



УДК 631.523:633.854.78
DOI 10.25230/conf12-2023-43-48

ПАСПОРТИЗАЦИЯ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА СЕЛЕКЦИИ ВНИИМК С ПОМОЩЬЮ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ

Головатская А.В., Волошко А.А., Гучетль С.З.
ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК
annamoon11@gmail.com

ДНК-паспортизация сельскохозяйственных культур является необходимым элементом в селекционной и семеноводческой работе. ДНК-паспорта полезны для идентификации сельскохозяйственных культур, определении их однородности, в урегулировании вопроса защиты авторских прав. Целью исследования являлась идентификация и разработка молекулярно-генетических паспортов линий подсолнечника селекции ВНИИМК с помощью микросателлитных ДНК-маркеров. На основе полученных данных фрагментного анализа с использованием капиллярного электрофореза и электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле были составлены молекулярно-генетические паспорта линий.

Ключевые слова: подсолнечник, идентификация, паспортизация, ПЦР, SSR, фрагментный анализ.

Введение. Идентификация сельскохозяйственных культур с использованием морфологических признаков способствует поиску более удобных и надежных методов оценки генетического материала. Дополнительным, а в перспективе и основным, инструментом для надежной идентификации являются методы молекулярного маркирования [1], одним из преимуществ которых является изучение генетического материала на любых стадиях развития и из разных частей растений. За последние десятилетия молекулярно-генетические маркеры в изучении генетического разнообразия и паспортизации получили широкое применение [2]. Для генотипирования подсолнечника наиболее часто используют SSR-маркеры (Simple Sequence Repeats), что объясняется высоким уровнем полиморфизма микросателлитных локусов.



ДНК-паспортизация сельскохозяйственных культур является необходимым элементом в селекционной и семеноводческой работе. ДНК-паспорта позволят идентифицировать линии, гибриды и новые сорта, определить их однородность, помогут в урегулировании вопроса защиты авторских прав селекционных учреждений. Также полученные данные перспективно использовать при подборе родительских форм для скрещивания. Многими учеными разрабатываются эффективные маркерные системы идентификации различных сельскохозяйственных культур [3–6]. Однако общепринятого и универсального метода ДНК-идентификации и паспортизации подсолнечника на сегодняшний день нет. Поэтому необходимы углубленные исследования в области генетической паспортизации линий данной культуры. Вследствие этого целью настоящего исследования являлась идентификация и разработка молекулярно-генетических паспортов линий подсолнечника селекции ВНИИМК на основе ДНК-профилей с помощью SSR-маркеров.

Материалы и методы. Объектом исследования служили 20 линий подсолнечника селекции ВНИИМК: Кубанский 86, Кубанский 93, ВК101, ВК680, ВК678, ВК508, ВК551, ВК580, ВК585, ВК301, ВК302, ВК303, ВК304, ВК989, ВК1-клп, ВК1-ими, ВК1-сур, ВК21-клп, ВК23-ими, ВК21-сур. Исследования проводили в лаборатории молекулярно-генетических исследований отдела биологических исследований ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК. Экстракцию ДНК осуществляли из семядольных листьев семидневных этиолированных проростков подсолнечника СТАВ-способом [7]. ДНК выделяли из 5 отдельных растений. Для проведения ПЦР использовали 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 67 мМ трис-НCl, pH8,8; 16,6 мМ сульфата аммония; 1,5–3,0 мМ MgCl₂; 0,01 % Tween 20; по 0,2 мМ каждого dNTP; по 10 пМ праймеров; 10 нг матричной ДНК и 1 ед. рекомбинантной термостабильной ДНК полимеразы (НПО «Сибэнзим», РФ). Амплификацию выполняли в термоциклере MiniAmp™ plus (Thermo Scientific, США) при следующих температурно-временных режимах: начальная денатурация при 96 °С в течение 2 мин, затем 30–35 циклов при температурно-временном режиме: денатурация при 94 °С – 30 сек, отжиг при 55–60 °С – 40 сек, элонгация при 70 °С – 1 мин, финальная элонгация при 70° С – 2 мин. Температура отжига была подобрана экспериментальным путем отдельно для каждой пары праймеров. Для амплификации маркерных фрагментов ДНК применили 12 пар праймеров микросателлитных последовательностей ДНК, синтезированных ЗАО «Синтол» (Россия), ORS5, ORS1144, ORS1287, HAR432, ORS509, HAR514, ORS811, ORS1327, ORS559, HAR1796, ORS328, ORS662 [8, 9]. Детекцию продуктов ПЦР осуществляли электрофорезом в 8 % денатурирующем полиакриламидном геле, окрашенном нитратом серебра (AgNO₃). Разделение продуктов амплификации SSR-локусов ORS5, ORS1144, ORS559, HA514, ORS509, полученных с использованием пары праймеров, один из которых был флуоресцентно мечен (FAM, R6G, TAMRA или ROX), осуществляли методом капиллярного электрофореза в денатурирующих условиях на генетическом анализаторе «Нанофор-05» (ИАП РАН, РФ). Размер фрагментов определяли относительно размерного стандарта SD-600, меченным флуоресцентным красителем (Dy-632), с помощью GeneMarker software version 3.0.1. (State College, PA).

Анализ информативности микросателлитных локусов включал определение количества аллелей (n_a), эффективного числа аллелей (n_e) и индекса полиморфного информационного содержания (PIC). Вычисления проводили с помощью компьютерного программного обеспечения Gene-Calc [10] по следующим формулам:

$$n_e = 1 / \sum_{j=1}^l P_{ij}^2,$$

где n_e – эффективное число аллелей.



$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^l P_i^2 - \sum_{i=1}^{l-1} \sum_{j=i+1}^l 2P_i^2 P_j^2,$$

где – P частота j паттерна для локуса i и суммирование распространяется на n паттернов.

Для выявления различий между линиями подсолнечника использовали метод попарного внутригруппового невзвешенного среднего (UPGMA) с помощью пакета программ Statistica 10.0 [11].

Результаты и обсуждение. Для идентификации и паспортизации линий подсолнечника коллекции ВНИИМК были использованы 12 пар SSR-праймеров, апробированных в наших предыдущих исследованиях [6, 12]. Характеристики ДНК-локусов для линий подсолнечника коллекции ВНИИМК представлены в таблице 1.

Для подсолнечника коллекции ВНИИМК у SSR-локусов было выявлено от 2 до 5 аллелей, со средним числом 2,58 аллеля на локус. Общее число аллелей составило 31. Показатель эффективного числа аллелей варьировал от 1,10 до 3,08. Среднее его значение составило 2,04. Значение PIC варьировало от 0,09 до 0,63 и в среднем составило 0,48. Наибольший полиморфизм наблюдался у локусов HA 514 и ORS328 (n_a равное 3 и 5, PIC 0,52 и 0,63; n_e 2,53 и 3,08, соответственно). Наименьший полиморфизм наблюдался у локуса ORS 559 (n_a равное 2, PIC 0,09; n_e 1,10). Остальные локусы показали средний уровень полиморфизма (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика ДНК-локусов, использованных для паспортизации линий подсолнечника коллекции ЦЭБ ВНИИМК

Локус	PIC*	n_a **	n_e ***
ORS5	0,33	2,00	1,72
ORS1144	0,37	2,00	1,98
ORS1287	0,42	3,00	2,06
HAR432	0,48	3,00	2,29
ORS509	0,43	3,00	2,15
HA514	0,52	3,00	2,53
ORS811	0,35	2,00	1,83
HA1327	0,37	2,00	1,92
ORS559	0,09	2,00	1,10
HAR1796	0,35	2,00	1,78
ORS328	0,63	5,00	3,08
ORS662	0,37	2,00	1,99
Среднее	0,39	2,58	2,04

Примечание. *PIC – индекс полиморфного содержания, ** n_a – наблюдаемое число аллелей, *** n_e – эффективное число аллелей

Данные показатели являются умеренными и приемлемыми для идентификации и паспортизации линий подсолнечника селекции ВНИИМК.

Для точного определения размеров фрагментов ДНК и исключения ошибок детекции результатов амплификации мы начали процесс цифровизации результатов ПЦР. Так, с помощью фрагментного анализа нами был определен аллельный состав следующих SSR-локусов: ORS5, ORS1144, ORS559, HA514, ORS509. Были получены точные размеры аллелей этих локусов для линий коллекции ВНИИМК, что является ценной информацией при паспортизации подсолнечника. Полученные сведения о размерах фрагментов ДНК исследуемых образцов в результате фрагментного анализа представлены в таблице 2.

На основе полученных данных анализа ДНК с помощью капиллярного электрофореза и электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле для всех исследуемых линий



селекции ВНИИМК составили молекулярно-генетические паспорта. При составлении генетического паспорта изученных линий был применен буквенно-цифровой метод. Каждому SSR маркеру присваивалась латинская буква, а подстрочным индексом записывались размеры аллелей (табл. 2).

Таблица 2. Аллельные состояния 12 микросателлитных локусов линий подсолнечника коллекции ВНИИМК

Линия	Генетический паспорт
ВК678	*A ₃₃₄ B ₁₂₂ C ₂₁₀ D ₁₉₀ E ₁₈₉ F ₁₉₀ G ₁₆₀ H ₁₈₀ I ₃₁₃ J ₁₈₀ K ₃₀₀ L ₃₅₀
ВК680	A ₃₃₄ B ₁₃₈ C ₂₀₀ D ₂₁₀ E ₁₇₅ F ₁₇₀ G ₁₉₀ H ₁₈₀ I ₃₁₃ J ₂₃₀ K ₂₅₀ L ₃₅₀
Кубанский 93	A ₃₁₀ B ₁₂₂ C ₂₁₀ D ₁₉₀ E ₁₈₉ F ₁₇₀ G ₁₆₀ H _{180,200} I ₃₁₃ J _{180,230} K ₂₂₀ L ₃₅₀
ВК101	A ₃₁₀ B ₁₂₂ C ₂₁₀ D ₁₉₀ E ₁₉₆ F ₁₆₀ G ₁₆₀ H ₂₀₀ I ₃₁₃ J ₁₈₀ K ₂₂₀ L ₃₅₀
ВК101	A ₃₁₀ B ₁₂₂ C ₂₁₀ D ₁₉₀ E ₁₉₆ F ₁₆₀ G ₁₆₀ H ₂₀₀ I ₃₁₃ J ₁₈₀ K ₂₂₀ L ₃₅₀
Кубанский 86	A ₃₃₄ B ₁₂₂ C ₂₁₀ D ₂₁₀ E ₁₈₉ F ₁₇₀ G ₁₆₀ H ₁₈₀ I ₃₁₃ J ₁₈₀ K _{220,300} L ₃₅₀
ВК989	A ₃₁₀ B ₁₂₂ C ₂₀₀ D ₂₁₀ E ₁₇₅ F ₁₆₀ G ₁₉₀ H ₂₀₀ I ₃₁₃ J ₂₃₀ K ₂₅₀
ВК551	A ₃₁₀ B ₁₂₂ C ₂₀₀ D ₂₁₀ E ₁₇₅ F ₁₇₀ G ₁₆₀ H ₁₈₀ I ₃₀₉ J ₂₃₀ K ₂₂₀
ВК585	A ₃₁₀ B ₁₃₈ C ₂₁₀ D ₁₉₀ E ₁₈₉ F ₁₉₀ G ₁₆₀ H ₁₈₀ I ₃₁₃ J ₂₃₀ K ₂₅₀ L ₃₅₀
ВК508	A ₃₁₀ B ₁₃₈ C ₂₀₀ D ₂₁₀ E ₁₇₅ F ₁₆₀ G ₁₉₀ H ₂₀₀ I ₃₁₃ J ₂₃₀ K ₂₅₀
ВК580	A ₃₁₀ B ₁₃₈ C ₂₀₀ D ₂₁₀ E ₁₇₅ F ₁₆₀ G ₁₉₀ H ₂₀₀ I ₃₁₃ J ₂₃₀ K ₂₅₀
ВК304	A ₃₁₀ B ₁₃₈ C ₂₀₀ D ₂₁₀ E ₁₇₅ F ₁₆₀ G ₁₆₀ H ₂₀₀ I ₃₁₃ J ₁₈₀ K ₂₇₀
ВК303	A ₃₃₄ B ₁₂₂ C ₂₀₀ D ₂₀₀ E ₁₈₉ F ₁₉₀ G ₁₆₀ H ₂₀₀ I ₃₁₃ J ₂₃₀ K ₃₀₀ L ₃₅₀
ВК302	A ₃₁₀ B ₁₂₂ C ₂₁₀ D ₂₁₀ E ₁₇₅ F ₁₆₀ G ₁₆₀ H ₂₀₀ I ₃₁₃ J ₁₈₀ K ₂₂₀
ВК301	A ₃₁₀ B ₁₃₈ C ₁₆₀ D ₂₀₀ E ₁₈₉ F ₁₆₀ G ₁₆₀ H ₂₀₀ I ₃₁₃ J ₂₃₀ K ₂₂₀
ВК1-сур	A ₃₃₄ B ₁₃₈ C ₂₁₀ D ₂₁₀ E ₁₈₉ F ₁₇₀ G ₁₉₀ H ₁₈₀ I ₃₁₃ J ₂₃₀ K ₂₅₀ L ₃₅₀
ВК1-клп	A ₃₃₄ B ₁₃₈ C ₂₁₀ D ₂₁₀ E ₁₈₉ F ₁₇₀ G ₁₉₀ H ₁₈₀ I ₃₁₃ J ₂₃₀ K ₂₅₀ L ₃₅₀
ВК1-ими	A ₃₁₀ B ₁₂₂ C ₂₁₀ D ₁₉₀ E ₁₈₉ F ₁₇₀ G ₁₉₀ H ₁₈₀ I ₃₁₃ J ₁₈₀ K ₂₂₀ L ₃₅₀
ВК21-клп	A ₃₁₀ B ₁₃₈ C ₂₁₀ D ₁₉₀ E ₁₈₉ F ₁₆₀ G ₁₆₀ H ₂₀₀ I ₃₁₃ J ₂₃₀ K ₂₀₀
ВК1-сур	A ₃₃₄ B ₁₃₈ C ₂₁₀ D ₂₁₀ E ₁₈₉ F ₁₇₀ G ₁₉₀ H ₁₈₀ I ₃₁₃ J ₂₃₀ K ₂₅₀ L ₃₅₀
ВК23-ими	A ₃₁₀ B ₁₃₈ C ₂₁₀ D ₂₁₀ E ₁₇₅ F ₁₆₀ G ₁₆₀ H ₂₀₀ I ₃₁₃ J ₂₃₀ K ₂₂₀
ВК21-сур	A ₃₁₀ B ₁₃₈ C ₂₁₀ D ₁₉₀ E ₁₈₉ F ₁₆₀ G ₁₆₀ H ₂₀₀ I ₃₁₃ J ₂₃₀ K ₂₂₀
ВК1-клп	A ₃₃₄ B ₁₃₈ C ₂₁₀ D ₂₁₀ E ₁₈₉ F ₁₇₀ G ₁₉₀ H ₁₈₀ I ₃₁₃ J ₂₃₀ K ₂₅₀ L ₃₅₀

В коллекции ВНИИМК по аллельному составу SSR-локусов некоторые линии были идентичны. Так, сходными электрофоретическими спектрами ДНК обладали линии ВК508 и ВК580, а также ВК1-сур и ВК1-клп, которые являются аналогами по отношению друг к другу.

Для определения степени сходства между линиями, на основе матрицы состояний бинарных признаков был проведен кластерный анализ методом невзвешенного попарного среднего (UPGMA) и построены дендрограммы генетических взаимоотношений между изученными генотипами.

Анализ дендрограммы показал, что изученные линии разделились на две группы (рис.). В один кластер попали, преимущественно, материнские формы гибридов, за исключением отцовских форм ВК303 и ВК585. Второй сформировали исключительно отцовские формы гибридов. Генетические дистанции между линиями составили от 0 до 3,8. Дендрограмма показала и идентичность аллельного состава микросателлитных локусов линий ВК1-сур с ВК1-клп и ВК580 с ВК508.

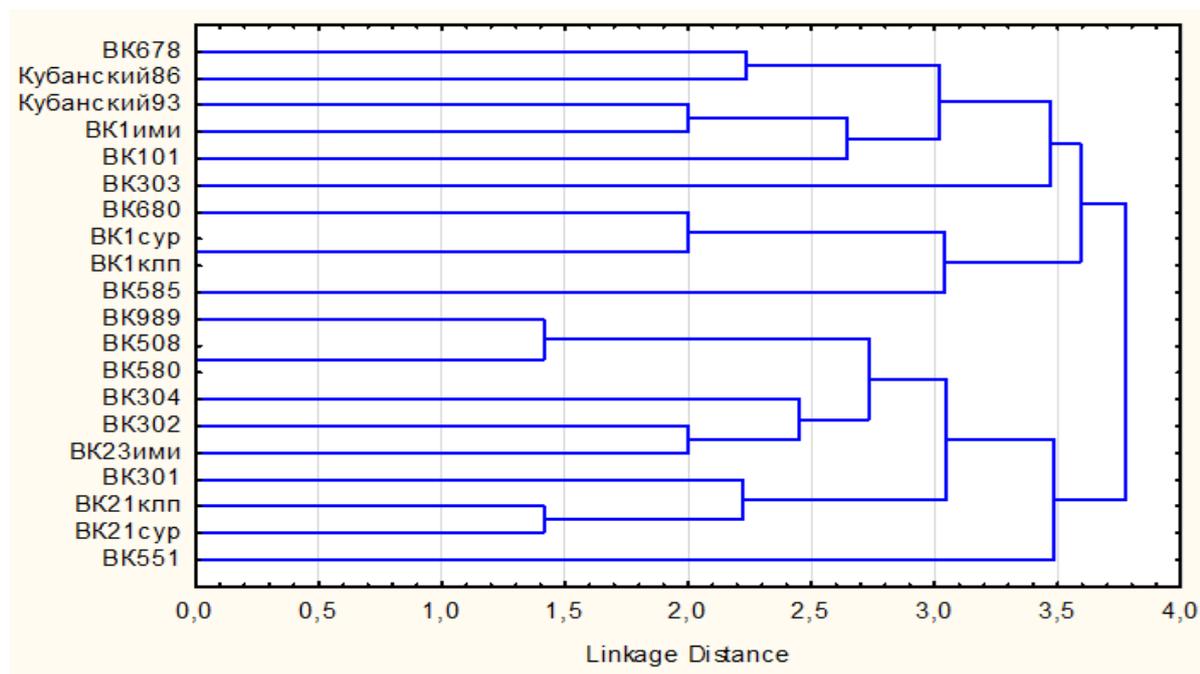


Рисунок – Дендрограмма генетического сходства 20 линий подсолнечника коллекции ВНИИМК на основе 12 SSR-локусов ДНК

Заключение. Таким образом, с применением системы ДНК-маркеров разработаны молекулярно-генетические паспорта линий подсолнечника селекции ВНИИМК. Дискриминационный потенциал системы маркеров определен как приемлемый для паспортизации генотипов данной коллекции. Линии-аналоги обладали идентичным аллельным составом. Кластерный анализ показал, что изученные образцы разделились на две группы с генетической дистанцией между ними 3,8.

Литература

1. Кильчевский А.В., Хотылева Л.В. Генетические основы селекции растений / Геномика и генетическая инженерия. Минск. 2014. 653 с.
2. Базанова Т.А., Ущাপовский И.В., Логинова Н.Н., Смирнова Е.В. и др. Формирование системы генетической паспортизации масличного льна // *Аграрная наука*. 2020. № 7–8. С. 80–83.
3. Лыжин А.С. Создание генетических паспортов подвойных форм яблони на основе анализа полиморфизма микросателлитных последовательностей ДНК // *Земледелие и растениеводство*. 2019. Т. 33. №2. С. 11–13
4. Бондаренко О.Н., Блинова А.А., Иваченко Л.Е., Лаврентьева С.И. Подбор микросателлитных локусов ДНК для создания молекулярно-генетических паспортов диких форм и сортов сои амурской селекции // *Вестник ДВО РАН*. 2022. № 2. С. 37–48.
5. Супрун И.И., Ковалев В.С., Токмаков С.В. ДНК паспортизация современных сортов российских сортов риса с применением SSR-маркеров // *Научный журнал КубГАУ*. 2017. № 131 (07). С. 1–11.
6. Гучетль С.З., Зайцев Н.И., Фролов С.С., Кузнецова Е.С. Генотипирование инбредных линий и гибридов подсолнечника селекции АОС ВНИИМК с помощью микросателлитных локусов // *Масличные культуры*. 2019. №3 (179). С. 27–34.
7. Saghai-Marouf M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics // *PNAS USA*. 1984. V. 81. P. 8014–8018.



8. Tang S., Yu J.K., Slabaugh M.D., Shintani D.K., Knapp S.J. Simple sequence repeat map of the sunflower genome / S. Tang, // *Theor. and Appl. Genet.* 2002. № 105. P. 1124-1136.
9. Paniego N. Eschaide M., Munoz M., Fernandez L. et al Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Genome.* 2002. № 45. P. 34–43.
10. Binkowski J., Miks S., Gene-Calc [компьютерное программное обеспечение]. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://gene-calc.pl/pl>
11. STATISTICA (Data Analysis Software System), StatSoft, Inc. Version 10. – 2011. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.statsoft.com>
12. Головатская А.В., Гучетль С.З. Паспортизация линий подсолнечника коллекции ДОС ВНИИМК по ДНК маркерам // Сборник материалов 11-й Всероссийской конференции молодых учёных и специалистов. 2021. С. 39–43.

**CERTIFICATION OF SUNFLOWER LINES OF THE BREEDING
OF V.S. PUSTOVOIT ALL-RUSSIAN RESEARCH INSTITUTE OF OIL CROPS
USING MICROSATELLITE DNA MARKERS**

Golovatskaya A.V., Voloshko A.A., Guchetl S.Z.
V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops

DNA certification of crops is an essential element in breeding and seed production. DNA passports are useful for identifying crops, determining their homogeneity, in resolving the issue of copyright protection. The purpose of the research was to identify and develop molecular genetic passports for the sunflower lines of the breeding of V.S. Pustovoit All-Russian Research of Oil Crops using microsatellite DNA markers. Molecular genetic passports of the lines were developed based on the data obtained by fragment analysis using capillary electrophoresis and electrophoresis in denaturing polyacrylamide gel.

Key words: sunflower, identification, certification, PCR, SSR, подсолнечник, идентификация, паспортизация, ПЦР, SSR, fragment analysis.