

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ОДНОРОДНОСТИ СОРТООБРАЗЦА РЫЖИКА ПОСЕВНОГО С ПОМОЩЬЮ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

Логинава Е.Д., Рамазанова С.А. Литвиненко А.А., Сычева В.Ю., Горлов Л.С.
ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК
asdfghjklis@mail.ru

Рыжик посевной является масличной культурой с высоким содержанием масла и белка. При создании ДНК-паспортов необходимо учитывать однородность сорта. Наиболее удобным инструментом для этой задачи являются маркеры микросателлитных локусов (SSR). В работе применили 16 экспериментальных SSR-маркеров для изучения внутрисортного полиморфизма и выявления генетической неоднородности одного сортобразца рыжика посевного озимой формы. Детекция ПЦР-продуктов проводилась с помощью капиллярного электрофреза на генетическом анализаторе, что позволило определить точную длину аллелей. В результате только по двум маркерам изученный сортобразец был однородным. По остальным 14 маркерам были выявлены от 2 до 4 биотипов, отличающихся по размеру фрагментов ДНК. Таким образом, сортобразец оказался генетически неоднородным.

Ключевые слова: рыжик посевной (*Camelina sativa*), SSR-маркеры, микросателлиты, генетическое разнообразие, аллели, внутрисортной полиморфизм

Введение. С каждым годом в мире появляется всё больше новых сортов культурных растений, и для их идентификации требуются более совершенные методы. Современные технологии, основанные на анализе микросателлитных локусов ДНК, позволяют точно определить принадлежность к тому или иному сорту или гибриду практически всех сельскохозяйственных культур. Эти технологии уже активно используются для идентификации и паспортизации сортов и гибридов [1, 2]. В связи с последними изменениями в Федеральном законе о семеноводстве Российской Федерации, сорта сельскохозяйственных растений должны иметь генетический паспорт, который будет включать ДНК-маркеры, позволяющие идентифицировать сорта и гибриды сельскохозяйственных растений. Все сорта растений, заявленные на выдачу патента, должны обладать отличимостью, однородностью и стабильностью (критерий ООС) [3].

Если исследования по идентификации и паспортизации сортов и гибридов с использованием микросателлитных локусов проводятся для многих видов растений, то в специальной литературе довольно мало информации об исследованиях внутрисортной изменчивости сортов выращиваемых растений по SSR-локусам.

Изучение внутрисортного полиморфизма позволяет поддерживать генетическую чистоту (подлинность) сортов в первичном семеноводстве. Эти данные используются для целенаправленного подбора генотипов с ценными признаками, что важно при создании новых сортов и гибридов, а также для выявления доноров редких аллелей. Их можно сохранять для поддержания разнообразия базовой коллекции и включать в гибридизацию с целью выделения ценных генетических сегрегаций [4]. Информацию о внутрисортном полиморфизме необходимо учитывать и при создании молекулярно-генетических паспортов сортов.

Таким образом, анализ внутрисортного полиморфизма помогает повысить эффективность сельскохозяйственного производства и рост конкурентоспособности отечественной продукции на мировых рынках.



Для идентификации рыжика посевного *Camelina sativa* (L.) Crantz в настоящий момент не существует общепринятой методики. Нами были разработаны микросателлитные маркеры для идентификации этой культуры и проводится их изучение на сортообразцах и сортах рыжика посевного коллекции ВНИИМК [5, 6]. Однако, как уже сказано выше, изучение генетической чистоты сортов культуры до настоящего времени не проводилось. По способу опыления рыжик является факультативным самоопылителем с долей перекрестного опыления от 10 до 25%. В связи с этим представляет интерес изучение генетической однородности сортов рыжика.

Целью данной работы было исследовать внутрисортной полиморфизм сортообразца рыжика посевного с применением микросателлитных маркеров.

Материалы и методы. В исследовании использовались 16 экспериментальных микросателлитных маркеров: 18.294, 3.266, 14.303, 1.L271, 13.380, 2.330, 3.195, 7.335, 11.177, 13.277, 14.160, 14.228, 12.279, 7.125, 16.208, 8.406, синтезированных ООО «НПФ Синтол» (Россия). Прямые праймеры (F), фланкирующие целевые микросателлитные локусы, были модифицированы флуоресцентными метками.

Внутрисортной полиморфизм исследовали в сортообразце рыжика посевного озимой формы селекции ВНИИМК РО 22-4. Экстракция ДНК проводилась на автоматической станции Auto-Pure 96 (Allsheng, Китай) с помощью набора МагноПрайм ФИТО. Выделение осуществлялось из 23 семян рыжика индивидуально.

Реакционная смесь для полимеразной цепной реакции (ПЦР) объемом 10 мкл содержала: 10x ПЦР-буфер, 25 mM MgCl₂, dNTP – 2,5 mM; ДНК-полимераза – 1 е.а.; концентрация прямого (F) и обратного (R) праймеров – 100 пкМ/мкл; ДНК – 100 нг. Амплификация проводилась в термоциклере Applied Biosystems MiniAmp (Thermo Fisher Scientific, США) по следующим температурно-временным режимам: начальная денатурация – 94 °C – 3 мин, далее 35 циклов: денатурация 94 °C – 25 с, отжиг праймера 60 °C – 25 с, элонгация 72 °C – 40 с, и финальная элонгация 72 °C – 3 мин. Детекция продуктов ПЦР осуществлялась методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе Нанофор 05 (Синтол, Россия).

Результаты и обсуждение. Для изучения внутрисортного полиморфизма использовались разработанные нами экспериментальные SSR-маркеры. Степень их полиморфизма была изучена нами ранее [5]. Исследуемый образец представляет собой линию, полученную методом индивидуального отбора по фенотипическим признакам. Однако степень его генетической однородности неизвестна. В связи с этим, с целью выявления генетических особенностей, был проведён анализ ДНК 23 образцов данного сортообразца с использованием 16 микросателлитных маркеров. Из 16 микросателлитных маркеров только по двум (14.303, 14.228) изученный сортообразец был однородным. По остальным была выявлена внутрисортная изменчивость (табл.). Вероятно, это связано с высоким полиморфизмом исходных форм.

По микросателлитным маркерам 2.330 и 18.294 в образцах было выявлено наибольшее количество биотипов с аллелями разной длины – четыре. По четырем маркерам (3.266, 1.271, 13.277, 14.160) обнаружено по три аллеля, у остальных – по два.

Большинство маркеров выявили преобладающий аллель для данного генотипа с частотой встречаемости выше 90 %. Однако по четырем маркерам 11.177, 12.279, 7.125, 16.208 распределение частот встречаемости разных биотипов приблизительно одинаково. Например, по микросателлитному локусу 16.208 выявлены биотипы с размерами фрагментов 196 и 208 пар нуклеотидов и частоты их встречаемости составили 52,2 и 47,8 % соответственно.

Мы предполагаем, что несмотря на то, что изученный сортообразец генетически неоднороден, с помощью маркеров с высоким уровнем полиморфизма его можно отличить от других сортообразцов.

Таблица. Генетическая однородность сортообразца рыжика посевного по микросателлитным локусам

Маркер	Количество, выявленных аллелей	Длина аллелей, п.н.	Частоты встречаемости аллелей, %
18.294	4	268	45,7
		280	39,1
		283	10,9
		292	4,3
3.266	3	278	84,8
		281	8,7
		266	6,5
14.303	1	315	100,0
1.271	3	290	82,6
		278	13,0
		284	4,3
13.380	2	383	56,5
		380	43,5
2.330	4	346	67,4
		0	21,7
		340	6,5
		343	4,3
3.195	2	194	93,5
		191	6,5
7.335	3	331	91,3
		328	4,3
		334	4,3
11.177	2	188	58,7
		177	41,3
13.277	3	276	56,5
		270	32,6
		267	10,9
14.228	1	223	100,0
12.279	2	301	52,2
		280	47,8
7.125	2	131	54,3
		125	45,7
16.208	2	196	52,2
		208	47,8
8.406	2	405	97,8
		420	2,2

Выводы. С использованием 16 экспериментальных SSR-маркеров с разным уровнем полиморфизма была изучена однородность сортообразца РО 22-4. Выявлена его гетерогенность по 14 маркерам. По маркерам 3.195, 14.228 не выявлено внутрисортной изменчивости. Для получения генетически выровненного поколения целесообразно проводить отбор по микросателлитным локусам.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта № Н-24.1/10.

Литература

1. Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения // Успехи современной биологии. – 2004. – Т. 124. – № 3. – С. 260–271.
2. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution // Nature reviews genetics. – 2004. – Vol. 5. – № 6. – P. 435–445.



3. Федеральный закон «О семеноводстве» от 30.12.2021 N 454-ФЗ (последняя редакция) // Собрание законодательства Российской Федерации. 2022. № 1. ч. 1. Ст. 23.

4. Клименко И.А., Козлов Н.Н., Костенко С.И., Шамустакимова А.О., Мавлютов Ю.М. Идентификация и паспортизация сортов кормовых трав (клевера лугового, люцерны изменчивой, посевной и хмелевидной) на основе ДНК-маркеров (методические рекомендации), Москва: ООО «Угреша Т». – 2020. – 35 с.

5. Логинова Е.Д., Рамазанова С.А. Анализ полиморфизма микросателлитных локусов ДНК рыжика посевного *Camelina sativa* // Масличные культуры. – 2024. – Вып. 4 (200). – С. 63–39.

6. Логинова Е.Д., Рамазанова С.А., Гучетль С.З. Проверка SSR-маркеров для генотипирования рыжика посевного // Актуальные проблемы науки и практики в исследованиях молодых ученых: Сборник I международной научно-практической конференции, Новосибирск, 21–22 мая 2024 года. – Новосибирск: ИЦ НГАУ "Золотой колос". – 2024. – С. 11–15.

GENETIC ANALYSIS OF THE HOMOGENEITY OF A VARIETY SAMPLE OF FALSE FLAX USING MICROSATELLITE MARKERS

Loginova E.D., Ramazanova S.A., Litvinenko A.A., Sycheva V.Yu., Gorlov L.S.

False flax is an oil crop with high oil and protein content. For the development of DNA passports, it is necessary to consider the homogeneity of the variety. Microsatellite loci markers (SSRs) are the most convenient tool for this task. In this work, 16 experimental SSR markers were used to study the intravarietal polymorphism and to reveal the genetic heterogeneity of a variety of winter false flax. The PCR products were detected by capillary electrophoresis on a genetic analyzer, which allowed to determine the exact length of the alleles. As a result, the sample of the studied variety was homogeneous for only two markers. For the remaining 14 markers, from two to four biotypes were identified, which differed in the size of the DNA fragments. Thus, the variety sample was genetically heterogeneous.

Key words: *camelina sativa*, SSR markers, microsatellites, genetic diversity, alleles, intravarietal polymorphism.