

УДК 631.523:633.854.78  
DOI 10.25230/conf13-2025-03-46

**РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ  
ПОДСОЛНЕЧНИКА ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР**

**Головатская А.В., Гучетль С.З.**  
ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК  
annamoon11@mail.com

Эффективным и распространенным подходом в системе паспортизации являются микросателлитные ДНК-маркеры. С использованием разработанной нами мультиплексной системы, состоящей из семи микросателлитных ДНК-маркеров, удалось в короткие сроки идентифицировать и составить генетический паспорт 47 линий подсолнечника селекции ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК. Изученные в данной работе маркеры обладали высоким дискриминационным потенциалом (значение PIC выше 0,5) и являлись эффективными для паспортизации генотипов данной коллекции. По результатам составленного генетического паспорта отличимость всех изучаемых 47 линий по семи микросателлитным локусам составила 100 %.

Ключевые слова: подсолнечник, паспортизация, SSR-маркеры, мультиплексная ПЦР



**Введение.** Федеральный закон от 30 декабря 2021 года № 454-ФЗ «О семеноводстве», а именно, нормы о генетическом паспорте - вступают в силу 01.09.2025. Согласно упомянутому закону, на каждый представленный для проведения испытаний сорт или гибрид сельскохозяйственного растения, включенный в список родов и видов сельскохозяйственных растений, утвержденный Правительством Российской Федерации, будет разработан генетический паспорт, документ, созданный на основе молекулярно-генетического анализа семян [1]. Подсолнечник, как основная масличная культура Российской Федерации, входит в этот список. В форме генетического паспорта должны быть указаны белковые и (или) ДНК-маркеры, идентифицирующие сорт или гибрид семян сельскохозяйственного растения. Для разработки системы паспортизации наиболее эффективным инструментом являются технологии на основе ДНК-маркеров [2], и рядом преимуществ обладают микросателлиты, а именно – воспроизводимостью, кодоминантным характером наследования, высоким уровнем полиморфизма, обширным охватом генома, оптимальной частотой встречаемости в геноме, возможностью автоматизации анализа [3]. И помимо оценки новых сортов и гибридов, необходимо ведение единой базы генетических паспортов стандартных образцов семян сортов и гибридов и формирование банка таких образцов.

Для выполнения подобных массовых экспресс-анализов селекционного и семеноводческого материала необходимо значительно ускорять и удешевлять весь процесс анализа растений по ДНК-маркерам. И лучшим решением в этом вопросе будет анализ растительного материала одновременно по нескольким SSR-маркерам в одной ПЦР [4]. Проанализировав существующие исследования по данной тематике, было сделано заключение, что применяемые системы молекулярных маркеров не позволяют идентифицировать некоторые генотипы и не приспособлены к проведению массовых анализов [5], что подчеркивает актуальность выбранной нами темы.

Цель данного исследования – разработка системы микросателлитных маркеров для мультиплексной ПЦР, применимой в паспортизации линий и гибридов подсолнечника.

**Материал и методы.** В качестве материала для исследования использовали 47 селекционных линий подсолнечника ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, предоставленных лабораторией генетики отдела селекции и первичного семеноводства подсолнечника. Экстракция ДНК анализируемых генотипов осуществлялась из осевых органов зародыша сухой семянки с помощью набора реагентов «МагноПрайм ФИТО» («НекстБио», РФ). Для проведения ПЦР использовались 2 мкл исследуемой ДНК и 8 мкл реакционной смеси следующего состава: 1,25 мкл 10× ПЦР-Буфер-Б; 1,13 мкл 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,25 мкл 100 mM dNTP; по 0,05 мкл 100 пМ/мкл каждого праймера и 1 е.а. (0,25 мкл) SynTaq ДНК-полимеразы (Синтол, РФ). Амплификация выполнялась в термоциклере MiniAmp™ plus (Thermo Scientific, США) при следующих температурно-временных режимах: начальная денатурация при 96 °C в течение 2 мин, 35 циклов при температурно-временном режиме: денатурация при 94 °C – 30 сек, отжиг при 60 °C – 40 сек, элонгация при 72 °C – 1 мин, финальная элонгация при 72 °C – 2 мин. В работе использовались SSR-маркеры (табл. 1), разработанные авторами исследования [6].

Разделение продуктов амплификации осуществлялось методом капиллярного электрофореза в денатурирующих условиях на генетическом анализаторе «Нанофор-05» (ИАП РАН, РФ). Размер фрагментов определяли относительно размерного стандарта СД-600, меченным флуоресцентным красителем (Dy-632), с помощью компьютерного программного обеспечения GeneMarker software version 3.0.1. Анализ информативности микросателлитных локусов включал определение наблюдаемого (na), эффективного числа аллелей (ne) и индекса полиморфного информационного содержания (PIC). Вычисления проводили с помощью компьютерного программного обеспечения GenAIEx 6.5 [7].

**Результаты и обсуждение.** Основная работа исследования заключалась в отборе и объединении ранее разработанных и валидированных праймеров в системы мультиплексов. Их составление основывалось на фактической температуре отжига всех праймеров (60 °С), размере амплифицированного фрагмента ДНК и отсутствии комплиментарных участков ДНК между праймерами. Разработанные SSR-маркеры были локализованы на хромосомах 1, 2, 10, 12, 15 (табл. 1). В результате анализа ранее опубликованных работ [5, 6, 8] и апробирования разработанных микросателлитных маркеров на 5 линиях и 2 гибридах подсолнечника селекции ВНИИМК заявленным критериям соответствовали 7 микросателлитных ДНК-маркеров. Они были собраны в экспериментальную систему для мультиплексной ПЦР. В таблице 1 продемонстрированы 7 апробированных и отобранных микросателлитных маркеров.

**Таблица 1. Характеристика семи отобранных и апробированных микросателлитных маркеров**

Краситель	Название локуса	Мотив	Хромосома
R6G	SSRh1.6	(TAA)10	1
R6G	SSRh12.6	(TAA)21	12
R6G	1_136903738	(ATA)17	1
TAMRA	ORS815	(CTT)8	10
FAM	h15.15	(TAA)12	15
FAM	2_144127850	(TTA)11(CTA)5	2
ROX	SSRh1.3	(ATA)12	1

У изученных 7 генотипов было обнаружено 28 аллелей, в среднем 4 аллеля на локус. По результатам фрагментного анализа определены размеры ампликонов по каждому микросателлитному локусу. Размер аллелей находился в диапазоне от 163 до 473 п.н.

Для оценки дискриминационного потенциала исследуемых локусов испытания проводились на 47 селекционных линиях подсолнечника ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК. У SSR-локусов было выявлено от 4 до 13 аллелей, со средним числом 8,14 аллеля на локус. Показатель эффективного числа аллелей варьировал от 2,22 до 5,25. Среднее его значение составило 3,64. Значение PIC варьировало от 0,55 до 0,81 и в среднем составило 0,71. Наибольшим дискриминационным потенциалом обладал локус SSRh12.6 (на равное 8, PIC 0,81). Наименьший полиморфизм наблюдался у локуса ORS815 (табл. 2).

**Таблица 2. Показатели информативности SSR-локусов у линий подсолнечника селекции ВНИИМК**

ВНИИМК, Краснодар, 2024–2025 гг.

Локус	PIC	Na	Ne
SSRh1.6	0,72	10,00	3,51
SSRh12.6	0,81	8,00	5,25
1_136903738	0,75	13,00	3,92
ORS815	0,55	4,00	2,22
h15.15	0,67	9,00	3,05
2_144127850	0,69	5,00	3,23
SSRh1.3	0,77	8,00	4,27
Среднее	0,71	8,14	3,64

**Примечание.** Na – число аллелей на локус, Ne – эффективное число аллелей, PIC – индекс полиморфного информационного содержания

Маркер считается подходящим для идентификации и паспортизации, если число выявленных аллелей больше двух и индекс полиморфного информационного содержания превышает значения 0,5 [5]. Все входящие в состав мультиплексной системы маркеры



обладали высоким дискриминационным потенциалом значение PIC находились в диапазоне от 0,55 до 0,81 и являлись результативными для составления ДНК паспортов линий подсолнечника селекции ВНИИМК. На основе полученных данных анализа ДНК с помощью капиллярного электрофореза для исследуемых линий селекции ВНИИМК составили молекулярно-генетические паспорта. Для демонстрации в таблице 3 представлен ДНК паспорт только 10 из 47 линий подсолнечника.

Таблица 3. Аллельные состояния 7 микросателлитных локусов 10 линий подсолнечника коллекции ВНИИМК

ВНИИМК, Краснодар, 2024–2025 гг.

Линия	Микросателлитный локус						
	SSRh1.6	SSRh12.6	1_136903738	ORS815	h15.15	2_144127850	SSRh1.3
K225	187	294	436	183	250	467	276
K821	199	306	451	183	280	467	273
K1691	163	312	433	183	280	470	270
K2645	181	300	418	183	274	470	273
Сл2099	163	300	436	183	274	473	258
BK30	199	300	436	180	274	473	276
BK121	163	300	436	183	280	473	276
K3508	163	306	436	180	253	473	270
K824	196	312	433	183	280	467	273
K1810	163	297	433	183	280	467	273

Согласно составленному генетическому паспорту отличимость всех испытуемых 47 линий по 7 микросателлитным локусам составила 100 %.

**Заключение.** По результатам исследования с применением разработанной нами мультиплексной системы, состоящей из 7 микросателлитных ДНК маркеров, удалось в короткие сроки идентифицировать и составить ДНК паспорт 47 линий подсолнечника селекции ВНИИМК. Все использованные в данной работе маркеры обладали высоким дискриминационным потенциалом (значение PIC выше 0,5) и являлись эффективными для паспортизации генотипов данной коллекции.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность заведующему лабораторией генетики ВНИИМК Демурину Я.Н. и ведущему научному сотруднику лаборатории генетики ВНИИМК Чебановой Ю.В. за предоставленные семена линий генетической коллекции.

#### Литература

1. Федеральный закон «О семеноводстве» от 30.12.2021 N 454-ФЗ (последняя редакция) // Собрание законодательства Российской Федерации. – 2022. – № 1. ч. 1. – С. 2.2.
2. Markin N.V., Usatov A.V., Grinko A.V., Gavrilova V.A. SSR Analysis of Nuclear DNA of Annual and Perennial Sunflower Species (*Helianthus L.*) // Online Journal of Biological Sciences. – 2020. – vol. 20. – No. 2. – P. 77–83.
3. Сухарева А.С., Кулуев Б.Р. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений // Биомика. – 2018. – Т. 10. – № 1. – С. 69–84.
4. Guo L. et al. Multiplex SSR: A pipeline for developing multiplex SSR-PCR assays from resequencing data et al. Ecology and Evolution published by John Wiley & amp. – 2019. – vol. 10. – P. 3055. <https://doi.org/10.1002/ece3.61215>.

5. Гучетль С.З., Головатская А.В., Рамазанова С.А., Волошко А.А. Генетическое разнообразие линий подсолнечника российской селекции, выявленное с помощью анализа микросателлитных локусов // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2023. – № 24 (2). – С. 173–186.

6. Головатская А.В., Гучетль С.З. Оценка генетического разнообразия линий подсолнечника селекции ВНИИМК на основе мультиплексного микросателлитного анализа // Аграрная наука. – 2024. – № 11. – С. 117–121.

7. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and researchan update. Peakall R., Smouse P. Bioinformatics. – 2012. – vol. 28 (19). – P. 2537–2539.

8. Логинова Е.Д., Савиченко Д.Л., Гучетль С.З. Разработка новых SSR-маркеров для генотипирования линий и гибридов подсолнечника (*Helianthus annuus L.*) // Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки сельскохозяйственных культур: Сборник материалов 12-й Международной конференции молодых учёных и специалистов, Краснодар, 01–03 марта 2023 года. – Краснодар: Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта», 2023. – С. 153–158.

**DEVELOPMENT OF A SYSTEM OF SUNFLOWER MICROSATELLITE  
MARKERS FOR MULTIPLEX PCR  
Golovatskaya A.V., Guchetl S.Z.**

Microsatellite DNA-markers are an effective and widespread approach in the passportization system. Using developed by us the multiplex system consisting of seven microsatellite DNA-markers, it was possible to identify and compile a genetic passport of 47 sunflower lines from V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops in a short time. The markers studied in this work had high discriminatory potential (PIC value above 0.5) and were effective for passportization of genotypes of this collection. According to the results of the compiled genetic passport, the distinguishability of all studied 47 lines by seven microsatellite loci amounted to 100%.

Key words: sunflower, passportization, SSR-markers, multiplex PCR