УДК 633.854.78:575

DOI 10.25230/2412–608X–2018–3–175–34–39

ОПТИМИЗАЦИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА НА ОСНОВЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ДНК

С.З. Гучетль,

кандидат биологических наук

С.С. Фролов,

кандидат сельскохозяйственных наук

Е.С. Кузнецова,

лаборант-исследователь

Армавирская опытная станция – филиал ФНЦ
ВНИИМК

Россия, 352925, Краснодарский край, г. Армавир,
пос. Центральная усадьба опытной станции
ВНИИМК

Тел./факс: 8 (86137) 3-13-76

E-mail: stanciya-vniimk@yandex.ru

Для цитирования: Гучетль С.З., Фролов С.С.,
Кузнецова Е.С. Оптимизация определения пара-
метров генетической чистоты линий подсолне-
чника на основе микросателлитных локусов ДНК //
Масличные культуры. Научно-технический бюл-
летень Всероссийского научно-исследователь-
ского института масличных культур. – 2018. –
Вып. 3 (175). – С. 34–39.

Ключевые слова: подсолнечник, линии, генети-
ческая чистота, ДНК, микросателлитные локусы.

Широкое внедрение гибридов в производство
в основном сдерживается из-за сложного семено-
водства, предусматривающего поддержание роди-
тельских линий на высоком уровне генетический
чистоты. Поэтому целью работы была оптимиза-
ция определения параметров генетической чистоты
линий подсолнечника на основе
микросателлитных локусов ДНК. Материалом для
исследования служили 12 линий коллекции подсол-
нечника Армавирской опытной станции ВНИИМК.
Геномную ДНК выделяли из 100 отдельных 5–
7-дневных этиолированных проростков подсол-
нечника каждого образца с использованием
СТАВ-буфера. Показано, что 11 пар праймеров
для ПЦР выявляют стабильный, воспроизводя-
щийся полиморфизм фракций амплифицирован-
ной ДНК. В результате проведенных

исследований для определения параметров гене-
тической чистоты линий подсолнечника с помо-
щью микросателлитных локусов ДНК с
использованием критериев уровня полиморфизма
были отобраны семь пар праймеров. Для оптими-
зации метода две пары праймеров (ORS 5 и Har
432) были объединены в мультиплексный набор.
Остальные пять локусов (ORS 559, Har 432, ORS 5,
ORS 815, ORS 1144) амплифицировались отдель-
но. Сократить количество анализов также позво-
ляет создание смесей, состоящих из
объединенных аликвот ДНК отдельных пророст-
ков в одной пробирке. В случае если после ПЦР
на фореграмме обнаруживаются дорожки с не-
сколькими фракциями, образцы ДНК, из которых
собрана эта нетипичная смесь, амплифицируются
отдельно, чтобы выяснить количество нетипич-
ных семян.

UDC 633.854.78:575

An optimization of determination of genetic purity parameters of sunflower lines basing on DNA mi- crosatellite loci.

S.Z. Guchetl, PhD in biology

S.S. Frolov, PhD in agriculture

E.S. Kuznetsova, laboratory assistant researcher

Armavir experimental station of the All-Russian re-
search institute of oil crops

The Central settlement of the experimental station of
VNIIMK, Armavir, Krasnodar region, 352925, Russia
Tel./fax: 8-861-37-3-13-76

E-mail: stanciya-vniimk@yandex.ru

Key words: sunflower, lines, genetic purity,
DNA, microsatellite loci.

The wide introduction of hybrids into production
is mainly limited by complicated seed growing fore-
seeing maintenance a high level of genetic purity of
parental lines. So the work purpose was to optimize
determination of parameters of sunflower lines genet-
ic purity basing on DNA microsatellite loci. We used
12 sunflower lines from collection of the Armavir
experimental station of the All-Russian research insti-
tute of oil crops (Krasnodar region). A genomic DNA
was isolated from 100 separate 5–7-days growing
etiolated sunflower seedlings of each sample using
STAB-buffer. The 11 pairs of primers for PCR
showed stable repeating polymorphism of fractions of
amplified DNA. Seven pairs of primers were chosen
as a result of determination of parameters of sunflow-
er lines genetic purity using DNA loci and criteria of
polymorphism level. To optimize the method two
pairs of primers (ORS 5 and Har 432) were united
into multiplex set. The last five loci (ORS 559, Har

432, ORS5, ORS 18, ORS 1144) were amplified separately. Creation of mixture containing united aliquots of DNA of the separate seedling in a vial allows decrease analyses quantity. In case of detection the ways with several fractions on phoregram after PCR, DNA samples of this atypical mixture are amplified apart to ascertain amount of off-type seeds.

Введение. Подсолнечник является основной масличной культурой в Российской Федерации, причем межлинейные гибриды занимают значительные посевные площади. Широкое внедрение гибридов в производство главным образом сдерживается сложностью их семеноводства, предусматривающего поддержание родительских линий и поколения F_1 на высоком уровне генетической чистоты [1]. Существующий для определения генетической чистоты метод грунтового контроля семян энергозатратен, а получаемая оценка субъективна и требует длительного времени. Наиболее удобными для характеристики генотипов являются маркеры, основанные на полиморфизме биохимических признаков, таких как изоферменты и запасные белки [2; 3; 4], а также нуклеотидные последовательности ДНК (ДНК-маркеры) [5; 6; 7]. С помощью данных маркеров можно проводить как оценку гибридной чистоты партий семян, так и осуществлять идентификацию линий и гибридов сельскохозяйственных культур. На подсолнечнике в разных учреждениях оценивают генетическую чистоту линий и гибридов всеми перечисленными выше способами [2; 4; 7; 8]. Кроме того, в 2015 г. Международной организацией стандартизации (ISO) издан стандарт ISO/TR 17622:2015 по определению типичности подсолнечника с помощью ДНК-маркеров [9]. В данном стандарте для анализа генетической чистоты подсолнечника предложено использовать шестнадцать пар микросателлитных праймеров к SSR-локусам. Микросателлитные повторы ДНК (SSR) являются вполне приемлемыми в качестве генетических маркеров, поскольку расположены в геноме эукариот случай-

ным образом, обладают высоким уровнем полиморфизма, кодоминантны, хорошо воспроизводятся при повторном проведении полимеразной цепной реакции. Но, несмотря на несомненную привлекательность применения ДНК маркеров для селекционно-генетических исследований, ограничением их использования может быть стоимость расходных материалов и лимит времени, накладываемый требованиями экспресс-анализа. Поэтому многими группами исследователей преследуется цель создания эффективной и экономичной системы анализа. Так, чтобы упростить процедуру и уменьшить стоимость флюоресцентного анализа SSR, были оптимизированы условия мультиплексного ПЦР и гель электрофореза в генетическом исследовании инбредных линий подсолнечника *Helianthus annuus* L. [10]. Акинина Г.Е. с соавторами объединили шестнадцать пар микросателлитных праймеров к SSR-локусам, предложенным к использованию в стандарте ISO/TR 17622:2015 для определения генетической чистоты подсолнечника, в пять мультиплексов в зависимости от температуры отжига и размеров продуктов амплификации [7]. Исследовательской группой Супруна И.И. разработан мультиплексный набор ДНК локусов для маркерной селекции яблони на устойчивость к парше и для идентификации штаммов парши яблони [11; 12].

Целью нашей работы была оптимизация определения параметров генетической чистоты линий подсолнечника на основе микросателлитных локусов ДНК.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили 12 линий подсолнечника коллекции АОС ВНИИМК: ВА 93, ВА 760, ВА 761, ВА 4, ВА 6, ВА 384, ВА 389, ВА 317, ВА 325, ВК 21, ВА 337, ВА 737. Геномную ДНК выделяли из 100 отдельных 5–7-дневных этилированных проростков подсолнечника каждого образца с помощью модифицированного метода Saghai-Marooft et al. [13] с использованием СТАВ буфера.

Для проведения ПЦР использовали

25 мкл реакционной смеси следующего состава: 67 мМ трис-HCl, pH 8,8; 16,6 мМ сульфата аммония; 1,5–3 мМ MgCl₂; 0,01 % Tween 20; по 0,2 мМ дезоксирибонуклеозидфосфатов; по 10 пМ праймеров; 10 нг матричной ДНК и 1 ед. рекомбинантной термостабильной ДНК полимеразы. Амплификацию проводили в приборе Терцик (ДНК-технология, Россия). Условия амплификации: начальная денатурация при 96 °С в течение 2 мин, затем 30 циклов при соблюдении температурно-временного режима: отжиг при 55–60 °С в течение 40 с, элонгация – 1 мин при 70 °С, денатурация при 94 °С – 30 с, финальная элонгация – 2 мин. Использовали 11 SSR-локусов, описанных в работе Гучетль С.З. с соавторами [14]. Электрофорез продуктов амплификации проводили в агарозном геле (2 % агароза, 1 × ТАЕ-буфер и 1 × SB-буфер) с использованием камеры для горизонтального электрофореза (SE. 2, ДНК-технология, Россия) в течение 1–1,5 ч при силе тока 60 мА и напряжении 90–100 V. Последующее окрашивание осуществляли бромистым этидием. Визуализация и документирование результатов электрофореза обеспечивались при помощи трансиллюминатора ЕСХ-F20.М (WILBER LOURMAT, Франция) и фотоаппарата Canon EOS 550D (Япония). Идентификацию и определение размеров аллелей микросателлитных локусов проводили путём сравнения со стандартным образцом – маркером молекулярной массы 100 bp (СИБЭНЗИМ, Москва).

Индекс полиморфного содержания (PIC) [15] и эффективное число аллелей (n_e) [16] 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 оценки генетической чистоты линий предварительно была выполнена их паспортизация по микросателлитным локусам. В резуль-

тате исследований, проведенных Гучетль С.З. с соавторами [14] для линий АОС ВНИИМК, было показано, что 11 пар праймеров для ПЦР из 18 изученных выявляют стабильный воспроизводящийся полиморфизм фракций амплифицированной ДНК, что позволяет использовать их для молекулярно-генетической паспортизации. Эти праймеры пригодны и для оценки генетической чистоты партий семян. При отборе маркеров, оптимальных для данной цели, использовали такой критерий, как уровень полиморфизма. Для этого в пределах использованной группы линий вычисляли такие показатели, как наблюдаемое число аллелей на полиморфный локус (n_a), индекс полиморфного содержания (PIC) и эффективное число аллелей (n_e). Характеристики ДНК-локусов представлены в таблице.

Таблица

Характеристика ДНК-локусов, использованных для паспортизации линий подсолнечника АОС ВНИИМК

Армавирская ОС ВНИИМК, 2018 г.

Локус	Молекулярный вес продукта (п.н.)	Температура отжига (°C)	PIC	n_a	n_e
Har 514	180–190	55	0,58	3	2,38
Har 1608	240–280	55	0,69	4	3,22
ORS 559	100–150	55	0,48	2	1,96
ORS 1287	200–210	55	0,48	2	1,96
Har 432	175–180	60	0,41	2	1,69
Har 1327	195–205	60	0,17	2	1,20
Har 432	0–165	60	0,49	2	1,96
ORS 5	320–350	60	0,46	2	1,85
ORS 815	180–200	60	0,48	2	1,96
ORS 1144	136–177	60	0,46	2	1,85
ORS 533	170–175	60	0,48	2	1,96

Примечание: PIC – индекс полиморфного содержания; n_a – наблюдаемое число аллелей; n_e – эффективное число аллелей

Наиболее полиморфными локусами были Har 514 и Har 1608 (наибольшее n_a , PIC и n_e). Остальные локусы, за исключением Har 1327 с низкими показателями полиморфизма, имели средний уровень полиморфизма (n_a равное 2, PIC от 0,41 до 0,49, n_e от 1,69 до 1,9 (таблица). Поэтому в работе использовали как максимально полиморфные маркеры, так и маркеры со

средним уровнем полиморфизма: Har 514, Har 1608, ORS 559, Har 432, ORS 5, ORS 815, ORS 1144.

Традиционный лабораторный метод определения генетической чистоты линий сельскохозяйственных культур включает анализ 50–100 семян по 4–16 биохимическим или молекулярным маркерам [2; 5; 6; 7; 8]. Для снижения стоимости и времени проведения анализа, включая как этап ПЦР, так и электрофорез продуктов реакции, некоторые локусы нами были объединены в мультиплексы. Мультиплексная ПЦР является вариантом ПЦР технологии, где амплифицируются два или больше локуса одновременно в той же самой реакции. При объединении ДНК-маркеров в мультиплексы учитывали размеры амплифицируемых фрагментов и температуру отжига праймеров (таблица). Четко визуализированные продукты реакции с неперекрывающимися диапазонами размеров фрагментов ДНК удалось получить лишь для двух пар праймеров – Har 432 и ORS 5 (рис. 1).

Рисунок 1 – Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК мультиплексных локусов SSR ORS 5 и Har 432 у линии подсолнечника BA 760

Поэтому эти две пары SSR-праймеров анализировались вместе, а не вошедшие в мультиплексы использовались для амплификации ДНК отдельно. Затем готовили смеси ДНК экспериментальных образцов путем объединения аликвот из пяти ДНК проростков в одной пробирке, т.е. получали 20 пробирок со смесью ДНК по каждому образцу. Далее проводили амплификацию по одному мультиплексу и пяти парам праймеров. Для

выявления типичных генотипов сравнивали полученные электрофоретические спектры экспериментальных образцов с молекулярно-генетическими паспортами линий. Поскольку инбредные линии подсолнечника представляют собой выровненный материал, объединенный образец ДНК должен быть представлен, по большей части, одной фракцией, типичной для данной линии. В случае если на фореграмме обнаруживаются дорожки с несколькими фракциями, образцы ДНК, из которых собрана эта нетипичная смесь, амплифицируются отдельно (рис. 2), чтобы выяснить количество нетипичных семян.

А

Б

Рисунок 2 – Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК локуса SSR ORS 5. А – амплифицированные фрагменты ДНК объединенных аликвот из пяти ДНК проростков: дорожки 1–4 – типичные; дорожка 5 – нетипичные. Б – ДНК-фрагменты пяти проростков из нетипичной объединенной смеси ДНК, амплифицированные отдельно: дорожки 1, 3, 4 – типичные; дорожки 2, 5 – нетипичные

Для определения генетической чистоты линий, вычисляли процент типичных растений в анализированной выборке.

Заключение. В сравнении с методами определения генетической чистоты, используемыми другими исследователями [5; 7; 8], предлагаемый оптимизированный способ является более экономичным. Он позволяет сократить количество анализов за счет использования мультиплексного набора и объединения ДНК, выделенной из отдельных проростков, в смеси.

Таким образом, для определения параметров генетической чистоты линий подсолнечника с помощью микросателлитных локусов ДНК, с использованием критериев уровня полиморфизма были отобраны семь пар праймеров. Для оптимизации метода две пары праймеров – ORS 5 и Har 432, были объединены в мультиплексный набор. Остальные пять локусов амплифицировались отдельно. Сократить количество анализов также позволяет объединение аликвот ДНК отдельных проростков в смеси в одной пробирке.

Список литературы

1. Зайцев Н.И., Деревенец В.Н., Фролов С.С. Эффективные приемы гибридного семеноводства подсолнечника // Земледелие. – 2009. – № 8. – С. 9–10.
2. Гучетль С.З., Челюстникова Т.А., Антонова Т.С. Некоторые особенности определения генетической чистоты линий и гибридов подсолнечника методом изоферментного анализа // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2015. – № 4 (164). – С. 14–19.
3. Zhuang S. Application of esterase isozyme for identifying the purity of hybrid rice cultivars // Fujian Journal of Agricultural Sciences. – 2004. – Vol. 1. – Is. 4. – P. 247–249.
4. Nikolic Z., Vujakovic M., Jevtic A. Genetic purity of sunflower hybrids determined on the basis of isozymes and seed storage proteins // Helia. – 2008. – Vol. 31. – No 2 (48). – P. 47–54.
5. Сахарова А.Н., Андреева Г.Н., Фесенко И.А., Хрусталева Л.И., Карлов Г.И. Применение SSR-маркеров для оценки уровня гибридности семян F₁ огурца // Известия ТСХА. – 2011. – Вып. 6. – С. 150–155.
6. Дубина Е.В., Королёва С.В., Гаркуша С.В., Юрченко С.А., Есаулова Л.В. Разработка методической схемы оценки гибридности семян F₁ *Brassica oleracea* L., основанной на полиморфизме микросателлитных ДНК-маркеров // Достижения науки и техники АПК. – 2016. – Т. 30. – № 8. – С. 49–51.
7. Акинина Г.Е., Тереняк Ю.Н., Шарыпина Я.Ю., Попов В.Н. Генетическая чистота семян – актуальный вопрос современной генетики и селекции растений // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2016. – Т. 18. – С. 56–60.
8. Способ оценки типичности инбредных линий и уровня гибридности семян F₁ подсолнечника: патент № 2294965 РФ / Антонова Т.С., Челюстникова Т.А., Гучетль С.З., Рамазанова С.А.; заявл. 04.07. 05, опубл. 10.03.07. – Бюл. № 17. – С.1–7.
9. Molecular biomarker analysis – SSR analysis of sunflower. ISO/TR 17622:2015. International standard. – 2015. – 11 p.
10. Zhang L.-S., Becquet V., Shao-Hua L., Zhang D. Optimization of multiplex PCR and multiplex gel electrophoresis in sunflower SSR analysis using infrared fluorescence and tailed primers // Acta Botanica Sinica. – 2003. – Vol. 45. – Is. 11. – P. 1312–1318.
11. Супрун И.И., Токмаков С.В., Степанов И.В., Иванова А.М. Разработка мультиплексного набора для маркерной селекции яблони на устойчивость к парше // Научные труды Государственного научного учреждения Северо-Кавказского зонального научно-исследовательского института садоводства и виноградарства Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2017. – Т. 12. – С. 26–30.
12. Токмаков С.В., Супрун И.И., Насонов А.И. Разработка мультиплексной SSR-маркерной системы для идентификации штаммов парши яблони // Микология и фитопатология. – 2017. – Т. 51. – № 6. – С. 394–403.
13. 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.
14. Гучетль С.З., Фролов С.С., Зайцев Р.Н., Кузнецова Е.С. Паспортизация линий и гиб-

ридов подсолнечника селекции Армавирской опытной станции ВНИИМК: подбор оптимальных ДНК локусов и условий ПЦР // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2017. – № 3 (171). – С. 23–28.

15. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях: Научно-методическое руководство / Под ред. Сиволапа Ю.М. – Киев: Аграрна наука, 1998. – 156 с.

16. Айала Ф., Кайгер Д. Современная генетика. – М.: МИР, 1988. – Т. 3. – 332 с.

References

1. Zaytsev N.I., Derevenets V.N., Frolov S.S. Effektivnyye priyemy gibridnogo semenovodstva podsolnechnika // Zemledeliye. – 2009. – № 8. – С. 9–10.

2. Guchetl' S.Z., CHelyustnikova T.A., Antonova T.S. Nekotoryye osobennosti opredeleniya geneticheskoy chistoty liniy i gibridov podsolnechnika metodom izofermentnogo analiza // Maslichnyye kul'tury. Nauch.-tekhn. byul. VNIIMK. – 2015. – № 4 (164). – С. 14–19.

3. Zhuang S. Application of esterase isozyme for identifying the purity of hybrid rice cultivars // Fujian Journal of Agricultural Sciences. – 2004. – Vol. 1. – Is. 4. – P. 247–249.

4. Nikolic Z., Vujakovic M., Jevtic A. Genetic purity of sunflower hybrids determined on the basis of isozymes and seed storage proteins // Helia. – 2008. – Vol. 31. – No 2 (48). – P. 47–54.

5. Sakharova A.N., Andreyeva G.N., Fesenko I.A., Khrustaleva L.I., Karlov G.I. Primeneniye SSR-markeroV dlya otsenki urovnya gibridnosti semyan F1 ogurtsa // Izvestiya T'SKHA. – 2011. – Vyp. 6. – С. 150–155.

6. Dubina E.V., Korolyova S.V., Garkusha S.V., Yurchenko S.A., Esaulova L.V. Razrabotka metodicheskoy skhemy otsenki gibridnosti semyan F1 Brassica oleracea L., osnovannoy na polimorfizme mikrosatelitnykh DNK-markeroV // Dostizheniya nauki i tekhniki APK. – 2016. – Т. 30. – № 8. – С. 49–51.

7. Akinina G.E., Terenyak YU.N., SHarypina YA.YU., Popov V.N. Geneticheskaya chistota semyan – aktual'nyy vopros sovremennoy genetiki i selektsii rasteniy // Faktori eksperimental'noi evolyutsii organizmiv. – 2016. – Т. 18. – С. 56–60.

8. Sposob otsenki tipichnosti inbrednykh liniy i urovnya gibridnosti semyan F1 podsolnechnika: patent № 2294965 RF /

Antonova T.S., CHelyustnikova T.A., Guchetl' S.Z., Ramazanova S.A.; zayavl. 04.07. 05, opubl. 10.03.07. – Byul. № 17. – С.1–7.

9. Molecular biomarker analysis – SSR analysis of sunflower. ISO/TR 17622:2015. International standard. – 2015. – 11 p.

10. Zhang L.-S., Becquet V., Shao-Hua L., Zhang D. Optimization of multiplex PCR and multiplex gel electrophoresis in sunflower SSR analysis using infrared fluorescence and tailed primers // Acta Botanica Sinica. – 2003. – Vol. 45. – Is. 11. – P. 1312–1318.

11. Suprun I.I., Tokmakov S.V., Stepanov I.V., Ivanova A.M. Razrabotka mul'tipleksnogo nabora dlya markernoy selektsii yablони na ustoychivost' k parshe // Nauchnyye trudy Gosudarstvennogo nauchnogo uchrezhdeniya Severo-Kavkazskogo zonal'nogo nauchno-issledovatel'skogo instituta sadovodstva i vinogradarstva Rossiyskoy akademii sel'skokhozyaystvennykh nauk. – 2017. – Т. 12. – С. 26–30.

12. Tokmakov S.V., Suprun I.I., Nasonov A.I. Razrabotka mul'tipleksnoy SSR-markernoy sistemy dlya identifikatsii shtammov parshi yablони // Mikologiya i fitopatologiya. – 2017. – Т. 51. – № 6. – С. 394–403.

13. 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. – Vol. 81. – P. 8014–8018.

14. Guchetl' S.Z., Frolov S.S., Zaytsev R.N., Kuznetsova E.S. Pasportizatsiya liniy i gibridov podsolnechnika selektsii Armavirskoy opytnoy stantsii VNIIMK: podbor optimal'nykh DNK lokusov i usloviy PTSR // Maslichnyye kul'tury. Nauch.-tekhn. byul. VNIIMK. – 2017. – № 3 (171). – С. 23–28.

15. Ispol'zovaniye PTSR-analiza v genetiko-selektsionnykh issledovaniyakh: Nauchno-metodicheskoye rukovodstvo / Pod red. Sivolapa YU.M. – Kiyev: Agrarna nauka, 1998. – 156 s.

16. Ayala F., Kayger D. Sovremennaya genetika. – М.: МИР, 1988. – Т. 3. – 332 с.

Получено: 03.05.2018 Принято: 17.09.2018

Received: 03.05.2018 Accepted: 17.09.2018