



УДК 631.523:633.854.78  
DOI 10.25230/conf11-2021-39-43

## ПАСПОРТИЗАЦИЯ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА КОЛЛЕКЦИИ ДОС ВНИИМК ПО ДНК МАРКЕРАМ

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

Целью данной работы являлось создание молекулярно-генетических паспортов линий подсолнечника коллекции Донской опытной станции ВНИИМК на основе полиморфных фракций микросателлитной ДНК. В качестве исследуемого материала использовали 17 линий. Для генотипирования применили 12 пар праймеров. Лocus ORS 559 оказался мономорфным для данной выборки. У остальных локусов выявлено от 2 до 4 аллелей. Среднее число аллелей на locus составило 2,75, PIC – 0,49, эффективное число аллелей – 2,16. Анализ ДНК-профилей линий показал индивидуальность аллельного состава каждой из них. Анализ генетических взаимоотношений между линиями показал, что изученные линии разделились на две группы, с генетической дистанцией между ними 5,9.

Ключевые слова. Подсолнечник, паспортизация, ДНК, ПЦР, микросателлитные локусы.

Введение. Подсолнечник является основной масличной культурой, возделываемой в России на семена, использующиеся в дальнейшем в пищевой и технической промышленности. ДНК-паспортизация сортов сельскохозяйственных растений – наиболее эффективный на сегодняшний день способ их идентификации для того, чтобы защитить авторские права селекционеров, свести к минимуму фальсификат на рынке семян, оптимизировать селекционный процесс [1]. Внедрение ДНК-паспортов позволит не только сократить объем серого рынка, но и поможет определить, насколько новый сорт является действительно оригинальным. Среди различных методов молекулярно-генетического анализа полиморфизма ДНК наиболее перспективной является система SSR-маркеров [2]. Полиморфизм SSR-локусов, отображающий генетические особенности генотипа, проявляется за счет различия в количестве коротких tandemных повторов, лежащих между консервативными последовательностями ДНК. Эти маркеры стабильны в соматических



клетках, локус-специфичны, их наследование, как правило, носит кодоминантный характер, что позволяет отличать гомозиготное состояние от гетерозиготного. Микросателлитное маркирование является эффективным для анализа родственных взаимосвязей и оценки генетического разнообразия у растений [3].

Целью данной работы являлось создание молекулярно-генетических паспортов линий подсолнечника коллекции ДОС ВНИИМК на основе полиморфных фракций микросателлитной ДНК.

Материалы и методы. В качестве исследуемого материала для составления ДНК-паспорта использовалось 17 линий подсолнечника селекции Донской опытной станции ВНИИМК – ВД354, ВД22А, ЭД169, ЭД931, ЭД155, ВД541, ЭД114, ЭД788, ЭД110, ВД342, 49А, ЭД399, ЭД45, ЭД127, ЭД236, ЭД73, ЭД33. Выделение ДНК производили из 5-7-дневных этиолированных проростков подсолнечника по модифицированному методу Saghai-Marooft *et al.* [4]. ДНК выделяли из 5 отдельных растений. Для проведения полимеразной цепной реакции использовали 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 67 мМ трис-НСl, рН 8,8; 50 мМ КСl, 16,6 мМ сульфата аммония; 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % Tween 20; по 0,2 мМ дезоксирибонуклеозидфосфатов; по 10 пМ праймеров; 10 нг матричной ДНК и 1 единицу рекомбинантной термостабильной ДНК полимеразы (Сибэнзим, Москва). Амплификацию осуществляли в термоциклере (Bio-Rad, США). В исследовании использовались 12 праймеров SSR, разработанных N. Panięgo *et al.* и S. Tang *et al.* [5; 6]. Для проведения реакций с SSR-праймерами подсолнечника оптимальным был терморегим с начальной денатурацией при 96°C в течение 1 мин 30 сек, затем 31-34 циклов при соблюдении следующего температурно-временного режима: денатурация при 94 °С – 30 сек, отжиг при 55–60 °С в течение 40 сек, элонгация – 1 мин при 68–70 °С, финальная элонгация – 2 мин. Температурный режим и количество циклов зависели от используемых праймеров.

Электрофорез продуктов амплификации проводили в полиакриламидном геле (8 % ПААГ, 1хТБЕ буфер) в течение 2,5 часов при силе тока 38-45 мА, 230 V. Результаты электрофореза документировали при помощи трансиллюминатора BioPrint (VILBERLOURMAT, Франция) и видеосистемы с программным обеспечением Bio-Capture относительно маркера длины фрагментов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder Thermo Scientific (Сибэнзим, Россия). Во всех экспериментах в качестве внутреннего контроля дополнительно использовали ДНК линии ВК 678. Для выявления различий между линиями подсолнечника данные ПЦР анализа были обработаны кластерным анализом, методом Ward с помощью пакета программ (Statistica 6.0). Генетические дистанции рассчитаны с помощью Евклидова расстояния.

Индекс полиморфного содержания (PIC) и эффективное число аллелей ( $n_e$ ) [7] вычисляли по формулам:

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

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

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

где  $n_e$  – эффективное число аллелей.

Результаты и обсуждение. Для проведения паспортизации линий подсолнечника коллекции ДОС ВНИИМК были использованы 12 пар SSR-праймеров. Для определения дискриминационного потенциала системы SSR-локусов вычисляли такие показатели как наблюдаемое число аллелей на полиморфный локус ( $n_a$ ), индекс полиморфного содержания (PIC) и эффективное число аллелей ( $n_e$ ). В таблице 1 представлена характеристика ДНК-локусов.

У большинства локусов было выявлено по 2 или 3 аллеля. Наибольший полиморфизм наблюдался у HAR 1608 и ORS 1327 ( $n_a$  равное 4, PIC 0,62 и 0,70;  $n_e$  2,63 и 3,33 соответственно). Средний уровень полиморфизма показали локусы ORS 5, ORS 1144, HAR432, ORS559, HAR 1796 ( $n_a$  равное 2, PIC от 0,11 до 0,49; и  $n_e$  от 1,12 до 1,96). Локус ORS 559 оказался мономорфным.



Среднее число аллелей на локус составило 2,75, PIC – 0,49, эффективное число аллелей – 2,16. Данные показатели являются приемлемыми для паспортизации линий подсолнечника.

Анализ электрофоретических спектров двенадцати амплифицированных SSR-локусов линий показал индивидуальность аллельного состава каждой из них (табл. 2).

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

ВНИИМК, Краснодар, 2020 г.

Локус	PIC*	$n_a$	$n_e$
ORS5	0,49	2,00	1,96
ORS1144	0,48	2,00	1,92
ORS1287	0,64	3,00	2,78
HAR432	0,48	2,00	1,92
ORS 509	0,28	3,00	1,39
HAR1608	0,62	4,00	2,63
HAR514	0,61	3,00	2,56
ORS811	0,57	3,00	2,33
ORS1327	0,70	4,00	3,33
ORS1209	0,51	3,00	2,04
ORS559	0,11	2,00	1,12
HAR1796	0,48	2,00	1,92
Среднее	0,49	2,75	2,16

Примечание: \*PIC - индекс полиморфного содержания;  $n_a$  - наблюдаемое число аллелей;  $n_e$  – эффективное число аллелей.

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

ВНИИМК, Краснодар, 2020 г.

Линия	SSR-локус											
	ORS 5	ORS 1144	ORS 1287	HAR 432	ORS 509	HA 1608	HA 514	ORS 811	ORS 1327	ORS 1209	ORS5 59	HAR 1796
ВД354	305 г**	163*	210	190	210	230	180	160	190	0	0	180
ВД22А	305	163	0	190	210	230 г	190	160	0	190	280	180
ЭД169	325	143	220	0	210	220	190	160	190	190 г	280	180
ЭД931	305	143	0	190	210	225	200	150	190	190	280	230
ВД342	305	163	0	0	210	230	200	160	200	0	280	180
49А	305/ 325	143	220	190	200/ 210	225/ 230	180/ 190	160/ 190	190/ 200	190	280	180
ЭД399	325	143	220	0	210	210	180	190	200	200	280	180
ЭД45	325	143	210	0	210	225	190	190	0	200	280	230
ЭД127	305 г	143	210	190	210	225	190	190	190	190	280	180
ЭД236	305	143	210	0	210	225	200	190	200	190	280	180
ЭД73	325	163	210	190	200	225	180	160	190	200	280	180
ЭД33	325	143	210	0	210	220	190	160	0	190	280	230
ЭД155	305	163	210	190	220	225	180	150	190	200	280	230
ВД541Rf	305	163	210	190	210	225	190	160	180	190	280	230
ЭД114Rf	305	163	220	190	210	230	190	160	180	190	280	230
ЭД788	305	143	0	0	210	225	190	190	180	190	280	180
ЭД110	325 г	143	210	190	210	230 г	180	160	190 г	190 г	280	230

Примечание: \* количество пар нуклеотидных оснований (п.н.); г\*\* - гетерогенный образец.

Линия 49А является простым гибридом, который представляет родительскую форму трехлинейного гибрида. Поэтому у шести локусов (ORS5, ORS 509, HA1608, HA514, ORS 1327, ORS811) выявлено наличие аллелей обеих форм гибрида. Некоторые изучаемые линии по микросателлитным локусам были не выровненными, то есть вместо ожидаемого



гомозиготного состояния локусов показывали внутрилинейную гетерогенность (рис. 1). К ним относятся, например, линии ВД22А, ЭД169, ЭД127 и др.

Для определения степени сходства между линиями, на основе матрицы состояний бинарных признаков был проведен кластерный анализ методом Ward и построена дендрограмма генетических взаимоотношений между изученными генотипами (рис. 2).

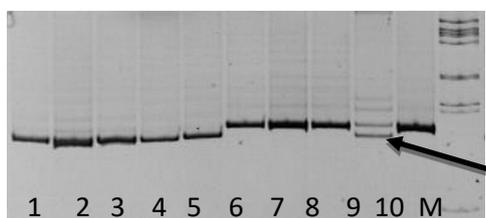


Рисунок 1 – Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК линий подсолнечника по локусу ORS 5. Дорожки 1–5 – ЭД931, 6–10 – ЭД110. М – маркер молекулярного веса. Стрелкой показан нетипичный для линии ЭД110 образец ДНК.

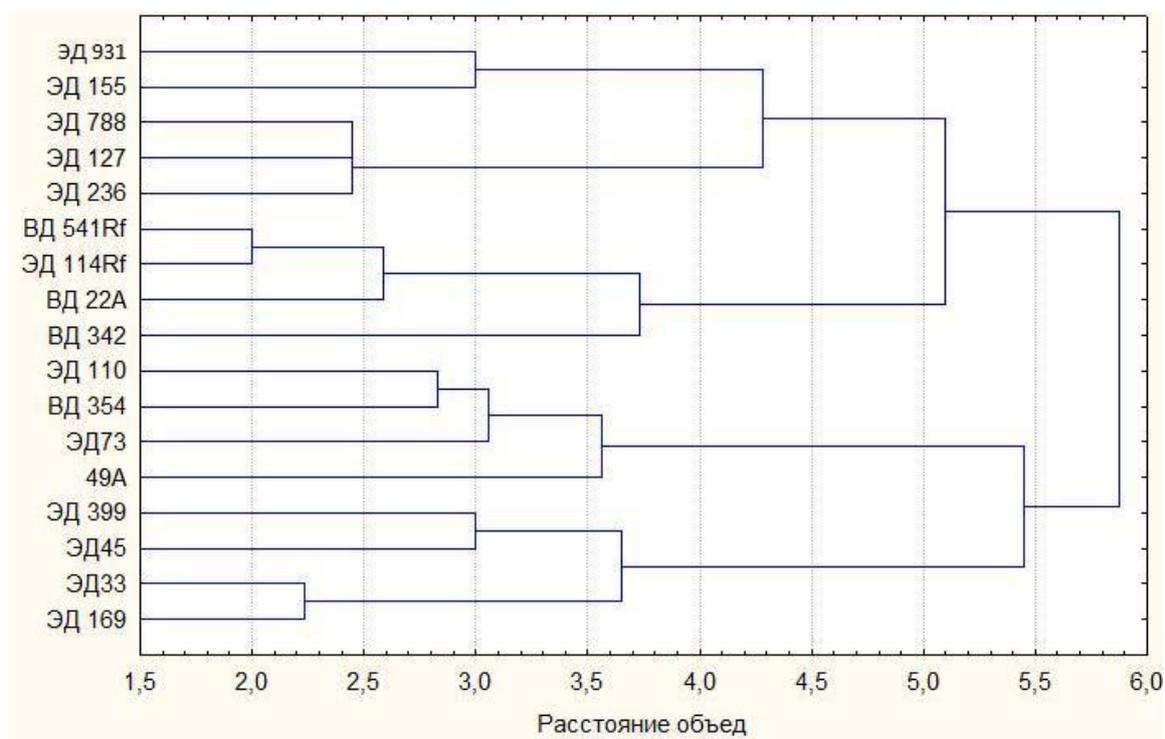


Рисунок 2 – Дендрограмма генетического сходства 17 линий подсолнечника коллекции ДОС ВНИИМК на основе 12 SSR-локусов ДНК.

Анализ дендрограммы показал, что изученные линии разделились на две группы, с генетической дистанцией между ними 5,9. В один кластер попали 5 материнских линий: ЭД 931, ЭД 127, ЭД 236, ВД 22А, ВД 342, а также 4 отцовские: ЭД 155, ЭД 788, ВД 541Rf, ЭД 114Rf. Второй кластер объединил 7 материнских линий: ВД 354, ЭД 73, 49А, ЭД399, ЭД 45, ЭД 33, ЭД 169 и одну отцовскую: ЭД 110.

**Заключение.** Таким образом, примененная для паспортизации линий ДОС ВНИИМК система ДНК-маркеров позволила выявить индивидуальность аллельного состава каждой из них. Дискриминационный потенциал системы маркеров определен как приемлемый для паспортизации данной коллекции генотипов. Анализ генетических взаимоотношений между



линиями показал, что изученные образцы разделились на две группы, с генетической дистанцией между ними 5,9.

#### Литература

1. Шатарнов О.П., Синяковская М.Г., Силкова Т.А., Давыденко О.Г. Идентификация генотипов родительских линий и гибридов подсолнечника (*Helianthus annuus*L.) Белорусской селекции с использованием микросателлитного маркирования // Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. серыя біялагічных навук. Інстытут генетыкі і цыталогіі НАН Беларусі. – 2012. – Т. 3. – С. 55–60.
2. Усатов А.В., Маркин Н.В., Горбаченко Ф.И., Федорова М.А., Тихобаева В.Е., Горбаченко О.Ф., Азарин К.В. SSR-анализ геномной ДНК ЦМСлиний подсолнечника // Масличные культуры. НТБ ВНИИМК. – 2011. – № 1 (146–147). – С. 15–20.
3. Календарь Р. Н., Глазко В. И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение// Физиол. и биохим. культ. растен. – 2002. – Т. 34. – № 4. – С. 279–296.
4. Saghai-Maroof 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.
5. Paniego N., Eschaide M., Munoz M., Fernandez L., Torales S., Faccioi P., Fuxan I., Carrera M., Zandomeny R., Suarez E. and Hopp H. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Genome. – 2002. – V. 45. – P. 34–43.
6. Tang S., Yu J.-K., Slabaugh M.D., Shintani D.K., Knapp S.J. Simple sequence repeat map of the sunflower genome // Theor. and Appl. Genet. – 2002. – №. 105. –P. 1124–1136.
7. 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.

#### **THE CERTIFICATION OF SUNFLOWER LINES FROM THE COLLECTION OF THE DON EXPERIMENTAL STATION OF V.S. PUSTOVOIT ALL-RUSSIAN RESEARCH INSTITUTE OF OIL CROPS BY USING DNA MARKERS**

**Golovatskaya A.V., Guchetl S.Z.**

The aim of this research was to develop molecular genetic passports of sunflower lines from the collection of the Don experimental station of V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops based on polymorphic fractions of microsatellite DNA. We used 17 lines as a research material. We used 12 pairs of primers for genotyping. We found that the ORS 559 locus was monomorphic for these samples. The rest of the loci had from 2 to 4 alleles. The average number of alleles per locus was 2.75, PIC – 0.49, the effective number of alleles – 2.16. The analysis of the DNA profiles of the lines showed the individuality of the allelic composition of each of them. The analysis of the genetic relations between the lines showed that the studied lines were divided into two groups, with a genetic distance between them of 5.9.

Key words: sunflower, certification, DNA, PCR, microsatellite loci.