



УДК 631.523:633.854.78
DOI 10.25230/conf12-2023-153-158

РАЗРАБОТКА НОВЫХ SSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ЛИНИЙ И ГИБРИДОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS* L.)

Логина Е.Д., Савиченко Д.Л., Гучетль С.З.
ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК
asdfghjklis@mail.ru

Использование молекулярных маркеров в маркер-ассоциированной селекции (MAS) позволяет на уровне нуклеотидной последовательности отличать генотипы растений друг от друга, выявлять гены, детерминирующие хозяйственно-ценные признаки, генотипировать линии и гибриды. Для повышения точности генотипирования эффективно использовать полиморфные ДНК-локусы, позволяющие равномерно охватить весь геном подсолнечника. На данный момент для этих целей используются микросателлиты, но большая часть праймеров, их фланкирующих, обладает свойством неспецифичного связывания с ДНК-матрицей и амплификацией нецелевых фрагментов. Поэтому был проведен поиск новых микросателлитных локусов и сконструированы фланкирующие их праймеры с полной специфичностью *in silico*. По результатам ПЦР были отобраны пары праймеров, показавшие стабильную и специфичную амплификацию.

Ключевые слова: Подсолнечник, *Helianthus annuus*, ДНК, SSR-маркеры, ПЦР-праймеры.

Введение. Подсолнечник является одной из наиболее возделываемых масличных культур в мире и, в частности, в Российской Федерации, поэтому активно ведется селекция данной культуры [1]. Новым и перспективным направлением в селекции растений является молекулярно-генетическое маркирование конкретных признаков в генофонде [2] как культурных, так и дикорастущих форм растений, изучение генетического разнообразия, определение родства на внутривидовом уровне [3]. В его основе лежат ДНК-маркеры.

ДНК-маркер, или молекулярно-генетический маркер – видоспецифичный полиморфный фрагмент последовательности ДНК, соответствующий определенному гену или любому другому участку хромосомы [4]. Молекулярно-генетические маркеры условно



разделяются на три группы: маркеры, расположенные в экзонах [5]; расположенные в интронах; а также маркеры различных последовательностей ДНК, отношение которых к структурным генам, как правило, неизвестно (SSR, ISSR и т.д.) [6].

Наиболее популярными ДНК-маркерами являются микросателлитные локусы (SSR) [7]. Данный тип маркеров удобен для обнаружения гетерозигот по заданному локусу [8]. К настоящему времени для генотипирования подсолнечника разработан ряд SSR-маркеров [9], но они, в основном, состоят из динуклеотидных повторов, не всегда специфичны к целевому локусу, поэтому интерпретация результатов анализа ДНК может быть недостоверной [10]. Помимо специфичности молекулярные маркеры также должны позволять обнаруживать различия между линиями и гибридами, то есть они должны быть полиморфными [11]. Микросателлитные локусы характеризуются разным уровнем полиморфизма, поэтому необходимо подбирать маркеры с высоким индексом полиморфного информационного содержания (PIC), рассчитанного на выборках с достаточным количеством близкородственных генотипов [12]. Таким образом, разработка системы ДНК-маркеров, отвечающей перечисленным требованиям, на данный момент является актуальной [13].

Цель данной работы – разработать SSR-маркеры для генотипирования линий и гибридов подсолнечника.

Для достижения поставленной цели необходимо выполнить ряд задач:

1. найти в эталонном геноме подсолнечника микросателлитные локусы с тринуклеотидными повторами на каждой хромосоме;
2. сконструировать специфичные только целевому локусу пары праймеров;
3. провести выравнивание выбранных локусов с другими сборками геномов подсолнечника для теоретической оценки потенциального полиморфизма.
4. провести полимеразную цепную реакцию (ПЦР) со сконструированными парами праймеров;
5. отобрать праймеры, показавшие стабильную и специфичную амплификацию целевого фрагмента;
6. подобрать репрезентативную выборку генотипов для оценки уровня полиморфизма отобранных SSR-маркеров.

Материал и методы. Для разработки новых SSR-маркеров использовались базы данных GenBank, RefSeq (Reference Sequence), поддерживаемые Национальным центром биотехнологической информации США (NCBI) [14].

В базе данных RefSeq представлена эталонная сборка генома подсолнечника NanXRQr2.0-SUNRISE [15]. На основании этих данных с помощью программы GMATA [16] были найдены тринуклеотидные микросателлитные повторы для каждой хромосомы. С помощью веб-версии инструмента Primer-BLAST были сконструированы и отобраны специфичные пары праймеров с оптимальными параметрами температуры отжига. Ожидаемые продукты амплификации созданных праймеров выравнивали на сборке генома HA412-NOv2.0 [17], чтобы теоретически выявить возможный полиморфизм.

Разработанные SSR-маркеры апробировали на линиях коллекции ВНИИМК (BK 680, BK 1 ими, BK 101, BK 585, BK 303) с помощью ПЦР. ДНК из растений подсолнечника выделялась методом СТАВ [18]. Амплификацию образцов выполняли в термоциклере MiniAmp (Applied Biosystems, США). Продукты ПЦР-реакции разделялись методом гель-электрофореза в 2 %-ном агарозном геле, длина амплифицированных фрагментов была определена относительно маркера длины фрагментов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder Thermo Scientific (Евроген, Россия).

Результаты и обсуждение. Для разработки SSR-маркеров были найдены и отобраны микросателлитные локусы с фланкирующими областями для каждой хромосомы. С помощью Primer-BLAST были сконструированы пары праймеров, фланкирующие микросателлитные повторы, проведен поиск потенциальных вариантов неспецифичной амплификации. Были



На рисунке 3 видно, что амплифицированные фрагменты ДНК обладают разной электрофоретической подвижностью, что свидетельствует о разной длине фрагментов ДНК и, как следствие, о полиморфизме, выявленном у изученных линий с помощью этого маркера. Результаты апробирования всех разработанных SSR-маркеров представлены в таблице.

Таблица. Характеристика сконструированных праймеров

№ маркера	Локализация (хромосома)	Ожидаемая длина амплифицируемого фрагмента (п.н.)	Соответствие ожидаемой и наблюдаемой длины фрагмента	Специфичность (+/-)	Полиморфизм, выявленный в агарозном геле
1	2	307	–	–	–
2	2	235	–	–	–
3	3	127	+	+	–
4	3	280	+	+	–
5	4	336	–	нет отжига	–
6	4	282	+	+	–
7	4	133	+	+	–
8	5	317	–	–	–
9	5	212	–	–	–
10	5	321	–	–	–
11	6	323	–	+	–
12	6	291	+	+	+
13	7	287	+	+	–
14	7	263	–	–	–
15	8	325	–	–	–
16	8	155	+	+	+
17	8	332	+	+	+
18	9	104	+	+	–
19	9	234	+	+	–
20	9	353	+	+	–
21	10	156	+	+	+
22	10	294	–	–	–

Из 22 маркеров, охватывающих половину генома, тринадцать показали специфичность, из них четыре выявляли полиморфизм на этапе проверки в агарозном геле, восемь были неспецифичны. Одна пара праймеров не гибридизовалась с ДНК-матрицей. Все пары праймеров, локализующиеся на 2 и 5 хромосоме, не показали специфичности к заданному участку. Таким образом, было отбраковано 9 из 22 маркеров. Для окончательной оценки уровня полиморфизма оставшихся 13 локусов будет использоваться капиллярный гель-электрофорез в генетическом анализаторе Нанофор 05. Для этого необходимо модифицировать один из олигонуклеотидов (праймер) флуоресцентной меткой. Праймеры к четырём локусам с уже выявленным в агарозном геле полиморфизмом будут модифицированы для анализа. Для остальных 9 маркеров необходимо предварительно провести проверку потенциального полиморфизма в полиакриламидном геле с большей разрешающей способностью. В дальнейшем планируется разработка маркеров для оставшихся хромосом, в том числе и тех, для которых не удалось создать специфичные маркеры.

Заключение. Таким образом, с помощью базы данных Refseq (NCBI) и программного обеспечения (GMATA, Primer-BLAST) были сконструированы праймеры к 22 новым SSR-локусам. 13 маркеров показали специфичность к целевому локусу. Из них четыре маркера выявили полиморфизм у линий подсолнечника в агарозном геле. Девять – не выявили полиморфизма в выборке генотипов подсолнечника, но будут дополнительно оцениваться в полиакриламидном геле. Планируется разработка маркеров для оставшихся хромосом.



Литература

1. Kumar L.S. DNA markers in plant improvement: an overview // *Biotechnology advances*. 1999. V. 17. № 2–3. P. 143–182.
2. Усатов А.В., Макаренко М.С., Горбаченко О.Ф., Азарин К.В., Ковалевич А.А., Костылев П.И., Маркин Н.В. ДНК-маркеры гетерозиса у гибридов подсолнечника отечественной селекции // *Зерновое хозяйство России*. 2017. Т. 3. № 3. С. 54–59.
3. Тихобаева В.Е. ДНК-маркеры для оценки полиморфизма и селекционно ценных признаков подсолнечника: *Helianthus* L.: диссертация кандидата биологических наук: 03.02.07. Ростов-на-Дону, 2013. 189 с.
4. Hongtrakul V., Huestis G.M., Knapp S.J. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines // *Theoretical and applied genetics*. 1997. V. 95. № 3. P. 400–407.
5. Southern E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // *Journal of molecular biology*. 1975. V. 98. № 3. P. 503–517.
6. Гучетль С.З. Доминантные молекулярные маркеры мутации высокоолеиновости масла в семенах подсолнечника // *Масличные культуры*. 2020. Вып. 2. № 182. С. 24–32.
7. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Т. 17. № 4/2. С. 1044–1055.
8. Гучетль С.З., Фролов С.С., Зайцев Р.Н., Кузнецова Е.С. Паспортизация линий и гибридов подсолнечника селекции Армавирской опытной станции ВНИИМК: подбор оптимальных ДНК локусов и условий ПЦР // *Масличные культуры*. 2017. Т. 171. № 3. С. 23–28.
9. Челюстникова Т.А., Гучетль С.З., Антонова Т.С. Применение молекулярных маркеров для идентификации ЦМС-Rf системы в родительских линиях гибридов подсолнечника // *Масличные культуры*. 2017. Т. 172. № 4. С. 3–9.
10. Saftić-Panković D. Application of molecular markers in sunflower breeding // *Genetika*. 2007. V. 39. № 1. P. 1–11.
11. Tang S., Yu J.-K., Slabaugh M. B., Shintani D. K., Knapp S. J. Simple sequence repeat map of the sunflower genome // *Theoretical and Applied Genetics*. 2002. V. 105. № 8. P. 1124–1136.
12. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // *Nucleic Acids Research*. 1990. V. 18. № 24. P. 7213–7218.
13. Williams J. G. K. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucleic acids research*. 1990. V. 18. № 22. P. 6531–6535.
14. База данных открытого доступа GenBank [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
15. База данных генома подсолнечника [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.sunflowergenome.org>.
16. Wang X., Wang L. GMATA: An Integrated Software Package for Genome-Scale SSR Mining, Marker Development and Viewing. *Front. Plant Sci*. 2016. 7:1350.
17. База данных генома подсолнечника [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.heliagene.org/HA412.v1.1.bronze.20141015/>.
18. Saghai-Marooif 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 // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1984. V. 81. № 24. P. 8014–8018.



**DEVELOPMENT OF NEW SSR-MARKERS FOR GENOTYPING OF LINES
AND HYBRIDS OF SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS* L.)**

Loginova E.D., Savichenko D.L., Guchetl S.Z.
V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops

The use of molecular markers in marker-associated selection (MAS) makes it possible to distinguish plant genotypes from each other at the nucleotide sequence level, to identify genes that determine economically valuable traits, and to genotype lines and hybrids. To improve the accuracy of genotyping, it is efficient to use polymorphic DNA loci, which allow uniform coverage of the entire sunflower genome. At the moment, microsatellites are used for these purposes, but most of the primers flanking them have the property of nonspecific binding to the DNA template and amplification of non-target fragments. Therefore, a search for new microsatellite loci was carried out and flanking primers were designed with full specificity *in silico*. Based on the results of PCR, primer pairs were selected that showed stable and specific amplification.

Key words: sunflower, *Helianthus annuus*, DNA, SSR-markers, PCR-primers.