



УДК 633.854.78:575

DOI 10.25230/conf11-2021-102-106

## ПРОБЛЕМА ДЕТЕКЦИИ ГЕТЕРОЗИГОТНЫХ ГЕНОТИПОВ ПО МУТАЦИИ ГЕНА *FAD 2-1* ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS L.*) С ПОМОЩЬЮ ДНК-МАРКЕРОВ

Савиченко Д.Л., Гучетль С.З.

ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

d\_savichenko@mail.ru, saida.guchetl@mail.ru

Развитие маркер-ассоциированной селекции требует разработки систем ДНК-маркеров, отвечающих потребностям селекционного процесса. Ведется поиск возможностей для повышения эффективности селекции на высокое содержание олеиновой кислоты в подсолнечном масле. Одним из направлений является совершенствование существующей маркерной системы в сторону детекции гетерозиготного статуса аллелей гена *FAD 2-1*. Проведен поиск информации, опубликованной в базах данных по данному локусу ДНК. Рассмотрена структура нуклеотидных последовательностей мутантного аллеля и аллеля дикого типа. Предложен путь совершенствования существующей маркерной системы.

Ключевые слова: подсолнечник, *Helianthus annuus L.*, высокоолеиновость, ДНК-маркеры, полимеразная цепная реакция.

**Введение.** Масло семян подсолнечника (*Helianthus annuus L.*) обогащено 55–70 % линолевой кислоты (18:2), а содержание олеиновой кислоты (18:1) в сортах и гибридах подсолнечника с традиционным жирно-кислотным составом колеблется в пределах 10–30 %. Впервые в мире во ВНИИМК был выведен сорт подсолнечника Первенец, который характеризовался мутацией высокоолеиновости (*Ol*), полученной путем химического мутагенеза в популяции ВНИИМК 8931 [1]. Эта популяция затем была использована в программах селекции для получения сортов с содержанием олеиновой кислоты выше 80 %.

Традиционные методы, используемые в программах селекции для отбора генотипов с высоким содержанием олеиновой кислоты, состоят в основном из оценки жирно-кислотного состава в семенах подсолнечника [2]. Молекулярные маркеры, связанные с мутацией высокоолеиновости, представляют собой ценный и полезный инструмент в селекционных программах, поскольку они позволят провести быстрый скрининг и раннее обнаружение генотипов, несущих мутацию.

Фермент дельта-12-олеат-десатураза (*FAD2*) необходим для синтеза линолевой кислоты из олеиновой. У подсолнечника было идентифицировано три гена *FAD2*: *FAD2-1*, -2 и -3, кодирующих данный фермент [3; 4]. *FAD2-1* проявляет сильную экспрессию в развивающихся семенах [3], тогда как *FAD2-2* и -3 экспрессируются слабо. Из трех генов *FAD2*, *FAD2-1* играет ключевую роль в синтезе линолевой кислоты и при мутации увеличивает концентрацию олеиновой кислоты в семенах подсолнечника [3; 5]. Обнаружено, что *FAD2-1* был дублирован и очень слабо экспрессируется в мутантных линиях, гомозиготных по *Ol* мутации. Сначала были разработаны доминантные маркеры INDEL для обнаружения наличия/отсутствия мутации *Ol* [6]. Позже были разработаны дополнительные маркеры INDEL и кодоминантные микросателлитные маркеры, сцепленные с мутацией. [7; 8]. Последние опубликованные исследования характеризуются разработкой методов обнаружения аллелей *FAD 2-1* с использованием уже известных молекулярных маркеров [9; 10; 11].

Во ВНИИМК проводились исследования по валидации ранее опубликованных маркеров на материале генетической коллекции ВНИИМК [12; 13]. Не решенной остается



проблема обнаружения гетерозиготного состояния аллелей гена *FAD 2-1* с помощью ДНК-маркеров. Создание маркерной системы, способной проводить детекцию гетерозиготных растений по мутации *O1*, будет способствовать развитию маркер-ассоциированной селекции (МАС) по данному признаку.

Цель исследования – создание маркерной системы для детекции гетерозиготных генотипов подсолнечника по аллелям гена *FAD 2-1*.

Для достижения поставленной цели необходимо разделить работу на этапы, включающие анализ информации о нуклеотидных последовательностях изучаемого участка генома, конструирование олигонуклеотидов (праймеров) и оптимизация протокола ПЦР, а также экспериментальная проверка. Задачи данной работы направлены на выполнение первого этапа и включают в себя:

- поиск информации по структуре аллелей гена *FAD 2-1* в базах данных;
- оценку возможного усовершенствования существующей маркерной системы определения наличия/отсутствия мутации *O1*;
- проведение анализа полученной информации и определение пути достижения поставленной цели.

Материал и методы. В исследовании использовались базы данных GenBank и RefSeq (Reference Sequence), поддерживаемые Национальным центром биотехнологической информации США (NCBI).

База данных открытого доступа GenBank содержит все аннотированные последовательности ДНК и РНК, данные секвенирования интересующих локусов, полученные в предыдущих исследованиях [14].

Коллекция эталонных последовательностей (RefSeq) содержит актуальные версии геномов таксономически разнообразных организмов, в том числе сборку референсного (эталонного) генома подсолнечника HanXRQr2.0-SUNRISE подготовленную Международным консорциумом по геномике подсолнечника (ICSG) [15].

Сборка генома высокоолеиновой линии HA412-HOv2.0 использовалась для поиска и сопоставления интересующего мутантного локуса и его окружения с референсным геномом подсолнечника HanXRQr2.0-SUNRISE и была получена из Базы данных генома подсолнечника [16]. Также использовалась более ранняя сборка HA412.v1.1.bronze.20141015 опубликованная в базе данных «Ресурсы по биоинформатике подсолнечника» Национального института сельскохозяйственных исследований Франции (INRA) [17].

Для поиска нуклеотидных последовательностей в сборках геномов и сравнения локусов использовалась программа Basic Local Alignment Search Tool (BLAST<sup>®</sup>) разработанная в Национальном центре биотехнологической информации США (NCBI), в частности модификации blastn (для сравнения нуклеотидных последовательностей) и megablast (быстрое сравнение с целью поиска последовательностей с высоким сходством) [18].

Результаты и обсуждение. Анализ нуклеотидных последовательностей аллеля мутации *O1* из базы данных GenBank показал высокую степень сходства ранее представленных последовательностей между собой и со сборкой генома высокоолеиновой линии подсолнечника HA412 [6; 8; 16]. Обнаруженные различия в структуре последовательностей, объясняются несовершенством технологий клонирования и секвенирования. При сравнении нуклеотидной последовательности HA412-HOv2.0 из области нахождения гена *FAD 2-1* с референсным геномом HanXRQr2.0-SUNRISE выявлено 99 % сходство. Единственным несопадением стало отсутствие у сравниваемой последовательности цитозина на позиции 151342480 референсного генома (рис. 1).

Несмотря на высокое сходство по содержанию, наблюдается наложение сравниваемой последовательности на себя в области длиной 4271 п.н. Это говорит о полной идентичности наложенных участков. Известно, что мутация *O1* вызвана дупликацией гена *FAD 2-1*. Таким



образом, сравнение данного локуса генома высокоолеиновой линии с референсным геномом линолевого фенотипа отображает участок дупликации.



Рисунок 1 – Сравнение нуклеотидной последовательности сборки генома HA412-HOv2.0 Chr14:166014261-166042940 (нижняя дорожка BLAST results) с референсным геномом NanXRQr2.0-SUNRISE (верхняя дорожка sequence) с помощью веб-версии программы blastn. Ген *FAD 2-1* референсного генома линолевого фенотипа обозначен LOC110904312.

Существующая маркерная система определения наличия/отсутствия мутации *Ol* заключается в использовании прямого (forward) праймера в конце дублированного участка и обратно направленного (reverse) праймера, комплиментарного последовательности в начале этого участка. В ходе ПЦР амплификация ДНК происходит только в случае дупликации данного фрагмента, когда оба праймера оказываются направлены навстречу друг другу (рис. 2).

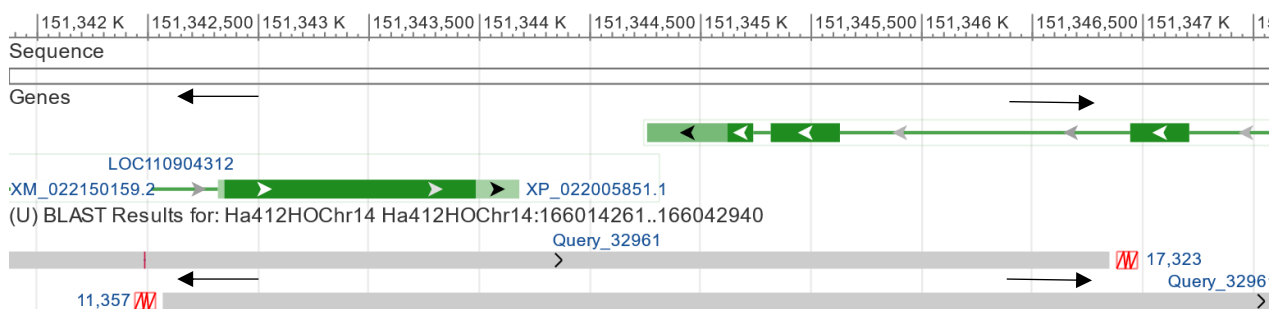


Рисунок 2 – Сравнение нуклеотидной последовательности сборки генома HA412-HOv2.0 Chr14:166014261-166042940 с референсным геномом NanXRQr2.0-SUNRISE. Стрелками обозначены схематические направления и положения праймеров в линолевом фенотипе растения подсолнечника.

Таким образом, маркер достоверно показывает наличие или отсутствие мутантного локуса в генотипе. Несмотря на это, положительный результат по данному маркеру не несет информации об аллельном статусе, так как амплификация ДНК одинаково проходит при гомо- и гетерозиготном состоянии. Для совершенствования маркерной системы в направлении детекции гетерозиготного состояния необходим дополнительный маркер аллеля дикого типа (отсутствие мутации *Ol*).

Ранее были разработаны кодоминантные молекулярные маркеры на основе полиморфизма локуса SSR, расположенного в интроне гена *FAD 2-1*. Данные маркеры генетически тесно связаны с мутацией и могут использоваться для идентификации мутантных генотипов. Из-за их совместного сегрегирования, они способны указывать на гомозиготный или гетерозиготный статус локуса мутации. Несмотря на это, отсутствие неравновесного сцепления между мутацией и аллелем SSR в проведенном анализе разнообразия позволяет использовать эти маркеры только для популяций, происходящих от высоко- и низкоолеиновых родителей, несущих два контрастных аллеля SSR [7]. К этому можно добавить, что различия между SSR локусами по данным исследований, составляют в среднем 3 п.н., что сильно повышает вероятность ошибок на всех этапах проведения тестирования, а при несовершенстве



оборудования делает детекцию невозможной. Исходя из этого, данные SSR маркеры не являются надежными для массового использования.

Создание маркера детекции аллеля дикого типа на основе полиморфизма длины амплифицируемого фрагмента затруднено идентичностью дублированной и основной последовательностей. В результате проведенного анализа последовательностей и схем аллелей любые разработанные на основе аллеля дикого типа пары праймеров показывали одинаковые фрагменты ДНК для обоих аллелей.

На данный момент благодаря публикации результатов полногеномного секвенирования подсолнечника появилась возможность для создания маркера аллеля дикого типа путем размещения праймеров за пределами дублируемой области. Данная идея озвучивалась ранее [7], однако результаты так и не были опубликованы. Исходя из этого, необходимо провести разработку пары праймеров с оптимальными показателями температуры отжига, GC составом, а также отсутствием самокомплиментарности 3'-концов олигонуклеотидов и комплементарности 3'-концов прямого и обратного праймеров. Требуется проведение оптимизации условий проведения амплификации ДНК по причине необходимости надежной амплификации как минимум 4500 п.н.. Тем самым, для данного маркера должен применяться протокол ПЦР длинных фрагментов (Long Range PCR) с использованием модифицированных полимераз высокой точности.

Заключение. Таким образом, проведенный анализ нуклеотидных последовательностей гена *FAD 2-1* не выявил существенных различий между мутантным и аллелем дикого типа за исключением самой дубликации длиной 4271 п.н. Для совершенствования существующей маркерной системы определена необходимость использования пары маркеров: наличия/отсутствия мутации и наличия/отсутствия аллеля дикого типа. Для создания маркера аллеля дикого типа необходимо преодолеть проблему идентичности последовательностей, вследствие которой разработанные внутри локуса дубликации пары праймеров амплифицируют идентичные фрагменты ДНК. Проблему возможно преодолеть путем расположения пары праймеров за пределами дублированной области и проведения ПЦР длинных фрагментов. Необходимо разработать праймеры и провести работу по оптимизации условий амплификации. При положительном результате на контрастных линиях и гибридах провести верификацию и внедрение в селекционный процесс.

#### Литература

1. Солдатов К.И., Воскобойник Л.К., Харченко Л.Н. Высокоолеиновый сорт подсолнечника Первенец // Бюл. НТИ по масличным культурам. – 1976. – Вып. 3. – С. 3–7.
2. Conte L., Leoni W., Palmieri S., Capella P., Lercker G Half seed analysis: rapid chromatographic determination of the main fatty acids of sunflower seed. *Plant Breed* – 1989. – 102. – P. 158–165.
3. Hongtrakul V, Slabaugh M., Knapp S. DFLP, SSCP, and SSR markers for delta 9-stearoyl-acyl carrier protein desaturases strongly expressed in developing seeds of sunflower: intron lengths are polymorphic among elite inbred lines. *Mol Breed* – 1998. – V. 4 – P. 195–203.
4. Martinez-Rivas J., Sperling P., Luhs W., Heinz E. Spatial and temporal regulation of three different microsomal OD genes (*FAD2*) from normal-type and high-oleic varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Mol Breed* – 2001. – V. 8. – P.159–168.
5. Garcia-Diaz M.T., Martinez-Rivas J.M. and Mancha M. Temperature and oxygen regulation of oleate desaturation in 254 developing sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Physiol. Plant.* – 2002. – V. 114. – P 13–20.
6. 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.



7. 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.
8. Bervillé A., Lacombe S., Veillet S., Granier C., Leger S., Jouve P. Method of selecting sunflower genotypes with high oleic acid content in seed oil. United States patent application US 11/587,956. – 2009.
9. Singchai A., Muangsan N., Machikowa T. Evaluation of SSR markers associated with high oleic acid in sunflower // *International Journal of Biological, Food, Veterinary and Agricultural Engineering*. – 2013. – V. 7. – P. 631–634.
10. Bilgen B.B. Characterization of sunflower inbred lines with high oleic acid content by DNA markers // *In Proceedings of the 19th International sunflower conference*. ISA, Edirne, 2016. – P. 662–668.
11. Dimitrijević A., Imerovski I., Miladinović D., Cvejić S., Jocić S., Zeremski T., Sakač Z. Oleic acid variation and marker-assisted detection of Pervenets mutation in high- and low-oleic sunflower cross // *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. – 2017. – V. 17. – P. 229–235. <http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332017v17n3a36>.
12. Гучетль С.З. Доминантные молекулярные маркеры мутации высокоолеиновости масла в семенах подсолнечника // *Масличные культуры*. – 2020. – Вып. 2 (182). – С. 24–32.
13. Демури́н Я.Н., Чебанова Ю.В., Борисенко О.М., Гучетль С.З., Савиченко Д.Л., Ефименко С.Г., Рубанова О.А., Широких А.А., Шамрай В.Д. Создание и изучение рекомбинантных инбредных линий подсолнечника в скрещиваниях среднеолеиновой линии ЛГ27 // *Масличные культуры*. – 2020. – № 2 (182). – С. 3–12.
14. База данных открытого доступа GenBank [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
15. Коллекция эталонных последовательностей RefSeq [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>
16. База данных генома подсолнечника [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.sunflowergenome.org>
17. Ресурсы по биоинформатике подсолнечника [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.heliagene.org>
18. Программа Basic Local Alignment Search Tool [веб-версия программы] [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

**THE PROBLEM OF DETECTION OF HETEROZYGOUS GENOTYPES BY  
MUTATION OF THE FAD 2-1 GENE OF SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS* L.)  
USING DNA MARKERS**

**Savichenko D.L., Guchetl S.Z.**

The development of marker-associated breeding requires the development of DNA marker systems that meet the needs of the breeding process. We are looking for the opportunities to improve the efficiency of breeding for high oleic acid content in sunflower oil. One of the directions is the improvement of the existing marker system for detection the heterozygous status of the alleles of the FAD 2-1 gene. We carried out the search for information published in databases on this DNA locus. We studied the structure of the nucleotide sequences of the mutant allele and the wild-type allele. We proposed the way of improving the existing marker system.

Key words: sunflower, *Helianthus annuus* L., high oleic content, DNA markers, polymerase chain reaction.