



УДК 631.524.86:582.952.6:633.854.78
DOI 10.25230/conf12-2023-246-252

**РАЗРАБОТКА И ВНЕДРЕНИЕ ДНК-МАРКЕРОВ В СЕЛЕКЦИЮ
ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS L.*) ВО ВНИИМК**

Савиченко Д.Л., Логинова Е.Д., Гучетль С.З.
ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

d_savichenko@mail.ru, asdfghjklis@mail.ru, saida.guchetl@mail.ru

Во ВНИИМК ведется работа по переходу к маркер-вспомогательной селекции подсолнечника – повышению эффективности селекционного процесса путем внедрения анализов с помощью ДНК-маркеров. На данный момент успешно проводится валидация маркера гена восстановления фертильности *Rfl* и нескольких признаков толерантности



подсолнечника к гербицидам. Достигнут прогресс в картировании гена вертикальной устойчивости к расе G заразики и в ближайшем будущем будет уточнено его местоположение и разработан кодоминантный маркер. Параллельно ведется доработка и адаптация всех применяемых маркеров к массовым анализам, что является ключевым условием для внедрения в практическую селекцию.

Ключевые слова: подсолнечник, *Helianthus annuus*, MAS, маркер-вспомогательная селекция, ДНК-маркеры.

Введение. Подсолнечник основная масличная культура в РФ, на 2022 год занимает рекордные площади возделывания – 10 032,8 тыс. га. [1]. Подсолнечное масло занимает четвертое место по популярности после пальмового, соевого и рапсового, на него приходится около 12 % мирового производства растительных масел [2, 3].

За последние 30 лет, несмотря на прогресс в молекулярной биологии, агрономически важные комплексные количественные признаки: урожайность, уровень гетерозиса, засухоустойчивость и масличность остаются сложными в изучении и требуют полногеномных подходов. При этом маркеры моногенных признаков, таких как: устойчивость к гербицидам, высокое содержание олеиновой кислоты, устойчивость к некоторым патогенам и восстановление фертильности успешно используются в иностранных программах селекции в течение многих лет, где смогли обеспечить повышение эффективности отборов и контроля генотипов [4].

Во ВНИИМК активно ведется работа по валидации и применению ДНК-маркеров в селекционном процессе [5–7]. Существует множество моногенных селекционно-ценных признаков, для которых еще предстоит разработать ДНК-маркеры. Некоторые из уже опубликованных маркеров показывают невозпроизводимость результатов и требуют доработки. Для внедрения маркеров в практическую селекцию обязательными условиями является: прохождение валидации на селекционном материале ВНИИМК и обоснованность их применения, в том числе экономическая. В связи с этим, необходимо также провести работу по повышению производительности массовых анализов, оптимизации затрачиваемого времени, снижению расхода реактивов и расходных материалов.

Цель работы – повысить эффективность селекционного процесса подсолнечника путем использования ДНК-маркеров селекционно-ценных признаков.

Решаемые для достижения цели задачи:

1. поиск маркерных локусов селекционно-ценных признаков;
2. создание ДНК-маркеров *de novo*;
3. поиск опубликованных маркеров, доработка и валидация на селекционном материале ВНИИМК;
4. оптимизация применения ДНК-маркеров в массовых анализах;
5. разработка методик и определение этапов селекционного процесса, эффективность которых можно повысить с помощью каждого из маркеров.

Материал и методы. Для дизайна и редизайна праймеров использовались генетические базы данных GenBank[®], RefSeq (Reference Sequence) а также онлайн-ресурс Primer-BLAST (NCBI, США) [8, 9]. Для решения некоторых задач также задействовались базы данных, содержащие информацию о геноме подсолнечника – «Sunflower Genome Database», «INRAE Sunflower Bioinformatics Resources» [10, 11]. Для анализа биоинформатических данных использовалось программное обеспечение UGENE (Унипро, РФ) [12]. ДНК из растительного материала выделялась методом СТАВ с некоторыми модификациями [13], а также набором МагноПрайм[®] ФИТО (НекстБио, РФ) при помощи автоматической станции экстракции и очистки нуклеиновых кислот «Auto-pure 96» (Allsheng, КНР). Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени и детекция результатов проводилась в системе для проведения



количественной ПЦР QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием 2,5х реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I (Синтол, РФ). Классическая ПЦР проводилась в амплификаторе нуклеиновых кислот MiniAmp™ (Thermo Fisher Scientific, США). Протоколы амплификации и состав реакционной смеси различались и корректировались для каждого исследования. Реактивы и олигонуклеотиды для проведения ПЦР произведены ООО «Синтол» (РФ). Детекция результатов ПЦР проводилась 1,5 %-ном агарозном геле, или в 8 % полиакриламидном геле. Все ДНК-маркеры проходили валидацию на разных выборках селекционного материала ВНИИМК в зависимости от задач исследования.

Результаты и обсуждение. Ген восстановления фертильности *Rf1*. Коммерческие гибриды подсолнечника основаны на одном источнике цитоплазматической мужской стерильности (CMS), так называемой цитоплазме CMS PET1 [14, 15]. В большинстве случаев линия-восстановитель фертильности подсолнечника будет нести доминантный ген *Rf1*, который был введен в селекцию подсолнечника линией T66006-2-1-B. Использование надежного ДНК-маркера гена *Rf1* позволило бы значительно повысить эффективность процесса создания гибридов подсолнечника [16]. В исследовании Д.В. Горюнова с соавторами были выделены 22 гена-кандидата *Rf1* [17]. В то же время, R. Horn с соавторами идентифицировали 9 кандидатов гена *Rf1*, из которых 4 совпадали с указанными в вышеупомянутом исследовании. Были разработаны и протестированы 10 SNP, связанных с восстановлением фертильности, один из SNP – PPR621 был использован для разработки двух маркеров SCAR (SequenCe Characterized Amplified Region) PPR621.5R и PPR621.5M, которые позволили идентифицировать и различать линии-восстановители фертильности и линии-закрепители стерильности на выборке из 557 образцов. Однако данный маркер требует постановки двух отдельных ПЦР реакций [18]. Для устранения этого недостатка авторами был создан кодоминантный маркер KASP 621.5 (Kompetitive Allele Specific Polymorphic), который позволяет идентифицировать аллельное состояние гена *Rf1* в рамках одной ПЦР, а также детектировать до 10 % загрязнения при анализе листьев [19]. На данный момент олигонуклеотиды для KASP производятся LGC Biosearch Technologies (Великобритания), что делает ненадежным их использование в РФ, поэтому актуальна разработка альтернативного решения. Одним из вариантов является создание маркера PAMSA (PCR Amplification of Multiple Specific Alles), суть которого состоит в удлинении одного из аллель-специфичных праймеров для создания искусственного полиморфизма длин амплифицируемых фрагментов, однако данный подход подразумевает использование классического гель-электрофореза для детекции результатов. Использование геля значительно затрудняет массовые анализы, добавляя дополнительный трудоемкий этап с низкой производительностью.

Определено несколько этапов работы. Первый этап заключался в постановке двух отдельных ПЦР в реальном времени с разными аллель-специфичными праймерами в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I, для первичной валидации маркера на селекционном материале ВНИИМК. В результате валидации маркера на 15 линиях и гибридах подсолнечника были получены результаты, полностью соответствующие ожидаемым. Дальнейшее увеличение выборки нецелесообразно, так как во втором этапе исследования будут созданы экспериментальные маркеры, адаптированные к массовым анализам, которые необходимо валидировать на широком наборе генотипов. Определены 2 основных направления создания экспериментальных альтернативных маркеров для SNP PPR621. Первое направление работы – создание системы из общих праймеров и аллель-специфичных зондов TaqMan®, которая позволит проводить анализ, аналогичный маркерам KASP с детекцией в реальном времени. В случае невозможности создания такой системы, предлагается модификация существующих аллель-специфичных праймеров флуоресцентными метками, которые позволят проводить одну ПЦР реакцию с дальнейшей детекцией в генетическом анализаторе «Нанофор 05». Данный подход хоть и добавляет



дополнительный этап, однако он значительно производительнее классического гелелектрофореза и связан со значительно меньшим влиянием «человеческого фактора». К тому же, при использовании нескольких маркеров с разными флуоресцентными метками, возможно проведение детекции результатов в генетическом анализаторе сразу двух и более образцов в одной пробирке, что снизит затраты расходных материалов.

Таким образом, SCAR-маркер гена *Rfl* – PPR621.5 прошел первичный этап валидации на селекционном материале ВНИИМК. На данный момент проводится работа по созданию маркерной системы для массовых анализов с целью внедрения в селекционный процесс.

Толерантность подсолнечника к гербицидам. Несколько видов толерантности к гербицидам, ингибирующим большую субъединицу фермента ацетогидроксикислой синтазы (AHASL) или ацетолактатсинтазы (ALS), стали очень популярным инструментом при возделывании гибридов подсолнечника, поскольку они облегчают применение гербицидов класса имидазолинонов (IMI), либо сульфонилмочевин (SU) против широколиственных сорняков [20, 21]. Из трех генов *AHASL*, только мутации в *AHASL1* обеспечивают толерантность подсолнечника к гербицидам. Было обнаружено 4 различных мутантных аллеля, 3 из которых используются для коммерческого использования в селекции гибридов подсолнечника: Imisun/Clearfield[®], CLPlus/Clearfield Plus[®], Sures/ExpressSun[®] [22, 23]. Мутантный аллель *Ahasl1-1* придает умеренную толерантность к IMI, а *Ahasl1-2* высокую толерантность к SU. Аллель *Ahasl1-3* приводит к высокому уровню толерантности к IMI [24]. Наиболее широкий диапазон толерантности к гербицидам проявляет аллель *Ahasl1-4* обеспечивающий толерантность подсолнечника сразу ко всем технологиям, однако на данный момент этот аллель гена широко не используется в производстве [25]. Опубликовано несколько ДНК-маркеров толерантности к гербицидам: первый из них SNP-маркер частично доминантной толерантности к гербицидам для технологии Imisun/Clearfield[®]. Маркер SSR, использующий различия в количестве повторов (ACC), присутствующих в гене *AHASL1*, позволяет дифференцировать аллель *Ahasl1* дикого типа (WT) и аллели *Ahasl1-1* и *Ahasl1-2* (Imisun и Sures) [22]. Для обнаружения аллеля *Ahasl1-3* (CLPlus) разработан CAPS маркер, позволяющий детектировать маркерный SNP путем расщепления продукта ПЦР рестрикционным ферментом *BmgBI* [26]. Несмотря на существующие маркерные системы по данному признаку, высказывается мнение, что разработка эффективных скрининговых тестов на устойчивость к гербицидам имеет ключевое значение для селекционных программ [27, 28]. Во ВНИИМК ведутся исследования всех типов толерантности к гербицидам с помощью малозатратной фенотипической полевой оценки [29]. Однако, при проведении оценки в условиях закрытого грунта, растения подсолнечника, несущие ген толерантности, могут поражаться и элиминироваться даже сниженными дозами гербицида. В связи с этим актуально использование ДНК-маркеров каждого аллеля гена *AHASL1*. Упомянутый выше SSR-маркер позволяет обнаруживать аллели WT, Imisun и Sures в рамках одной ПЦР, и на данный момент успешно проходит валидацию и проверку кодоминантности на селекционном материале ВНИИМК. Существующий маркер CAPS для аллеля *Ahasl1-3* (CLPlus) требует использования фермента рестрикции *BmgBI*, что усложняет применение маркера в массовых анализах. Ведется работа по созданию дополнительного аллель-специфичного праймера аллеля *Ahasl1-3* для SSR-маркера, который, в случае успеха, позволит проводить анализ сразу 4 аллелей гена *AHASL1* в рамках одной ПЦР и с помощью флуоресцентной метки осуществлять детекцию в генетическом анализаторе. При использовании дополнительного общего праймера, возможно проводить детекцию результатов ПЦР сразу двух образцов в одной пробирке, что снизит затраты. На данный момент разработанный маркер позволяет различать линии подсолнечника, несущие аллель *Ahasl1-3*, однако утрачивает эффективность при анализе гибридных растений, и требует доработки.

Устойчивость подсолнечника к заразихе (*Orobanche cumana* Wallr.). Одной из главных угроз для выращивания подсолнечника является заразиха (*Orobanche cumana* Wallr.)



– паразитическое растение, которое может приводить к значительной потере урожая вплоть до 100 %. Селекция на устойчивость подсолнечника к заразице является самым эффективным методом борьбы с ней. Использование ДНК-маркеров генов устойчивости, в особенности кодоминантных, значительно повышает эффективность отборов и способно усовершенствовать процесс создания селекционного материала [21]. Первым картированным геном был *Or₅*, располагающийся в теломерной области 3 хромосомы генетической карты подсолнечника [30]. Также I. Imerovski *et al.* картировали на хромосоме 3 рецессивный ген *or_{ab-vl-8}*, который обеспечивает устойчивость к расам выше F, и главный QTL рецессивного характера, определяющий устойчивость к расе G. Оба расположены в неперекрывающейся области с геном *Or₅* [31, 32]. Сообщается, что другие основные гены устойчивости находятся на хромосомах, отличных от хромосомы 3. P. Duriez *et al.* картировали ген устойчивости к расе F на хромосоме 7 [33]. E. Hassan *et al.* и A. Martín-Sanz *et al.* отнесли *Or_{SH}* к верхней половине хромосомы 4 [34, 35]. Также недавно сообщалось, что ген *Or_{Deb2}*, придающий устойчивость к расе G, располагается на 4 хромосоме между запатентованными маркерами SNP DHA1000240 и DHA1007796 и не является аллельным гену *Or_{SH}* [36, 37]. Ранее нами было исключено положение гена устойчивости к расе G заразицы в верхней части хромосомы 3 в районе непосредственной близости с микросателлитными локусами ORS 683, ORS 1040, ORS 1112 [38]. Для текущего исследования были отобраны ДНК-маркеры, локализующиеся в областях генома подсолнечника, где ранее была обнаружена связь с признаком устойчивости к расе G заразицы. По предварительным результатам нами была обнаружена статистически значимая связь нескольких маркеров с изучаемым признаком. Продолжается работа по точному картированию гена устойчивости подсолнечника к расе G заразицы и созданию кодоминантного маркера.

Заключение. На данный момент во ВНИИМК успешно проходят валидацию ДНК-маркеры гена восстановления фертильности *Rf1* и нескольких типов толерантности к гербицидам. После внедрения в селекционный процесс подсолнечника маркеры позволят определять аллельное состояние генов, а также проводить оценку растений в ситуациях, когда невозможно использовать классические методы фенотипирования. Достигнут прогресс в картировании гена вертикальной устойчивости к расе G заразицы. Будет уточнено его положение и создан кодоминантный ДНК-маркер данного признака. Его применение в практической селекции позволит значительно снизить количество фитопатологических анализов, облегчить отбор устойчивых растений и контроль генотипов в скрещиваниях. Основными преимуществами данного подхода является высокая скорость проведения анализов и возможность устанавливать аллельное состояние гена напрямую, не прибегая к анализу потомства. А главное, ДНК-маркеры позволяют решить сложную, для классических методов фенотипирования, задачу пирамидирования нескольких генов устойчивости с целью создания долговременной устойчивости подсолнечника к патогенам.

Литература

1. Росстат. Главный межрегиональный центр. Посевные площади. Российской Федерации в 2022 году. https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/posev-4%D1%81%D1%85_2022.xlsx Дата обращения 24.12.22
2. Dimitrijević A. *et al.* Oleic acid variation and marker-assisted detection of Pervenets mutation in high-and low-oleic sunflower cross // Crop Breeding and Applied Biotechnology. 2017. Т. 17. С. 235–241.
3. Rauf S. *et al.* Progress in modification of sunflower oil to expand its industrial value // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2017. Т. 97. № 7. С. 1997–2006.
4. Dimitrijevic A., Horn R. Sunflower hybrid breeding: from markers to genomic selection // Frontiers in Plant Science. 2018. Т. 8. С. 2238.



5. Гучетль С.З. Доминантные молекулярные маркеры мутации высокоолеиновости масла в семенах подсолнечника // Масличные культуры. 2020. Вып. 2 (182). С. 24–32.
6. Челюстикова Т.А., Гучетль С.З., Антонова Т.С. Применение молекулярных маркеров для идентификации ЦМС-Rf системы в родительских линиях гибридов подсолнечника // Масличные культуры. 2017. № 4 (172). С. 3–9
7. Рамазанова С.А., Бадьянов Е.В., Савиченко В.Г. [и др.] Оценка сцепления гена *Plarg*, контролирующего устойчивость к ложной мучнистой росе у подсолнечника, и микросателлитных локусов ДНК // Масличные культуры. 2022. № 3 (191). С. 14–23.
8. База данных открытого доступа GenBank [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
9. Ye J. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // BMC Bioinformatics. 2012. Т. 13. № 134.
10. База данных генома подсолнечника [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.sunflowergenome.org>.
11. База данных генома подсолнечника [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.heliagene.org>.
12. Okonechnikov K. et al. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. 2012. Т. 28. № 8. С. 1166–1167.
13. Boom R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // Journal of clinical microbiology. 1990. Т. 28. № 3. С. 495–503.
14. Vear F. Changes in sunflower breeding over the last fifty years // OCL Oilseeds and fats crops and lipids. 2016. Т. 23. № 2. С. 1–8.
15. Bohra A. et al. Cytoplasmic male sterility (CMS) in hybrid breeding in field crops // Plant Cell Reports. 2016. Т. 35. № 5. С. 967–993.
16. Kinman M.L. New developments in the USDA and state experiment station sunflower breeding programs // Proceedings of the 4th International Sunflower Conference. Paris: International Sunflower Association, 1970. С. 181–183.
17. Goryunov D. V. et al. Association mapping of fertility restorer gene for CMS PET1 in sunflower // Agronomy. 2019. Т. 9. № 2. С. 49.
18. Horn R. et al. Development and validation of markers for the fertility restorer gene *Rf1* in sunflower // International journal of molecular sciences. 2019. Т. 20. № 6. С. 1260.
19. Radanović A. et al. KASP markers specific for the fertility restorer locus *Rf1* and application for genetic purity testing in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) // Genes. 2022. Т. 13. № 3. С. 465.
20. Sala C.A. et al. Genetics and breeding of herbicide tolerance in sunflower // Helia. 2012. Т. 35. № 57. С. 57–70.
21. Škorić D., Pacureanu M. Sunflower breeding for resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) // Proceedings of the International Symposium “Sunflower Breeding on Resistance to Diseases”. Krasnodar, Russia. 2010. С. 19–30.
22. Kolkman J.M. et al. Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonylurea herbicides in sunflower // Theoretical and Applied Genetics. 2004. Т. 109. № 6. С. 1147–1159.
23. Sala C. A. et al. Genetics and breeding of herbicide tolerance in sunflower // Helia. 2012. Т. 35. № 57. С. 57–70.
24. Sala C.A. et al. Molecular and biochemical characterization of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower // Theoretical and Applied Genetics. 2008. Т. 118. № 1. С. 105–112.
25. Sala C.A., Bulos M. Inheritance and molecular characterization of broad range tolerance to herbicides targeting acetohydroxyacid synthase in sunflower // Theoretical and Applied Genetics. 2012. Т. 124. № 2. С. 355–364.



26. Bulos M. *et al.* Marker assisted selection for herbicide resistance in sunflower // *Helia*. 2013. Т. 36. № 59. С. 1–16.
27. Breccia G. *et al.* Rapid test for detection of imidazolinone resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Plant Breeding*. 2011. Т. 130. № 1. С. 109–113.
28. Vega T. *et al.* Acetohydroxyacid synthase (AHAS) in vivo assay for screening imidazolinone-resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Plant physiology and biochemistry*. 2012. Т. 61. С. 103–107.
29. Лукомец В.М., Трунова М.В., Демушин Я.Н. Современные тренды селекционно-генетического улучшения сортов и гибридов подсолнечника во ВНИИМК // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021. Т. 25. № 4. С. 388–393.
30. Tang S. *et al.* Genetic mapping of the *Or5* gene for resistance to *Orobanche* race E in sunflower // *Crop Science*. 2003. Т. 43. № 3. С. 1021–1028.
31. Imerovski I. *et al.* Mapping of a new gene for resistance to broomrape races higher than F // *Euphytica*. 2016. Т. 209. № 2. С. 281–289.
32. Imerovski I. *et al.* BSA-seq mapping reveals major QTL for broomrape resistance in four sunflower lines // *Molecular Breeding*. 2019. Т. 39. № 3. С. 1–15.
33. Duriez P. *et al.* A receptor-like kinase enhances sunflower resistance to *Orobanche cumana* // *Nature Plants*. 2019. Т. 5. № 12. С. 1211–1215.
34. Hoelt E. *et al.* Genetic markers for *Orobanche* resistance in sunflower: пат. 7872170 США. – 2011. US/2008/0178325 A1
35. Martín-Sanz A. *et al.* Characterization of post-haustorial resistance to sunflower broomrape // *Crop Science*. 2020. Т. 60. № 3. С. 1188–1198.
36. Gao W. *et al.* Molecular markers associated with *Orobanche* resistance in sunflower: пат. 10883148 США. – 2021. WO/2018/187543 A1
37. Fernández-Aparicio M. *et al.* Genetic and physiological characterization of sunflower resistance provided by the wild-derived *Or_{Deb2}* gene against highly virulent races of *Orobanche cumana* Wallr // *Theoretical and Applied Genetics*. 2022. Т. 135. № 2. С. 501–525.
38. Guchetl S.Z., Savichenko D.L., Ramazanova S.A. The search for the location of the sunflower resistance gene to race G of broomrape on the linkage map in the lines of breeding of VNIIMK // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing, 2021. Т. 699. № 1. С. 012008.

**DEVELOPMENT AND INTRODUCTION OF DNA-MARKERS IN SUNFLOWER
(*HELIANTHUS ANNUUS* L.) BREEDING IN V.S. PUSTOVOIT ALL-RUSSIAN
RESEARCH INSTITUTE OF OIL CROPS**

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

At V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops, the work is underway to switch to marker-assisted sunflower breeding – to improve the efficiency of the breeding process by introducing DNA-marker analyses. Currently, the validation of the marker of the fertility restorer gene Rf1 and several traits of sunflower tolerance to herbicides has been successfully carried out. Progress in the mapping of the vertical resistance gene to race G of broomrape has been made and soon its location will be clarified and a codominant marker will be developed. In the meantime, all used markers are being improved and adapted to mass analyses, which is a key requirement for introduction into practical breeding.

Key words: sunflower, *Helianthus annuus*, MAS, marker-assisted breeding, DNA markers.