



**ГЕНЕТИКА, БИОХИМИЯ, СЕЛЕКЦИЯ И СЕМЕНОВОДСТВО
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ**

УДК 633.854.54:633.52:575
DOI 10.25230/conf11-2021-7-11

**ПОИСК И ОТБОР ПЕРСПЕКТИВНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ
ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАСПОРТИЗАЦИИ
МАСЛИЧНОГО ЛЬНА КОЛЛЕКЦИИ ВНИИМК**

Аверина А.А., Челюстникова Т.А., Гучетль С.З.
ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК
nastyauuukop@gmail.com

На сегодняшний день существует потребность в идентификации и регистрации новых сортов масличного льна, создаваемых селекционерами. Паспортизация с использованием микросателлитных маркеров помогает решить эту задачу. Целью данного исследования являлись поиск и отбор перспективных микросателлитных праймеров, определение их хромосомной локализации и оценка возможности их применения для молекулярно-генетической паспортизации сортов масличного льна коллекции ВНИИМК. Было изучено 17 сортов льна коллекции ВНИИМК и 16 микросателлитных локусов. Отобранные локусы маркировали 6 из 15 хромосом генома льна. Анализ показал, что 10 из 16 локусов полиморфны, и могут использоваться для паспортизации сортов льна коллекции ВНИИМК.

Ключевые слова: лен, ДНК, полимеразная цепная реакция, микросателлиты, паспортизация.

Введение. Масличный лен является ценной многоотраслевой технической культурой, распространенной на территории Российской Федерации. Данная культура имеет широкий спектр применения как в пищевой и текстильной промышленности, так и в производстве кормов и высококачественных масел. Высокий спрос на мировом рынке и ежегодное увеличение посевных площадей льна приводит закономерному увеличению числа новых созданных высокопродуктивных и устойчивых к различным условиям возделывания сортов [1; 2].

Интенсификация селекционного процесса вызывает необходимость оперативной и точной идентификации и регистрации появившихся сортов и гибридов. Метод молекулярно-генетического маркирования позволяет решить эту задачу [3]. Высокую эффективность для идентификации генетических различий показывают микросателлитные маркеры (SSR), в силу их высокой распространенности в геномах растений и преимущественно кодоминантным типом наследования. Так как микросателлитные области являются не кодирующими, в них возможно накопление различных мутаций, повышающих их полиморфизм [4]. При паспортизации сортов важным требованием к молекулярно-генетическим маркерам, в том числе и микросателлитным, является их равномерное распределение в геноме изучаемого объекта [5].

В связи с этим, целью нашего исследования являлись поиск и отбор перспективных микросателлитных праймеров, определение их хромосомной локализации и оценка возможности их применения для молекулярно-генетической паспортизации сортов масличного льна коллекции ВНИИМК.

Материалы и методы. В данном исследовании изучали 17 сортов масличного льна коллекции ВНИИМК: Даник, Ы-коричневый, Флиз, Август, Бирюза, Снегурок, Сапфир, Авенгард, Нилин, ВНИИМК-620, Ы-117, ВНИИМК 620 ФН 0.5, РФН, ВНИИМК 630, ЛМ-98, К 4476 и К 4195. ДНК выделяли с использованием СТАВ буфера из пяти отдельных двухнедельных проростков льна каждого сорта, используя протокол Saghai-Marooft *et al.* [6].



Для анализа выделенную ДНК из трех проростков объединяли для получения средней пробы.

Для проведения амплификации применяли реакционную смесь следующего состава 67 мМ трис-НСI, рН8,8; 16,6 мМ сульфата аммония; 3 мМ MgCl₂; 0,01 % Tween 20; по 0,2 мМ каждого из дезоксирибонуклеозидфосфатов; 10 пМ праймера; 10 нг матричной ДНК и 1 ед. рекомбинантной термостабильной ДНК полимеразы (Сибэнзим, Москва). ПЦР проводили в термоциклере S1000™ (BioRad, США). В исследовании использовалось две программы амплификации: 13 и PLS. Для каждой пары праймеров программа была подобрана индивидуально.

Условия проведения ПЦР с использованными программами и праймерами приведены в таблице 1.

Таблица 1. Программы для амплификации микросателлитных праймеров

Программа	Стадия	Время, с	Циклов	Температура, °С	Анализируемые праймеры
13	Предварительная денатурация	90	1	96	Lu 1, Lu 3, Lu 7, Lu 8, Lu 9, Lu 10, Lu 11, Lu 21, Lu 24, Lu 25, Lm 45, 912
	Денатурация	30	31	94	
	Отжиг праймера	40		60	
	Элонгация	60		68	
	Финальная элонгация	120	1	70	
PLS	Предварительная денатурация	180	1	94	Lm 54, Lm 46, Lm 55, 258
	Денатурация	10	32	94	
	Отжиг праймера	20		63	
	Элонгация	24		72	
	Финальная элонгация	360	1	72	

Визуализацию результатов амплификации производили с помощью электрофореза в 8 % неденатурирующем полиакриламидном геле, приготовленном на 1хТБЕ буфере, в камере для вертикального электрофореза VE-20 (Хеликон, Россия). Окрашивание геля было проведено путем его погружения на 15 минут в ванночку с раствором бромистого этидия. Размер фрагментов ДНК определяли с использованием программного обеспечения трансиллюминатора BioPrint (Vilber Lourmat, Франция) относительно маркера длины фрагментов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder Thermo Scientific (Сибэнзим, Россия).

В исследовании использовалось 16 пар праймеров, отобранных из работ Deng *et al.* [7], Soto-Cerda *et al.* [8] и Bickel *et al.* [9], как самые полиморфные. Определение локализации и длины продуктов исследуемых праймеров в референсном геноме *Linum usitatissimum* var. *usitatissimum*, секвенированном Wang и соавторами [10], проводились с использованием веб-версии программы Primer-BLAST.

Результаты и обсуждение. Для оценки охвата генома отобранными праймерами, был проведен анализ их хромосомной локализации в референсном геноме *L. usitatissimum*. Результаты анализа представлены в таблице 2.

Отобранные пары праймеров маркируют шесть из пятнадцати хромосом генома *L. usitatissimum*, а именно хромосомы 2, 3, 4, 7, 12 и 13. Из них большинство локализованы на хромосоме 4 (Lu 8, Lu 9, Lu 11, Lu 24 и Lu 25), четыре на хромосоме 7 (Lu 3, Lm 54, Lm 55, 258), по два на хромосомах 2 (Lu 7, Lu 21), 3 (Lu 1, Lu 10) и 12 (Lm 45, 912), и лишь одна пара обнаружена на хромосоме 13 (Lm 46).

Далее была проведена оценка возможности использования данных пар праймеров для паспортизации сортов льна коллекции ВНИИМК на 17 образцах. Был проанализирован полиморфизм, выявляемый SSR-локусами, а также определены длины полученных продуктов ПЦР (табл. 3).



Таблица 2. Хромосомная локализация локусов в референсном геноме *L. usitatissimum*

Локус	Хромосома	Длина продукта, п.н.	Источник
Lu 1	3	110	[7]
Lu 3	7	168	
Lu 7	2	149	
Lu 8	4	93	
Lu 9	4	297	
Lu 10	3	188	
Lu 11	4	309	
Lu 21	2	153	
Lu 24	4	285	
Lu 25	4	105	
Lm 45	12	304	[8]
Lm 54	7	189	
Lm 46	13	165	
Lm 55	7	154	
258	7	167	[9]
912	12	179	

Таблица 3. Характеристика микросателлитных локусов для паспортизации сортов льна коллекции ВНИИМК

ВНИИМК, Краснодар, 2020 г.

Локус	Наличие полиморфизма	Длина продукта амплификации, п.н.
Lu 1	+	173, 162, 151
Lu 3	+	172, 159
Lu 7	+	151, 143
Lu 8	+	210, 184, 173, 160, 153, 116
Lu 9	+	165, 161, 113
Lu 10	+	164, 155
Lu 11	+	162, 118
Lu 21	+	153, 145
Lu 24	+	183, 164, 159, 111
Lu 25	+	210, 194, 189, 183, 174, 140
Lm 45	-	274
Lm 54	-	197
Lm 46	-	183
Lm 55	-	176
258	-	178
912	-	173

Проведенный анализ показал, что десять из шестнадцати пар праймеров выявляли полиморфизм коллекции сортов льна ВНИИМК, остальные были мономорфны. Полиморфны следующие локусы: Lu 1, Lu 3, Lu 7, Lu 8, Lu 9, Lu 10, Lu 11, Lu 21, Lu 24 и Lu 25. Наибольшее число аллелей выявлено у локусов Lu 8 и Lu 25 – 6 аллелей, у локуса Lu 24 – 4 аллели, у локусов Lu1 и Lu 9 – 3 аллели, а также у локусов Lu 3, Lu 7, Lu10, Lu 11 и Lu 24 по 2 аллели. Мономорфными оказались локусы Lm 45, Lm 54, Lm 46, Lm 55, 258 и 912.

Отсутствие полиморфизма у некоторых локусов, можно объяснить тем, что авторы, разработавшие праймеры, анализировали не только культурные сорта, но и дикие виды *L. usitatissimum*, что значительно увеличивает вероятность обнаружения мутаций в микросателлитных последовательностях. Локусы с обнаруженным полиморфизмом могут использоваться для паспортизации сортов льна коллекции ВНИИМК. Однако, для установления генетической дистанции между сортами, желателен дальнейший поиск праймеров, которые позволят маркировать все хромосомы и охватить полный геном.

Заключение. Таким образом, в ходе исследования была определена геномная



локализация 16-ти отобранных локусов. Исследуемые локусы охватывают шесть хромосом из пятнадцати генома *L. usitatissimum*. Только десять из изучаемых пар праймеров выявляют полиморфизм сортов масличного льна коллекции ВНИИМК, что делает их пригодными для паспортизации. Однако, в дальнейшем, для определения генетической дистанции между сортами, желательно продолжить поиск полиморфных локусов, охватывающих наибольшее количество хромосом.

Литература

1. Мамырко Ю.В., Кривошлыков К.М., Бушнев А.С., Подлесный С.П. и др. Состояние производства и пути повышения экономической эффективности возделывания льна масличного в условиях юга России // Масличные культуры. – 2018. – В. 3(175). – С. 64–71. doi: 10.25230/2412-608X-2018-3-175-64-71
2. Овчарова Л.Р., Зеленцов В.С., Рябенко Л.Г., Галкина Г.Г. и др. Сорт масличного льна ВНИИМК 620 ФН // Масличные культуры. – 2019. – В. 1(177). – С. 146–149. doi: 10.25230/2412-608X-2019-1-177-146-149
3. Павловская Н.Е., Гагарина И.Н. Молекулярные маркеры в решении сохранения биологического разнообразия и паспортизации сортов сельскохозяйственных культур (часть 1) // Вестник аграрной науки. – 2007. – В. 7, № 4. – С. 30–32.
4. Гучетль С.З., Челюстникова Т.А., Антонова Т.С., Рамазанова С.А. Микросателлитные локусы как маркеры для идентификации и сертификации линий и гибридов подсолнечника селекции ВНИИМК // Масличные культуры. – 2007. – В. 2(137). – С. 27–32.
5. Weising K., Atkinson R.G., Gardner R. Genomic fingerprinting by microsatellite primed PCR: A critical evaluation. // PCR methods and applications. – 1995. – Vol. 4. – P. 249–255. doi: 10.1101/gr.4.5.249.
6. 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 // PNAS USA. – 1984. – Vol. 81. – P. 8014–8018. doi: 10.1073/pnas.81.24.8014.
7. Deng X., Long S., He D., Li X. *et al.* Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from flax (*Linum usitatissimum* L.) // African Journal of Biotechnology. – 2011. – Vol. 10. – P. 734–739. doi: 10.5897/AJB10.1039
8. Soto-Cerda B., Saavedra H., Navarro C., Mora P. Characterization of novel genic SSR markers in *Linum usitatissimum* (L.) and their transferability across eleven *Linum* species. // Electronic Journal of Biotechnology. – 2011. – Vol. 14(2) – P. 4. doi: 10.2225/vol14-issue2-fulltext-6
9. Bickel C., Gadani S., Lukacs M., Cullis C. SSR markers developed for genetic mapping in flax (*Linum usitatissimum* L.) // Research and Reports in Biology. – 2011. – Vol. 2. – P. 23–29. doi: 10.2147 / RRB.S16091
10. Wang Z., Hobson N., Galindo L., Zhu S. *et al.* The genome of flax (*Linum usitatissimum*) assembled de novo from short shotgun sequence reads // Plant J. – 2012 – Vol. 72(3) – P. 461–473. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.05093.x.

THE SEARCH AND SELECTION OF PROMISING MICROSATELLITE LOCI FOR MOLECULAR GENETIC CERTIFICATION OF OIL FLAX FROM THE COLLECTION OF V.S. PUSTOVOIT ALL-RUSSIAN RESEARCH INSTITUTE OF OIL CROPS

Averina A.A., Chelyustnikova T.A., Guchetl C.Z.

Today, there is a need for identification and registration of new varieties of oil flax, developed by the breeders. The certification using microsatellite markers helps solving this problem. The aim



of this study was the search and selection of promising microsatellite primers, determination of their chromosomal localization and evaluation of the possibility of their use for molecular genetic certification of oil flax varieties from the collection of V.S. Pustovoi All-Russian Research Institute of Oil Crops (VNIIMK). We studied 17 flax varieties from the VNIIMK collection and 16 microsatellite loci. The selected loci marked 6 out of 15 chromosomes of the flax genome. The analysis showed that 10 out of 16 loci are polymorphic and can be used for certification of flax varieties from the VNIIMK collection.

Key words: flax, DNA, polymerase chain reaction, microsatellites, certification.