

УДК 633.854.78:575

4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений (биологические науки, сельскохозяйственные науки)

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МУТАЦИИ *Ol* С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ УСКОРЕНИЯ СЕЛЕКЦИИ ПОДСОЛНЕЧНИКА НА КАЧЕСТВО МАСЛА

Иванов Сергей Владимирович
магистрант
РИНЦ SPIN-код: 9382-0895
email: sergey.ivanov23042000@gmail.com
Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар, Россия

Самелик Елена Григорьевна
к.б.н, доцент
РИНЦ SPIN-код: 2733-8712
email: esamelik@yandex.ru
Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар, Россия

Гучетль Саида Заурбиевна
к.б.н., ведущий научный сотрудник
РИНЦ SPIN-код: 4878-6315
email: saida.guchetl@mail.ru
ФГБНУ ФНЦ Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта, Краснодар, Россия

Селекция на высокоолеиновость масла ведется уже довольно давно. Первый высокоолеиновый сорт подсолнечника Первенец был получен во ВНИИМК в 1976 году при использовании химического мутагенеза и получил широкое распространение в зарубежных странах. На сегодняшний момент в структуре площадей, занятых под подсолнечник в России высокоолеиновый занимает около 1 %, когда в США такой подсолнечник возделывается на 85-90 % площадей. В России аграрная сфера полна разнообразными сортами и гибридами подсолнечника, отличающихся урожайностью, масличностью, группой спелости и устойчивостью к вредным организмам, а доля отечественных высокоолеиновых сортов и гибридов не велика. В основном, поставщиками являются иностранные селекционные компании, но в свете последних событий может возникнуть дефицит посевного материала высокоолеинового подсолнечника. Одним из методов ускорения селекционного процесса является молекулярное маркирование хозяйственно-ценных признаков, что улучшит процесс отбора, а именно выбраковка не нужных генотипов еще до цветения культуры и уменьшая объем выборки. В статье показаны результаты исследований линий подсолнечника на наличие мутации *Ol*, отвечающей за высокоолеиновость масла в семенах куль-

UDC 633.854.78:575

4.1.2. Plant breeding, seed production and biotechnology (biological sciences, agricultural sciences)

IDENTIFICATION OF MUTATION *Ol* USING MOLECULAR MARKERS TO ACCELERATE SUNFLOWER BREEDING FOR OIL QUALITY

Ivanov Sergey Vladimirovich
undergraduate
RSCI SPIN-code: 9382-0895
email: sergey.ivanov23042000@gmail.com
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Samelik Elena Grigorievna
Cand.Biol.Sci, associate professor
RSCI SPIN-code: 2733-8712
email: esamelik@yandex.ru
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Guchetl Saida Zaurbievna
Cand.Biol.Sci, leading Researcher
RSCI SPIN-code: 4878-6315
email: saida.guchetl@mail.ru
All-Russian Research Institute of Oil Crops named after V.S. Pustovoit, Krasnodar, Russia

Plant breeding for high oleic oil has been going on for quite a long time. The first high-oleic sunflower variety called Pervenets was obtained at VNIIMK in 1976 using chemical mutagenesis and was widely used in foreign countries. At present, in the structure of areas occupied by sunflower in Russia, high-oleic sunflower occupies about 1%, while in the USA such sunflower is cultivated on 85-90% of the area. In Russia, the agricultural sector is full of various varieties and hybrids of sunflower, differing in yield, oil content, ripeness group and resistance to harmful organisms, and the share of domestic high-oleic varieties and hybrids is not large. The main suppliers are foreign breeding companies, but in the light of recent events, there may be a shortage of high-oleic sunflower seeds. One of the methods for accelerating the breeding process is the molecular marking of economically valuable traits, which will improve the selection process, namely the culling of unnecessary genotypes even before the flowering of the crop and reducing the sample size. The article shows the results of studies of sunflower lines for the presence of the *Ol* mutation, which is responsible for the high oleic content of the oil in the seeds of the crop. The electrophoretic spectra of gel electrophoresis are presented, proving the presence of the required mutation in the studied lines

туры. Приведены электрофоретические спектры гель-электрофореза, доказывающие наличие иско-мой мутации в исследуемых линиях

Ключевые слова: ПОДСОЛНЕЧНИК, ВЫСОКО-ОЛЕИНОВОСТЬ, ДНК-МАРКЕРЫ, ПОЛИМЕ-РАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ, МУТАЦИЯ

Keywords: SUNFLOWER, HIGH OLEINITY, DNA MARKERS, POLYMERASE CHAIN REACTION, MUTATION

<http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-187-006>

Введение. Подсолнечник одна из передовых масличных культур в нашей стране. Полученное из него растительное масло является основой рационального питания населения. Обладая большой энергетической цен-ностью, это вещество богато биологически активными веществами необ-ходимыми в рационе питания, одним из таких является мононенасыщенная олеиновая кислота с концентрацией на уровне 30 %. Потребительские за-просы требуют от производителей масел не только стандартные, но и спе-циализированные масла растительного происхождения с измененными жирно-кислотными характеристиками.

Изменение качественного и количественного состава масла одно из потребительски заинтересованных направлений в селекции подсолнечни-ка. Повышение олеиновой кислоты в масле семян ведут с помощью введе-ния в сорта и гибриды мутации, которая блокирует образование линолевой кислоты, что приводит к накоплению олеиновой кислоты [1].

Такое масло отличается высоким содержанием олеиновой кислоты, способствующее повышению технологических качеств масла. Высокое со-держание олеиновой кислоты придает высокую устойчивость при терми-ческой обработке и увеличивает продолжительность срока годности из-за низкой окислительной способности данного масла, что в свою очередь яв-ляется преимуществом для масложировой промышленности. Переработка такого масла снижает издержки производства на экстракции и гидрогени-зации, в связи с высокой окислительной способностью масло проще транспортируется и хранится. Полученные результаты призваны повысить эффективность создания сортов и гибридов с хозяйственно-ценным при-

<http://ej.kubagro.ru/2023/03/pdf/06.pdf>

знаком улучшенного состава масла, что в перспективе окажет воздействие на качество продуктов питания [2].

Применение методов маркер-ассоциированной селекции повышает скорость и эффективность селекционных процессов. Преимущества использования ДНК маркеров состоят в том, что они позволяют получать результаты генотипирования в короткие сроки и с высокой точностью. Следовательно, в целях увеличения эффективности скрещиваний ненужные генотипы можно удалять из посевов еще на начальных стадиях развития растения. Результаты могут быть использованы для эффективного отбора форм растений наследующих искомый признак [1].

Цель исследования: увеличение эффективности отбора генотипов подсолнечника, обладающих доминантной мутацией высокоолеиновости масла, с помощью ДНК-маркеров.

Для решения цели выполнялись следующие задачи:

- подбор маркеров для проведения исследования;
- подбор семенного материала линий подсолнечника с высокоолеиновым и низкоолеиновым фенотипом;
- выделение ДНК и проведение полимеразной цепной реакции с подобранными ДНК-маркерами;
- обобщение результатов исследования и подведения итогов опыта.

Материалы и методы: В исследовании использовали линии подсолнечника ВНИИМК: высокоолеиновые – НО; низкоолеиновые – ЛО, а также их гибриды.

Выделение геномной ДНК производилось из первой пары настоящих листьев подсолнечника с использованием набора для выделения ДНК – «Diamond DNA».

Характеристика праймеров, применяемых в исследовании представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Нуклеотидные последовательности праймеров

Название праймера	Последовательность нуклеотидов праймера	Источник
F13	TCAACAGCCTCTTCCTCCTCAG	[4]
R5	GTAGTTTTGGAAAGCTAGAGACC	
F4	GTAACGTCTGCGCGCTTGCAGACATCA	
R1	GGTTTTGCATGAGGGACTCGATCGAGTG	
F11	TTAAGTCTGTGACAATGGGTCTTG	
R11	CCATTACCCGATTTGAGTTCAC	
F12	GTTTGTGGAGCAAGATGATGAAG	
R12	CAACACATACTGCGTTACATCCA	
N1-1F	TTGGAGTTCGGTTTATTTAT	[3]
N1-1R	TTAGTAAACGAGCCTGAAC	

Реакционная для проведения полимеразной цепной реакции на 1 образец: 17,2 мкл деионизированной воды, 2,5 мкл AS-буфера для стандартного ПЦР, 0,5 мкл дезоксирибонуклеозидфосфатов, 1,25 мкл хлорида магния, 0,25 мкл бычьего сывороточного альбумина, по 0,1 мкл праймеров (прямого и обратного), 0,1 мкл рекомбинантной термостабильной ДНК-полимеразы и 3 мкл матричной ДНК.

Параметры термоциклирования исследуемых образцов подсолнечника подробно описаны в работах авторов [1, 3, 4].

Электрофорез продуктов амплификации (для пар праймеров F13/R5, F4/R1, F11/R11, F12/R12) проводили в 2 %-ом агарозном геле, окрашенном этидиум бромидом. Детекцию продуктов амплификации праймеров N1-1F/N1-1R осуществляли в денатурирующем 8 %-ом полиакриламидном геле, окрашенном нитратом серебра (AgNO_3). В качестве отрицательного контроля (К-) использовалась деионизированная вода.

Расшифровка электрофоретических спектров проводилась в ультрафиолетовом свете с помощью трансэлюминатора GenoSens 2200 Touch (Clinx Science Instrument Co, Китай). Длину амплифицированных ДНК фрагментов измеряли в компьютерном программном обеспечении Im-

ageLab 5.0 (Bio-Rad, США) в сравнении с маркером молекулярного веса фрагментов ДНК.

Результаты исследований. Для генотипирования был проведен подбор маркеров по признаку высокоолеиновости масла подсолнечника. Маркер F4/R1 (INDEL) сконструирован для диагностики наличия мутации *Ol* у подсолнечника. Маркер F13/R5 описан, что при его взаимодействии как с мутантным, так и с диким генотипом амплификация участка ДНК происходит независимо от наличия или отсутствия мутации *Ol* [5]. Другой тип маркеров – это кодоминантные SSR-маркеры F11/R11, F12/R12 и N1-1F/N1-1R. Микросателлитные маркеры тесно сцеплены с мутацией *Ol* [4]. Перспективность использования такого типа маркеров обусловлена тем, что они позволяют определять гибридное состояние аллелей гена *FAD 2-1* и выполнять отбор гетерозиготных генотипов из расщепляющихся популяций. Эти маркеры были испытаны в нашем исследовании.

В ходе исследования подтверждено, что праймерная пара F13/R5 в результате полимеразной цепной реакции гибридизуется с ДНК всех исследуемых фенотипов, то есть идет амплификация участка ДНК, независимо от генотипа. Данный локус мы использовали в качестве положительного контроля, чтобы исключить ложноотрицательный результат на наличие искомой мутации. Образцы в ходе испытаний амплифицировали фракцию длиной около 340 п. н., которая соответствует и мутантному, и дикому генотипам (рисунок 1).

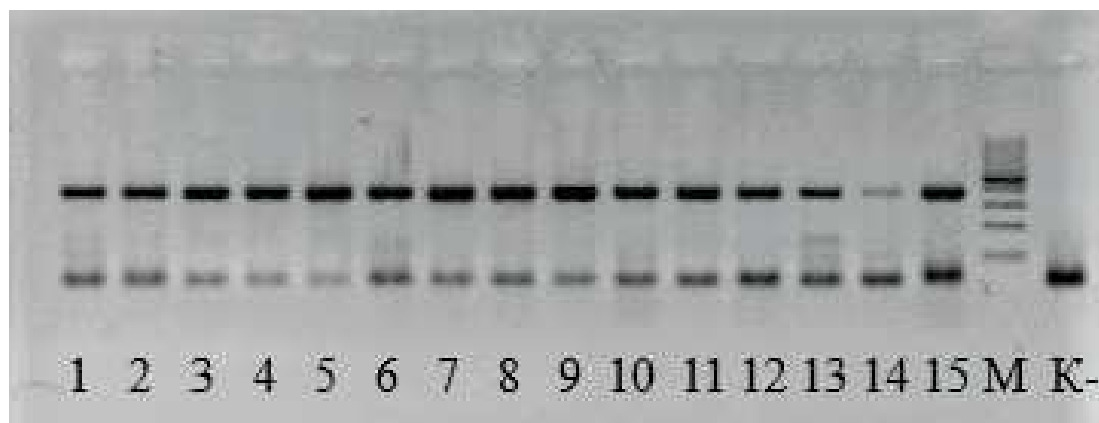


Рисунок 1 – Электрофоретические спектры образцов подсолнечника при амплификации с маркером F13/R5 (положительный контроль).

На испытываемых образцах с парой праймеров F4/R1 была амплифицирована фракция ДНК только у мутантных образцов. Данная фракция отсутствовала в образцах подсолнечника с диким фенотипом (рисунок 2).

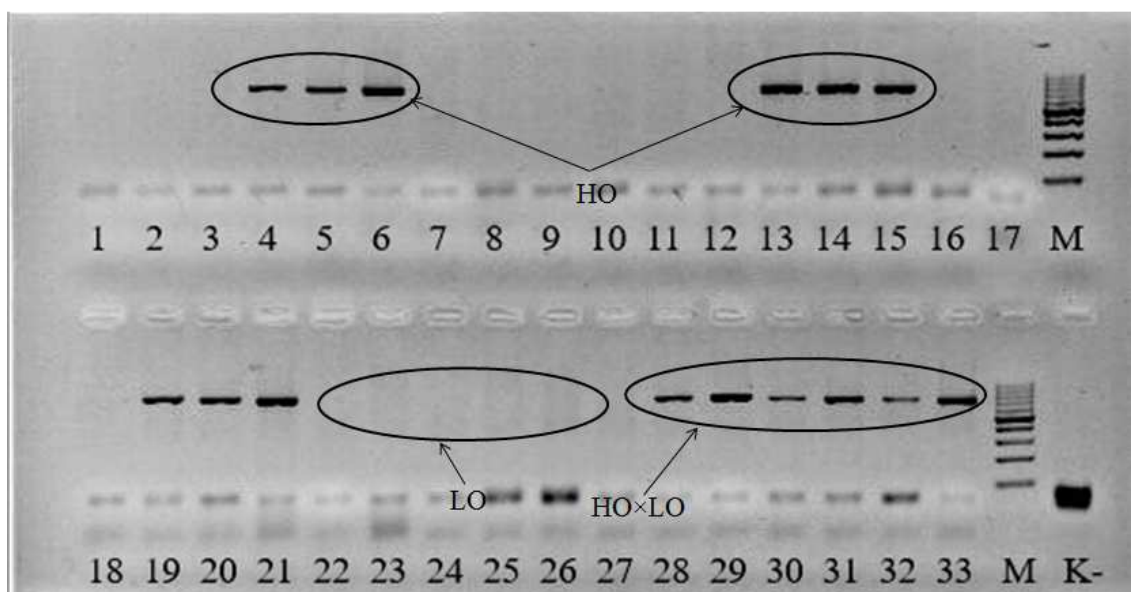


Рисунок 2 – Электрофоретические спектры образцов подсолнечника при амплификации с праймерами F4/R1. Дорожка 1-3 (LO_1), 4-6 (HO_1), 7-9 (LO_2), 10-12 (LO_3), 13-15 (HO_2), 16-18 (LO_4), 19-21 (HO_3), 22-24 (LO_5), 25-27 (HO_5), 28-29 ($HO_1 \times LO_5$), 30-31 ($HO_3 \times LO_1$), 32-33 ($HO_5 \times LO_3$), М – маркер молекулярного веса, К- – отрицательный контроль.

Обобщенные данные по детекции продуктов полимеразной цепной реакции приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты полимеразной цепной реакции ДНК

№ п/п	Генотип	*К+	**К–	Маркер F4/R1 мутации <i>Ol</i>
1	HO ₁	+***	–	+
2	HO ₂	+	–	+
3	HO ₃	+	–	+
4	HO ₄	+	–	+
5	HO ₅	+	–	+
6	LO ₁	+	–	–
7	LO ₂	+	–	–
8	LO ₃	+	–	–
9	LO ₄	+	–	–
10	LO ₅	+	–	–
11	HO ₁ ×LO ₅	+	–	+
12	HO ₃ ×LO ₁	+	–	+
13	HO ₅ ×LO ₃	+	–	+
14	HO ₂ ×LO ₄	+	–	+
15	HO ₄ ×LO ₂	+	–	+

*Положительный контроль (маркер F13/R5)

**Отрицательный контроль (H₂O)

*** + наличие амплифицированного фрагмента ДНК

– отсутствие амплифицированного фрагмента ДНК

Из таблицы видно, что у исследуемых родительских линий подсолнечника № 1-5 присутствует мутация *Ol*, а у №6-10 – искомая мутация отсутствует. Амплифицированная ДНК гибридов от их скрещивания представлена одним фрагментом ДНК, характеризующим только доминантный аллель гена *Ol*. Следовательно, маркер F4/R1 не дает представления об аллельном состоянии гена. То есть на данном этапе исследования нельзя сказать в гомо- или гетерозиготном состоянии находится признак.

В связи с этим были подобраны кодоминантные SSR-маркеры, которые должны маркировать оба аллеля одновременно. Но для всех изучаемых образцов маркеры F11/R11 и F12/R12 не выявили полиморфизма. Пара праймеров N1-1F/N1-1R амплифицирует микросателлитный фрагмент ДНК, расположенный в интроне гена FAD 2-1. В результате разделения продуктов ПЦР в агарозном геле была выявлена мономорфная фракция длиной 240 п.н., которая наблюдалась во всех исследуемых генотипах – и высокоолеиновых, и низкоолеиновых (рисунок 3).

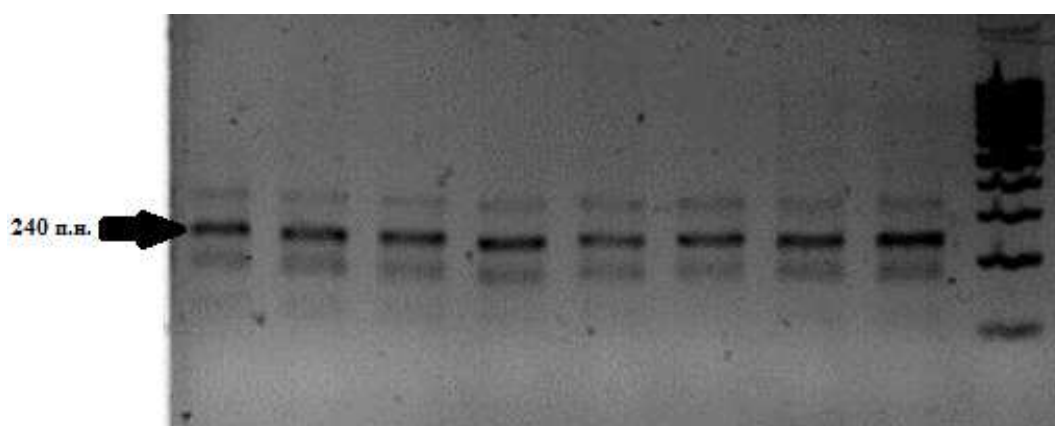


Рисунок 3 – Электрофоретические спектры образцов подсолнечника при амплификации с праймерами N1-1F/N1-1R в агарозном геле.

По данным зарубежных источников, ПЦР-амплификация кодоминантного микросателлитного локуса N1-1F/N1-1R отжигает фрагменты 243/246/249 п. н. [3]. Но разница в 3-6 п.н. является трудноразличимой. Поэтому, после проведения ПЦР продукты реакции с праймером N1-1F/N1-1R были разделены нами в денатурирующем полиакриламидном геле, который обладает большей разрешающей способностью, чем агарозный. Были найдены различия между длинами аллелей у высокоолеинового генотипа НО (дорожка 1) и генотипа дикого типа LO (дорожки 2, 3 и 5), что позволило детектировать гетерозиготный спектр у их гибрида (дорожка 4) (рисунок 4). Следовательно, данный маркер можно использовать для

определения гетерозиготного статуса особи в случае, если его родительские формы различаются по аллельному состоянию этого локуса.

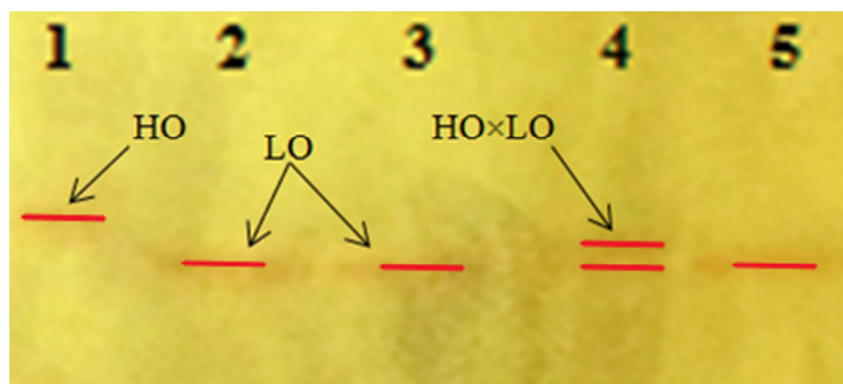


Рисунок 4 – Электрофоретические спектры образцов подсолнечника при амплификации с праймерами N1-1F/N1-1R в денатурирующем 8 %-ом полиакриламидном геле.

Выводы. При помощи маркера F4/R1 в исследуемых родительских линиях подсолнечника № 1-5 подтвердилось наличие в генотипе мутации *O1*, а у №6-10 – она отсутствует. Гибриды по маркеру несут только доминантный аллель мутантного типа. Следовательно, маркер F4/R1 не дает полной информации об аллельном состоянии гена. Для этого был валидирован маркер N1-1F/N1-1R, позволяющий детектировать гетерозиготные генотипы у гибридов, родительские формы которых несут контрастные аллели. Этот маркер в дальнейшем может применяться для более эффективного генотипирования мутации высокоолеиновости масла.

Список литературы

1. Гучетль, С. З. Доминантные молекулярные маркеры мутации высокоолеиновости масла в семенах подсолнечника / С. З. Гучетль // Масличные культуры. – 2020. – № 2(182). – С. 24-32.
2. Демури́н, Я. Н. Создание и изучение рекомбинантных инбредных линий подсолнечника с различным содержанием олеиновой кислоты в масле семян / Я.Н. Демури́н, Ю.В. Чебанова, О.М. Борисенко [и др.] // Масличные культуры. – 2020. – №. 2 (182).
3. Lacombe S., Souyris I., Bervillé A.J. An insertion of oleate desaturase homologous sequence silences via siRNA the functional gene leading to high oleic acid content in sunflower seed oil // Molecular Genetics and Genomics. – 2009. – V. 281. – P. 43-54.

4. Schuppert G.F., Tang S., Slabaugh M.B. and Knapp S.J. The sunflower high-oleic mutant Ol carries variable tandem repeats of FAD2-1, a seed-specific oleoyl-phosphatidyl choline desaturase // *Molecular Breeding*. – 2006. –V. 17. – P. 241-256.

References

1. Guchetl', S. Z. Dominantnye molekulyarnye markery mutacii vysokooleino-vosti masla v semenah podsolnechnika / S. Z. Guchetl' // *Maslichnye kul'tury*. – 2020. – № 2(182). – S. 24-32.

2. Demurin, YA. N. Sozdanie i izuchenie rekombinantnyh inbrednyh linij podsolnechnika s razlichnym sodержaniem oleinovej kisloty v masle semyan / YA.N. Demurin, YU.V. CHEbanova, O.M. Borisenko [i d.r.] // *Maslichnye kul'tury*. – 2020. – №. 2 (182).

3. Lacombe S., Souyris I., Bervillé A.J. An insertion of oleate desaturase homologous sequence silences via siRNA the functional gene leading to high oleic acid content in sunflower seed oil // *Molecular Genetics and Genomics*. – 2009. – V. 281. – P. 43-54.

4. Schuppert G.F., Tang S., Slabaugh M.B. and Knapp S.J. The sunflower high-oleic mutant Ol carries variable tandem repeats of FAD2-1, a seed-specific oleoyl-phosphatidyl choline desaturase // *Molecular Breeding*. – 2006. –V. 17. – P. 241-256.