту—Національного центру насіннезнавства та сортовивчення (СГІ—НЦНС), а також гібриди F_1 і сегреганти популяцій F_2 від схрещування RHA 419 × ОС 1029В та RHA 419 × ОС 1019В. Насінневий і рослинний матеріал для дослідження люб'язно надав завідувач відділу селекції та насінництва гібридного соняшника СГІ—НЦНС канд. с.-г. наук Б.Ф. Вареник.

ДНК виділяли цетавлоновим методом із сухих листків індивідуальних рослин F_1 і F_2 або індивідуальних три—п'ятидобових проростків F_1 та 10 проростків кожного з батьків. Ампліфікацію здійснювали на приладі «Терцик» (ДНК-технологія, Росія). Склад реакційної суміші: буфер для Dream Taq-полімерази, 1 одиниця активності Dream Taq-полімерази (Fermentas, Литва), 0,2 мкМ кожного праймера, 0,2 мМ кожного dNTP, 20 нг ДНК. Умови ампліфікації: початкова денатурація 2 хв при 94 °С; 30 циклів — 20 с при 60 °С, 30 с при 72 °С, 20 с при 92 °С; фінальна елонгація 5 хв. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили в поліакриламідному гелі (10 % акриламід, 1 × *tris*-боратний буфер) із наступною візуалізацією нітратом срібла. Документували отримані електрофореграми цифровою фотокамерою. Молекулярний розмір фрагментів ДНК визначали за допомогою програми «GelAnalyzer 2010» відносно маркерів розмірів фрагментів ДНК: GeneRuler 50 bp, pUC 19/MspI. Інформацію про нуклеотидні послідовності праймерів для аналізу мікросателітних локусів отримали з бази даних [21].

Результати та обговорення

Попереднім етапом маркування будь-якого гена є виявлення фрагментів ДНК, якими різняться генотипи-носії альтернативних алелів конкретного локусу. У зв'язку з цим для виявлення молекулярно-генетичного поліморфізму між лінією RHA 419, у генотипі якої є ген Pl_{ARG} , та інбредними лініями-відновниками фертильності пилку селекції СГІ—НЦНС ОС 1019В, ОС 1029В використовували п'ять мікросателітних локусів 1-ї групи зчеплення генетичної карти соняшника: *ORS610*, *ORS509*, *ORS1182*, *ORS1039*, *ORS605*. Детекція певних алелів за цими локусами дала змогу ідентифікувати генотипи-носії гена Pl_{ARG} : зразки дикого однорічного виду *Helianthus argophyllus* та похідну від нього лінію RHA 419 [2].

При використанні праймерів до вищеназваних п'яти мікросателітних локусів показано відмінності лінії донора гена Pl_{ARG} RHA 419, з одного боку, та ліній ОС 1019В, ОС 1029В — з іншого (табл. 1). На електрофореграмах у спектрах продуктів ампліфікації ДНК ліній ОС 1019В і ОС 1029В, які до речі виявилися однаковими, є фрагменти розміром 200 (локус *ORS509*), 202 (*ORS605*), 147 (*ORS610*), 205 (*ORS1039*) та 170 пн (*ORS509*). У свою чергу, в генотипі лінії RHA 419 містяться алелі мікросателітних локусів 1-ї групи зчеплення: 197 (*ORS605*), 130 (*ORS610*), 190 (*ORS1039*), 207 (*ORS509*) та 165 пн (*ORS1182*), що можуть бути рекомендовані як потенційні маркери при ідентифікації гібридних рослин F_1 та добору з популяцій F_2 , що розщеплюються.

Для підтвердження цього висновку проаналізували 30 насінин «потенційних» F_1 , отриманих від схрещування за індивідуальною схемою «кошик на кошик» лінії RHA 419 з лінією ОС 1019В чи ОС 1029В без використання штучної кастрації рослин. Оскільки рослини лінії RHA 419 і ліній ОС 1019В, ОС 1029В є фертильними, то в кожному кошику і материнської, і батьківської форми можливе формування насіння як гібридної, так і самозапильної природи. Так, при використанні праймерів до мікросателітного локусу *ORS1039* у кожній комбінації схрещування виявили два класи насінин: гетерозиготні, тобто F_1 , що поєднували в своєму генотипі алелі 205 і 190 пн (рис. 1, доріжки 1, 7, 10, 11), та гомозиготні, в генотипі яких виявлено лише один алель однієї з батьківських ліній (див. рис. 1, доріжки 2, 3, 8 — алель 190 пн, характерний для RHA 419; доріжки 4, 5 — алель 205 пн, характерний для ОС 1029В).

Разом з тим у кожній із комбінацій схрещування RHA 419 × ОС 1029В чи RHA 419 × ОС 1019В в кошиках лінії RHA 419 сформувалися як гібридні насінини, так і від самозапилення, а в кошиках лінії ОС 1029В або ОС 1019В — тільки від самозапилення. Наявність гібридних насінин у кошиках лінії RHA 419 та їх відсутність у кошиках ліній ОС 1029В,

ТАБЛИЦЯ 1. Генотипи досліджених ліній за алелями маркерних мікросателітних локусів

Лінія	Алель, пн				
	ORS509	ORS605	ORS610	ORS1039	ORS1182
RHA 419	207	197	130	190	165
ОС 1019В	200	202	147	205	170
ОС 1029В	200	202	147	205	170

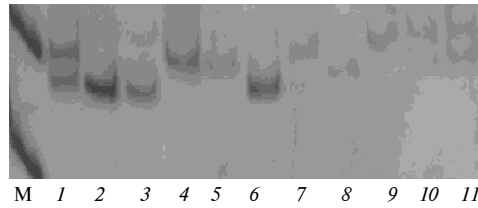


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК ліній RHA 419 (6), OC 1029B (9) та окремих насінин F_1 RHA 419 \times OC 1029B за мікросателітним локусом *ORS1039*. М — маркер розміру фрагментів ДНК Gene Ruler 50 bp (фрагменти 150 і 200 пн)

OC 1019B може бути наслідком двох причин. По-перше, дещо різні терміни цвітіння, коли прийомочки ліній OC 1029B чи OC 1019B ще не готові до запліднення пилком лінії RHA 419. По-друге, походження лінії RHA 419, що отримана внаслідок міжвидової гібридизації. Як уже зазначалось, лінія RHA 419 — похідна від лінії ARG1575-2, яка, у свою чергу, є $BC_2 F_5$ HA89 \times *H. argophyllus*. Якщо ген Pl_{ARG} міститься в генотипі лінії RHA 419 у вигляді великої транслокації, це може позначатися на ймовірності гамет брати участь у формуванні життєздатних зигот [5]. Як правило, в останньому випадку частота передачі ознаки в низці поколінь знижена, більшою мірою через чоловічі гамети. Інформація щодо можливого розміру інтрогресованого сегмента хромосоми *H. argophyllus*, що містить ген Pl_{ARG} , у лінії RHA 419 відсутня. Автори праці [23] припустили, що лінія ARG1575-2 містить 12,5–12,7 % послідовностей геному *H. argophyllus* після двох бекросів з HA89. Водночас показано, що при доборі за фенотипом при внутрішньовидових схрещуваннях навіть у поколінні BC_3 фрагмент хромосоми донора з цільовим геном може становити 94 % вихідного розміру хромосоми [17].

У подальшому для оцінювання гібридності рослин F_1 комбінацій схрещування RHA 419 \times OC 1029B та RHA 419 \times OC 1019B окрім локусу *ORS1039* додатково використовували локус *ORS610*. Ці локуси фланкують ген Pl_{ARG} і зчеплені з ним на генетичних відстанях відповідно 2,1 та 0,3 сМ [23]. Ідентифікація генотипів зазначеними маркерами 16 рослин «потенційних гібридів» F_1 комбінації схрещування RHA 419 \times OC 1029B дала змогу встановити, що всі 16 рослин — гетерозиготи за обома локусами. Водночас із 16 рослин комбінації схрещування RHA 419 \times OC 1019B 11 виявились гібридами F_1 , у генотипі яких поєднані алелі обох батьківських ліній (рис. 2, доріжки 4–7), а 5 рослин були результатом самозапилення (див. рис. 2, доріжки 1–3, 8–10).

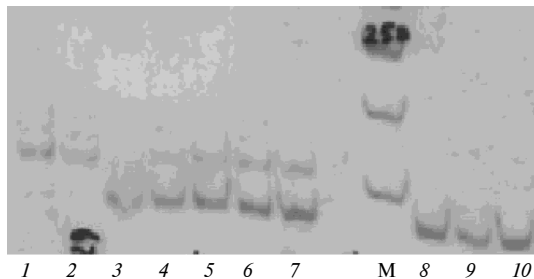


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК рослин F_1 RHA 419 \times OC 1029B за мікросателітним локусом *ORS610*. М — маркер розміру фрагментів ДНК Gene Ruler 50 bp (фрагменти 150, 200, 250 пн)

ТАБЛИЦЯ 2. Розщеплення за алелями мікросателітних локусів *ORS610*, *ORS1039* індивідуальних рослин F_2 популяцій *RHA 419* × *OC 1019B*, *RHA 419* × *OC 1029B*

Алель, пн		Теоретично очікувано	Фактично отримано	
<i>ORS610</i>	<i>ORS1039</i>		<i>RHA 419</i> × <i>OC 1019B</i>	<i>RHA 419</i> × <i>OC 1029B</i>
147	205	7,5	10	9
147—130	205—190	15	19	17
130	190	7,5	1	4
		$\chi^2_{1:2:1}$ 7,56	2,19	

Індивідуальні рослини F_2 популяції *RHA 419* × *OC 1019B*, *RHA 419* × *OC 1029B* (по 30 шт. у кожній), отримані від самозапилення гібридних рослин F_1 , за наявності або відсутності того чи іншого алеля локусів *ORS610*, *ORS1039* унаслідок кодомінантного характеру успадкування мікросателітної ДНК можна поділити на три класи (табл. 2). Перший клас сформували рослини, в генотипі яких є алелі лінії *RHA 419*, до другого увійшли рослини, що є носіями алелів, характерних для лінії *OC 1019B* чи *OC 1029B*, третій клас утворили рослини, які містять алелі обох батьків (гетерозигота). В обох комбінаціях схрещування не виявлено жодної рослини F_2 з рекомбінацією алелів локусів *ORS610* та *ORS1039*, що додатково підтверджує щільне зчеплення названих мікросателітних локусів.

ДНК-маркери, як правило, виявляють менделівський характер розщеплення [12]. Теоретично за наявності двох алелів одного локусу і відсутності селективної переваги при кодомінантному успадкуванні продуктів SSR-ПЛР у F_2 має спостерігатися розщеплення у співвідношенні: одна рослина з алелем одного батька, дві — з алелями обох батьків, одна — з алелем другого батька. В F_2 популяції *RHA 419* × *OC 1029B* розщеплення за алелями обох локусів (9 : 17 : 4) відповідало теоретично очікуваному співвідношенню (7,5 : 15 : 7,5). Критерій $\chi^2 = 2,19$ за $\chi^2_{0,05} = 5,99$ для $df = 2$. У комбінації схрещування *RHA 419* × *OC 1019B* розщеплення F_2 популяції за локусами *ORS610* або *ORS1039* не відповідало теоретично очікуваному. Критерій $\chi^2 = 7,56$ перевищував $\chi^2_{0,05} = 5,99$ для $df = 2$ переважно через значну нестачу рослин, гомозиготних за алелями, які походять від лінії *RHA 419*. Таке порушення розщеплення перш за все могло бути пов'язане з недостатньою чисельністю F_2 популяції. Однак іноді з частотою 1,8—12,5 % спостерігались відхилення від теоретично очікуваного розщеплення за окремими маркерами, що з імовірністю 9—24 % зумовлено випадковими причинами, 5—20 % — розміщенням локусу на кінці групи зчеплення і 60—82 % — в певних «гарячих точках» хромосом, які перш за все пов'язані з наявністю чужорідних транслокацій [10]. За даними авторів праці [7], ген Pl_{ARG} та мікросателітні локуси *ORS610*, *ORS1039* локалізовані саме в теломерній частині 1-ї групи зчеплення.

Отже, використання мікросателітних маркерів *ORS610*, *ORS1039* дало змогу ідентифікувати гетерозиготні у F_1 та гомозиготні за геном Pl_{ARG} у F_2 рослини та здійснити добір необхідних генотипів. Рослини F_2 — носії гена стійкості Pl_{ARG} в гомозиготному стані можуть бути використані як вихідний матеріал у селекції з метою створення нових інбредних або аналогів сучасних інбредних ліній з генетично зумовленою стійкістю до всіх відомих рас НБР.

1. *Кириченко В.В.* Селекція і семеноводство підсолнечника (*Helianthus annuus* L.). — Харків: Магда LTD, 2005. — 385 с.
2. *Солоденко А.Є., Бурлов В.В., Сиволап Ю.М.* Маркери гена стійкості соняшника до несправжньої борошністої роси // Вісн. Харків. нац. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. — 2014. — 3 (33). — С. 59–65.
3. *Солоденко А.Є., Сиволап Ю.М.* Мікросателітні маркери генів стійкості соняшника до несправжньої борошністої роси // Вісн. Одес. нац. ун-ту. Сер. Біологія. — 2014. — 19, вип. 1 (34). — С. 46–54.
4. *Солоденко А.Є., Файт В.В.* Ідентифікація джерел стійкості соняшника до несправжньої борошністої роси та вовчка за ДНК-маркерами // Вісн. Харків. нац. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. — 2016. — 3 (39). — С. 57–63.
5. *Терновська Т.К.* Перебудова геному м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) для її генетичного аналізу та інтрогресії генів: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. — К., 1999. — 32 с.
6. *Davar R., Darvishzaden R., Majd A. et al.* QTL mapping of partial resistance to basal stem rot in sunflower using recombinant inbred lines // *Phytopathol. Med.* — 2010. — 49. — P. 330–341.
7. *Duble C., Hahn V., Knapp S., Bauer R.* Pl_{ARG} from *H. argophyllus* is unlinked to other known downy mildew resistance genes in sunflower // *Theor. Appl. Genet.* — 2004. — 109. — P. 1083–1086.
8. *Gupta P.K., Varshney R.K.* The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat // *Euphytica.* — 2000. — 113. — P. 163–185.
9. *Heesacker A., Kishore V.K., Gao W. et al.* SSRs and INDELS mined from the sunflower EST database: abundance, polymorphisms and cross-taxa utility // *Theor. Appl. Genet.* — 2008. — 117. — P. 1021–1029.
10. *Kammholz S.J., Campbell A.W., Sutherland M.W. et al.* Establishment and characterization of wheat genetic mapping populations // *Aust. J. Agr. Res.* — 2001. — 52. — P. 1079–1088.
11. *Langridge P., Lagudah E.S., Holton T.A.* Trends in genetic and genome analysis in wheat: a review // *Ibid.* — P. 1043–1077.
12. *Laroche A., Demeke T., Gaudet D.A. et al.* Development of PCR marker for rapid identification of the *Bt-10* gene for common bunt resistance in wheat // *Genome.* — 2000. — 43. — P. 217–223.
13. *Miller J., Gulya T., Seiler G.* Registration of five fertility restorer sunflower germplasms // *Crop. Sci.* — 2002. — 42. — P. 989–991.
14. *Mulpuri S., Liu Z., Feng J.* Inheritance and molecular mapping of a downy mildew resistance gene, *Pl13* in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Theor. Appl. Genet.* — 2009. — 119. — P. 795–803.
15. *Pancovic D., Radovanovic N., Jovic S. et al.* Development of codominant amplified polymorphic sequence markers for resistance of sunflower to downy mildew race 730 // *Plant Breed.* — 2007. — 126 (4). — P. 440–444.
16. *Panigo N., Eschaide M., Munoz M. et al.* Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Genome.* — 2002. — 45. — P. 34–43.
17. *Pestova E., Roder M.* Microsatellite analysis of wheat chromosome 2D allows the reconstruction of chromosomal inheritance in pedigrees of breeding programmes // *Theor. Appl. Genet.* — 2002. — 106, N 1. — P. 84–91.
18. *Qi L.L., Long Y.M., Ma G.J., Markell S.G.* Map saturation and SNP marker development for the rust resistance genes (R4, R5, R13a, and R13b) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Mol. Breed.* — 2015. — 35. — P. 196–220.
19. *Talia P., Nishinakamasu V., Hopp H.E. et al.* Genetic mapping of EST-SSR, SSR and InDel to improve saturation of genomic regions in a previously developed sunflower map // *Electronic. J. Biotechnol.* — 2010. — 13. — P. 1–14.
20. *Tang S., Heesacker A., Kishore V.K. et al.* Genetic mapping of the *Or 5* gene for resistance to *Orobanche* race E in sunflower // *Crop. Sci.* — 2003. — 43. — P. 1021–1028.
21. *Tang S., Knapp S.J.* Microsatellites uncover extraordinary diversity in native American landraces and wild population of cultivated sunflower // *Theor. Appl. Genet.* — 2003. — 106. — P. 990–1003.
22. *Tang S., Yu J.K., Slabaugh M.B. et al.* Simple sequences repeat map of the sunflower genome // *Ibid.* — 2002. — 105. — P. 1124–1136.
23. *Wieckhorst S., Bachlava E., Duble C. et al.* Fine mapping of the sunflower resistance locus Pl_{ARG} introduced from the wild species *Helianthus argophyllus* // *Ibid.* — 2010. — 121. — P. 1633–1644.
24. *Yue B., Radi S.A., Vick B.A. et al.* Identifying quantitative trait loci for resistance to *Sclerotinia* head rot in two USDA sunflower germplasms // *Phytopathology.* — 2008. — 98. — P. 926–931.

25. Yu J., Tang S., Slaubaugh M.B. et al. Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower // Crop. Sci. — 2003. — 43. — P. 367—387.

Отримано 18.10.2017

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОТИПОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА ГИБРИДНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПО МАРКЕРАМ ГЕНА Pl_{ARG} УСТОЙЧИВОСТИ К ЛОЖНОЙ
МУЧНИСТОЙ РОСЕ

А.Е. Солоденко, В.И. Файт

Селекционно-генетический институт—Национальный центр семеноведения и сортоизучения Национальной академии аграрных наук Украины, Одесса

Молекулярно-генетическим методом исследованы гибриды F_1 и F_2 подсолнечника, полученные с целью интрогрессии гена Pl_{ARG} устойчивости к ложной мучнистой росе (ЛМР). Показана возможность идентификации и маркерного отбора гибридных растений от скрещиваний линии-носителя гена Pl_{ARG} RHA 419 с линиями селекции СГИ—НЦСС ОС 1019В, ОС 1029В по аллелям микросателлитных локусов *ORS610*, *ORS1039*, которые фланкируют указанный ген и сцеплены с ним на генетических расстояниях соответственно 2,1 и 0,3 сМ. Из популяций F_2 отобраны растения, которые по генотипу соответствуют родительской линии RHA 419 и в последующем могут быть использованы для создания инбредных линий с генетически обусловленной устойчивостью ко всем известным на сегодня расам ЛМР.

IDENTIFICATION OF SUNFLOWER HYBRIDS WITH MARKERS OF RESISTANCE TO
DOWNY MILDEW GENE Pl_{ARG}

A.Ye. Solodenko, V.I. Fait

Plant Breeding and Genetic Institute—National Center of Seed and Cultivars Investigation, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine
3 Odessa, Ovidiopolska road, 65036, Ukraine

Molecular-genetic investigation of F_1 and F_2 sunflower hybrids that were received for the purpose of introgression of Pl_{ARG} gene was carried out. Microsatellite loci *ORS610* and *ORS1039* that are flanking Pl_{ARG} at genetic distances of 2,1 and 0,3 cM were used. It was shown the possibility of identification of hybrid plants from population obtained from crossing Pl_{ARG} donor line RHA 419 with inbred lines ОС 1019В and ОС 1029В. Some F_2 plants with genotypes that appropriate to parent line RHA 419 were selected. They could be used in the breeding programs for creation new inbred lines with durable resistance to downy mildew.

Key words: *Helianthus annuus*, *Plasmopara halstedii*, DNA markers, Pl_{ARG} , resistance, downy mildew.