ISSN pr. 2412–608X, ISSN on. 2412-6098 Масличные культуры. Вып. 2 (182), 2020

УДК 633.854.78:575

DOI: 10.25230/2412-608X-2020-2-182-24-32

Доминантные молекулярные маркеры мутации высокоолеиновости масла в семенах подсолнечника

С.З. Гучетль,

кандидат биологических наук

ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17 E-mail: saida.guchetl@mail.ru

Для цитирования: Гучетль С.З. Доминантные молекулярные маркеры мутации высокоолеиновости масла в семенах подсолнечника // Масличные культуры. – 2020. – Вып. 2 (182). – С. 24–32.

Ключевые слова: молекулярные маркеры, полимеразная цепная реакция, подсолнечник, высокоолеиновость, мутация.

На сегодняшний день перспективными являются сорта и гибриды подсолнечника с высоким содержанием олеиновой кислоты. В связи с этим необходима разработка и валидация методов молекулярно-генетического выявления мутации высокоолеиновости масла в материале подсолнечника российской селекции, что способствовало бы ускорению селекционного процесса при помощи маркер-ассоциированного отбора. Материалом для исследования служили константные линии и гибриды F_1 генетической коллекции ВНИИМК, отличающиеся по признаку содержания олеиновой кислоты в семенах. Геномную ЛНК выделяли из семядольных листьев 5-7-дневных проростков подсолнечника с использованием СТАВ-буфера. Амплификацию выполняли в термоциклере S1000™ (BioRad, США). Использовали 11 INDEL, HO-specific fragment и SSR-праймеров, разработанных иностранными авторами. Экспериментальным путем были подобраны оптимальные температуры гибридизации (отжига) всех праймерных комбинаций с матрицей ДНК. Они составили от 50 до 65 °C. Размеры амплифицированных фрагментов ДНК в основном соответствовали полученным авторами, разработавшими данные маркеры. Генотипирование высокоолеиновых и линолевых образцов подсолнечника проводили с использованием семи пар праймеров. Из анализированных локусов - два (F13/R5 и N11F/N1-1R) амплифицируются у всех генотипов независимо от наличия мутации Ol. Это позволяет использовать их для исключения ложноотрицательных результатов на наличие мутации. Локусы N1-2F/N2-1R, N1-3F/N2-1R, N1-3F/N2-2R, N1-3F/N2-3R F4/R1 являются доминантными и маркируют наличие мутации Ol у высокоолеиновых генотипов. Данные маркеры просты в использовании и требуют применения только агарозных гелей. Представленные результаты могут быть использованы для маркер-сопутствующего отбора родительских мутантных форм при получении гибридов на основе генотипов, различающихся по жирно-кислотному составу.

UDC 633.854.78:575

Dominant molecular markers of mutation of high oleic oil in sunflower seeds

S.Z. Guchetl, PhD in biology

V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops (VNIIMK)

17, Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia E-mail: saida.guchetl@mail.ru

Key words: molecular markers, polymerase chain reaction, sunflower, high oleic, mutation.

Currently, sunflower varieties and hybrids with high content of oleic acid are very promising. Thus, it is necessary to develop and validate metods of molecular-genetic searching of mutation in high oleic oil of sunflower of the Russian breeding that can advance breeding process using marker-associated selection. As a material we used constant lines and F₁ hybrids from the genetic collection of the V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops (VNIIMK) which are differed by a content of oleic acid on seeds. We evolved genomic DNA from cotyledons of 5-7days sunflower seedlings using STAB-buffer. Amplification was done in thermal cycler S1000[™] (BioRad, США). We used 11 INDEL, HO-specific fragment и SSR-primers developed by foreign authors. In an experimental way, we selected optimal temperatures for hybridization (annealing) for all the primers combinations with DNA matrix. They were from 50 to 65 °C. Sizes of amplified DNA fragments generally corresponded to the same ones the authors of these markers had. Genotyping of high oleic and linoleic sunflower samples was done using seven pairs of primers. Two loci (F13/R5 и N1-1F/N1-1R) of the studied ones amplified in all genotypes independently of a presence of Ol mutation. This allows their using to exclude false negative results for mutation presence. Loci N1-2F/N2-1R, N1-3F/N2-1R, N1-3F/N2-2R, N1-3F/N2-3R F4/R1 are dominant and indicate Ol mutation in high oleic genotypes. These markers are easy to use and require only agar gel usage. The results presented in this article can be used for markerassistant selection of parental mutant forms in development of hybrids basing on the genotypes differed with their fatty-acid composition.

Введение. Подсолнечник является одной из важнейших масличных культур как у нас в стране, так и во всем мире. Получаемое из него растительное масло составляет основу рационального питания населения. Подсолнечное масло является наиболее употребляемым в нашей стране. Обладая большой энергетической ценностью, оно представляет собой главный источник биологически активных компонентов в рационе питания: моно- и полиненасыщенных жирных кислот, лецитинов (фосфолипидов), фитостеринов, витаминов. Стандартное подсолнечное масло богато полиненасышенной линолевой кислотой, которая составляет около 60 % от суммы жирных кислот подсолнечного масла. Вторая наиболее распространенная - это мононенасыщенная олеиновая кислота с содержанием на уровне 30 % [1]. Потребительский спрос требует не только стандартные масла, но и растительные масла с измененными свойствами. Наиболее перспективными на сегодняшний день являются сорта и гибриды подсолнечника с высоким содержанием олеиновой кислоты. Мутация высокоолеиновости масла в семенах подсолнечника (Ol) получена впервые в мире во ВНИИМК и в 1976 г. создан высокоолеиновый сорт подсолнечника Первенец [2]. Этот сорт стал уникальным донором данного признака в селекционных программах во всем мире. Олеиновая кислота является одной из основных жирных кислот, входящих в состав масла семян подсолнечника. Её содержание в различных сортах и гибридах подсолнечника может колебаться в широких пределах – от 10– 30 % (сорта с традиционным жирнокислотным составом) до 80-92 % (высокоолеиновые сорта) [2; 3]. Повышенное содержание олеиновой кислоты в подсолнечном масле значительно улучшает его потребительские качества. В связи с высокой окислительной стабильностью высокоолеиновое подсолнечное масло более устойчиво в процессе жарки, к воздействию высоких температур. Отсутствие транс-жирных кислот делает его более полезным для здоровья. Кроме того, такое масло имеет больший срок годности по сравнению со стандартным. В переработке высокоолеиновое масло снижает затраты на очистку, его легче транспортировать и хранить [3]. Мутантный фенотип экспрессируется только в семенах и обусловлен отсутствием активности фермента дельта-12-десатуразы. В норме данный фермент катализируют введение двойной связи в олеиновую кислоту (С18:1) с превращением её в линолевую (С18:2) [4].

С молекулярно-генетической точки зрения, увеличение содержания олеиновой кислоты обусловлено частичным дублированием аллеля *FAD2-1*, который вызвал подавление экспрессии *FAD2-1* [4; 5], который кодирует фермент дельта-12-десатуразу. Таким образом, как стандартный, так и высокоолеиновый гесодержат последовательность нотипы FAD2-1. Однако у высокоолеиновых генотипов имеется дополнительная меж-(IGR), генная область разделяющая общую последовательность FAD2-1, и укороченные интрон и экзон, которые представляют собой дублированную последовательность, обозначенную FAD2-1D [5]. Это FAD2-1 дублирование называется Ol мутацией. G.F. Schuppert et al. разработали доминантные маркеры INDEL для обнаружения мутации Ol (наличие или отсутствие тандемных повторов FAD2-1) и идентифицировали почти 50 SNP и несколько INDEL для FAD2-1 [5]. S. Lacombe et al. и A. Bervillé et al. разработали два типа маркеров. Первый – кодоминантные маркеры SSR, расположенные в интроне предполагаемого гена FAD2-1 и тесно сцепленные с мутацией. Второй – доминантные маркеры, специфичные для мутации [6; 7]. В последние несколько лет исследования по идентификации подходящих и простых в использовании молекулярных маркеров для обнаружения высокоолеиновых генотипов увеличились из-за растущего интереса селекционных компаний к большему разнообразию генотипов подсолнечника с таким жирно-кислотным составом масла. Несколько авторов работали над разработкой методов обнаружения генов *Ol* с использованием известных молекулярных маркеров [8; 9; 10], но полученные результаты показали необходимость дальнейшей валидации данных методов в разных популяциях подсолнечника и на разном генетическом фоне [9; 10].

Во ВНИИМК на протяжении многих лет проводятся исследования по изучению состава жирных кислот в масле сеподсолнечника И наследования данного признака [11; 12; 13; 14]. Была разработана биологическая классификация генетической коллекции ВНИИМК по содержанию олеиновой кислоты на основе разделения на классы фенотипов определенным образцов кислотным профилем [15]. Но не были разработаны методы молекулярногенетического выявления мутации высокоолеиновости масла в материале подсолнечника российской селекции, которые способствовали бы ускорению селекционного процесса при помощи маркер ассоциированного отбора. В связи с этим цель исследования: идентифицировать и валидировать простые в использовании молекулярные маркеры, которые будут наиболее эффективными для обнаружения мутации высокоолеиновости масла у подсолнечника.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили константные линии генетической коллекции ВНИИМК и гибриды F_1 , отличающиеся по признаку содержания олеиновой кислоты в семенах, предоставленные сотрудниками лаборатории генетики ВНИИМК. Линии, которые несли мутацию высокоолеиновости масла: ВК 876, ВК 541, НА 422, ВК 680, ЛГ 26, ВК 508, ВК 195, ВК 805, RHA

345. Линии без данной мутации: ЛГ 28, 83HR4, BK 580.

Кроме вышеприведенных линий, были проанализированы четыре гибридные комбинации первого поколения: ВК 541 \times ВК 580; НА 422 \times ВК 580; ЛГ 26 \times ВК 580; ВК 508 \times ВК 580.

Геномную ДНК выделяли из семядольных листьев 5-7-дневных этиолиропроростков подсолнечника с ванных помощью модифицированного Saghai-Maroof et al. [16] с использованием СТАВ-буфера. Для определения однородности генотипов отбирали по пять индивидуальных растений каждого образца. Растительную ткань измельчали с использованием гомогенизатора Speed Mill plus (Analytic Jena, Германия). Для проведения ПЦР использовали 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 67 мМ трис-НСІ, рН 8,8; 16,6 мМ сульфата аммония; 1,5–3 мМ MgCl₂; 0,01 % Tween 20; по 0,2 мМ дезоксирибонуклеозидфосфатов; по 10 пМ праймеров; 10 нг матричной ДНК и 1 ед. рекомбинантной термостабильной ДНК полимеразы (Сибэнзим, Москва). Амплификацию выполняли в термоциклере S1000™ (BioRad, США). Условия амплификации: начальная денатурация при 96 °C в течение 2 мин; затем 30 циклов при соблюдении температурно-временного режима: отжиг при 50-65 °С (в зависимости от праймера) в течение 40 с, элонгация – 1 мин при 70 °C, денатурация при 94 °C - 30 с, финальная элонгация – 2 мин. Использовали 11 INDEL, HO-specific fragment и SSRпраймеров, разработанных зарубежными авторами [5; 6; 7] (табл. 1). Для амплификации длинных фрагментов ДНК (больше 1000 пар нуклеотидов (п. н.) использовапрограмму LD ПЦР, описанную Schuppert et al. [5]. Праймеры были изготовлены ООО «Синтол» (Москва, Россия).

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в работе

г. Краснодар, ВНИИМК, 2020 г.

Назва- ние прай-	Последовательность нуклеотидов праймера	Источник
мера		
F 13	TCA ACA GCC TCT TCC TCC TCA G	Schuppert
		et al., 2006
R5	GTA GTT TTG GAA AGC TAG AGA CC	- // -
F4	GTA ACG TCT GCG CGC TTG CAG ACA TCA	- // -
R1	GGT TTT GCA TGA GGG ACT CGA TCG AGT G	- // -
N1-2F	CAA ACC ACC ACC CAC TAA C	Bervillé et al., 2009; Lacombe et al., 2009
N1-3F	GAG AAG AGG GAG GTG TGA AG	- // -
N2-1R	AGC GGT TAT GGT GAG GTC AG	- // -
N2-2R	ACA AAG CCC ACA GTG TCG TC	- // -
N2-3R	GCC ATA GCA ACA CGA TAA AG	- // -
N1-1F	TTG GAG TTC GGT TTA TTT AT	- // -
N1-1R	TTA GTA AAC GAG CCT GAA C	- // -

Электрофорез продуктов амплификации проводили в агарозном геле (2 % агароза, 1 х SB-буферы) с использованием камеры для горизонтального электрофореза (SE.2, ДНК-технология, Россия) в течение 1-1,5 ч при силе тока 58 mA и напряжении 90-100 V. Последующее окрашивание осуществляли бромистым этидием. Визуализация результатов электрофореза в ультрафиолетовом свете и их документирование обеспечивались при помощи системы цифровой документавидеоизображения шии **BIO-PRINT** (Vilber Lourmat, Франция). Размер фрагментов ДНК определяли с использованипрограммного обеспечения ем Bio-Capture (Vilber Lourmat, Франция) относительно маркера длины фрагментов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder Thermo Scientific (Сибэнзим, Россия).

Результаты и обсуждение. Для валидации известных молекулярных маркеров в первую очередь было необходимо определить для них оптимальные условия и температурные режимы ПЦР. Экспериментальным путем были подобраны оптимальные температуры гибридизации (отжига) всех праймерных комбинаций с матрицей ДНК и определены молекулярные массы продукта ПЦР (табл. 2). Оптимальные температуры отжига для разных

пар праймеров составили от 50 до 65 °C, молекулярные массы фрагментов ДНК - от 210 до 3000 п. н.

Таблица 2

Оптимальные температурные режимы для ПЦР анализа ДНК-локусов и молекулярные массы амплифицированных фрагментов ДНК

г. Краснодар, ВНИИМК, 2020 г.

Пара	Молекулярн продукта	Оптимальная	
праймеров	эксперимен- тальная	ожидаемая	$t_{otx}_{c}(^{\circ}C)$
F13/R5	280	342	60
F4/R1	590	653	60
N1-2F/N2-1R	3000	3100	64-58
N1-3F/N2-1R	870	891	65
N1-3F/N2-2R	925	1000	60
N1-3F/N2-3R	1200	1400	60
N1-1F/N1-1R	210	240	50

Все праймерные пары гибридизовались с ДНК. Размеры амплифицированфрагментов ДНК В основном соответствовали полученным авторами, разработавшими данные маркеры [5; 6; 7]. Генотипирование высокоолеиновых и низкоолеиновых образцов подсолнечника и их гибридов проводили с использованием семи пар праймеров: одного SSR (N1-1F/N1-1R), четырех HO PCR-specific fragment (N1-2F/N2-1R, N1-3F/N2-1R, N1-3F/N2-2R, N1-3F/N2-3R) и двух INDEL (F4/R1, F13/R5).

Согласно литературным данным, ПЦРамплификация SSR-локуса N1-1F/N1-1R приводит к фрагментам 243/246/249 п. н., соответствующим 15/16/17 ТТА-повторам соответственно. Высокоолеиновые генотипы подсолнечника имеют 16 повторов ТТА, тогда как низкоолеиновые – 17 повторов ТТА [7]. Полученные нами результаты ПЦР после разделения продуктов в агарозном геле выявили одну фракцию ДНК длиной 240 п. н., которая присутствовала у всех генотипов - и высокоолеиновых, и линолевых (табл. 3).

Маркер F13/R5 был разработан как кодоминантный INDEL для FAD2-1 и выявлял до 8 аллелей у кондитерского и масличного подсолнечника с разным содержанием олеиновой кислоты [5]. В нашем исследовании он показал себя как мономорфный, амплифицировал фракцию приблизительно 340 п. н. в линиях и потомствах F_1 со всеми типами содержания олеинового масла в семенах подсолнечника (табл. 3, рис. 1). В связи с этим пары праймеров N1-1F/N1-1R и F13/R5 рассматриваются нами как фланкирующие контрольные бенды 240 и 340 п. н. соответственно, которые амплифицируются несмотря на наличие или отсутствие мутации Ol.

Таблица 3

Характеристика линий и гибридов F_1 генетической коллекции ВНИИМК по наличию фрагментов ДНК, маркирующих ген Ol

г. Краснодар, ВНИИМК, 2020 г.

ДНК-локус											
Генотип				N1-2F/	F4-R1		F13/				
1 CHOTHII	N2-1R	N2-2R	N2-3R	N2-1R		N1-1R	R5				
						SSR					
Высокоолеиновые											
BK 876	+*	+	+	+	+	+	+				
BK 541	+	+	+	+	+	+	+				
HA 422	+	+	+	+	+	+	+				
BK 680	+	+	+	+	+	+	+				
ЛГ 26	+	+	+	+	+	+	+				
BK 508	+	+	+	+	+	+	+				
BK 195	+	+	+	+	+	+	+				
RHA 345	+	+	+	+	+	+	+				
Низкоолеиновые											
ЛГ 28	_	_	_	_	_	+	+				
83HR4	_	_	_	-	_	+	+				
BK 580	_	_	ı	ı	ı	+	+				
Гибриды F ₁											
BK 541 ×	+	+	+	+	+	+	+				
BK 580	+	+	+	+	+	+	+				
HA 422 ×	+	+	+	+	+	+	+				
BK 580	+										
ЛГ 26 ×	+	+	+	+	+	+	+				
BK 580											
BK 508 ×	+	+	+	+	+	+	+				
BK 580		,	'		'	'					
	+	+	+	+	+	+	+				

* Знаком (+) обозначается наличие у образца маркерного фрагмента ДНК; (–) – отсутствие такового

Пять маркеров, использованные в этом исследовании, позволили выявить различия между высокоолеиновыми и линолевыми линиями. Маркеры F4/R1 [5], N1-2F/N2-1R, N1-3F/N2-1R, N1-3F/N2-2R, N1-3F/N2-3R [6; 7] обнаружили отличия между линиями. Однако ни один из них не показал дискриминации между гомози-ГОТНЫМ И гетерозиготным генотипом (табл. 3).

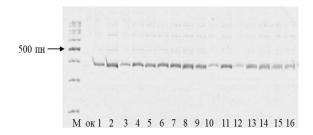


Рисунок I — Электрофоретические спектры ДНК подсолнечника, амплифицированной с праймерной парой F13/R5: Дорожки: 1 — BK 876; 2 — BK 541; 3 — HA 422; 4 — BK 680; 5 — BK 805; 6 — 26; 7 — BK 508; 8 — BK 195; 9 — ЛГ 27; 10 — ЛГ 28; 11 — 83HR4; 12 — BK 580; 13 — F_1 (BK 541 × BK 580); 14 — F_1 (HA 422 × BK 580); 15 — F_1 (ЛГ 26 × BK 580); 16 — F_1 (BK 508 × BK 580); 16 — маркер молекулярной массы 100 bp, ок — отрицательный контроль

Молекулярный маркер N1-3F/N2-1R был создан для амплификации высокоолеинового специфического фрагмента и выявляет фракцию приблизительно 891 п. н. [6; 7]. В нашем исследовании пара праймеров амплифицировала полосу приблизительно 870 п. н. у высокоолеиновых линий и в потомствах F_1 , тогда как этот фрагмент отсутствовал у стандартных линолевых линий (табл. 3, рис. 2).

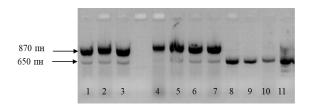


Рисунок 2 — Электрофоретические спектры ДНК подсолнечника, амплифицированной с аллель-специфичными праймерами по гену Ol N1-3F/N2-1R: Дорожки: 1 — BK 876; 2 — BK 541; 3 — HA 422; 4 — F_1 (BK 541 × BK 580); 5 — F_1 (HA 422 × BK 580); 6 — F_1 (ЛГ 26 × BK 580); 7 — F_1 (BK 508 × BK 580); 8 — ЛГ 27; 9 — ЛГ 28; 10 — 83HR4; 11 — BK 580. Стрелками обозначены фрагменты ДНК 870 п. н., маркирующие мутацию высокоолеиновости масла, и 650 п. н., присутствующие у всех генотипов

Кроме того, этот праймер амплифицировал фракцию 650 п. н., общую между образцами, несущими и не несущими

мутацию Ol (рис. 2). Степень выраженности фракции была разной у линий с разными генотипами, что не позволило использовать данную фракцию как контрольную.

Молекулярный маркер N1-3F/N2-2R также был разработан для амплификации высокоолеинового специфического фрагмента и, согласно литературным данным, амплифицирует фракцию приблизительно 1000 п. н. [6; 7]. В нашем исследовании пара праймеров амплифицировала фрагмент ДНК приблизительно 925 п. н. у высокоолеиновых линий и в потомствах F₁, тогда как этот фрагмент отсутствовал у линолевых линий (табл. 3, рис. 3). Как и у предыдущей пары праймеров, была амплифицирована фракция, общая между образцами, несущими и не несущими мутацию Ol (рис. 3). Размер данного фрагмента ДНК составил 500 п. н. Степень выраженности фракции была разной у линий с отличающимися по содержанию олеинового масла генотипами, что также не позволило использовать её как контрольную.

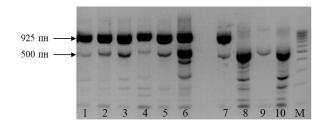


Рисунок 3 — Электрофоретические спектры ДНК подсолнечника, амплифицированной с аллель-специфичными праймерами по гену Ol N1-3F/N2-2R: Дорожки: 1 — ВК 876; 2 — ВК 541; 3 — НА 422; 4 — F_1 (ВК 541 × ВК 580); 5 — F_1 (НА 422 × ВК 580); 6 — F_1 (ЛГ 26 × ВК 580); 7 — F_1 (ВК 508 × ВК 580); 8 — ЛГ 27; 9 — ЛГ 28; 10 — ВК 580. М — маркер молекулярной массы 100 bp. Стрелками обозначены фрагменты ДНК 925 п. н., маркирующие мутацию высокоолеиновости масла, и 500 п. н., присутствующие у всех Генотипов

Молекулярный маркер N1-3F/N2-3R является аллель-специфичным маркером

к мутантному аллелю гена FAD2-1D. Показано, что пара праймеров, фланкируюданный локус, амплифицирует фракцию ДНК приблизительно 1400 п. н. [6; 7]. В результате наших исследований высокоолеиновые мутанты показали специфическую полосу с длиной около 1200 п. н., которая отсутствовала в генотипах с низким содержанием олеиновой кислоты (табл. 3, рис. 4). Как и у предыдущей пары праймеров, была амплифицирована фракция 450 п. н., общая между всеми генотипами (рис. 4). Степень выраженности фракции была разной у линий с отличающимися по содержанию олеинового масла генотипами.

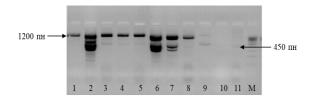
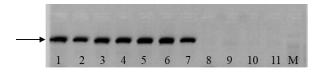


Рисунок 4 — Электрофоретические спектры ДНК подсолнечника, амплифицированной с аллель-специфичными праймерами по гену Ol N1-3F/N2-3R. Дорожки: 1 — ВК 876; 2 — ВК 541; 3 — НА 422; 4 — F_1 (ВК 541 × ВК 580); 5 — F_1 (НА 422 × ВК 580); 6 — F_1 (ЛГ 26 × ВК 580); 7 — F_1 (ВК 508 × ВК 580); 8 — RIL 100; 9 — ЛГ 28; 10 — ВК 580; 11 — 83HR4. М — маркер молекулярной массы 100 bр. Стрелками обозначены фрагменты ДНК 1200 п. н., маркирующие мутацию высокоолеиновости масла, и 450 п. н., присутствующие у всех генотипов

Маркерный локус N1-2F/N2-1R выявляет наличие мутации Ol у подсолнечника, амплифицируя фрагмент ДНК 3100 п. н. [6; 7]. Его валидация в генетической коллекции ВНИИМК показала, что у высокоолеиновых генотипов и гибридов, одним из родителей которых является содержащая мутацию Ol линия, амплифицируется фрагмент, длиной около 3000 п. н., который отсутствует у линий дикого типа (табл. 3).

Также был разработан доминантный маркер INDEL для диагностики на нали-

чие или отсутствие мутации Ol [5]. Показано, что пара праймеров F4/R1 амплифицировала фракцию 653 п. н. в мутантных линиях (высокоолеиновые линии), тогда как эта полоса отсутствовала в стандартных линиях подсолнечника [5]. В нашем исследовании F4/R1 амплифицировала одну фракцию ДНК примерно 590 п. н. у высокоолеиновых линий и в потомстве F_1 (табл. 3, рис. 5).



Pисунок 5 — Электрофоретические спектры ДНК подсолнечника, амплифицированной с аллель-специфичными праймерами по гену Ol F4/R1: Дорожки: 1 — BK 876; 2 — BK 541; 3 — HA 422; 4 — F₁ (BK 541 × BK 580); 5— F₁ (HA 422 × BK 580); 6 — F₁ (ЛГ 26 × BK 580); 7 — F₁ (BK 508 × BK 580); 8 — ЛГ 28; 9 — BK 580; 10 — 83HR4; 11 — ЛГ 27. М — маркер молекулярной массы 100 bp. Стрелкой обозначен фрагмент ДНК 590 п. н., маркирующий мутацию высокоолеиновости масла

Поскольку маркерные локусы являются доминантными, у всех гибридных растений, одним из родителей которого является линия, несущая мутацию Ol, также выявляются фрагменты ДНК, маркирующие мутацию. Статус растения — гетерозиготное или гомозиготное по гену Ol — значения не имеет.

Заключение. В результате проведенных исследований были идентифицировалидированы молекулярногенетические маркеры для обнаружения мутации высокоолеиновости для линий ВНИИМК с разным содержанием олеиновой кислоты в масле семян подсолнечника. Два локуса из проанализированных -F13/R5 и N1-1F/N1-1R – амплифицируются у всех генотипов независимо от на-Это личия мутации Ol.позволяет использовать их как контрольные, для

исключения ложноотрицательных зультатов на наличие мутации. Локусы N1-2F/N2-1R, N1-3F/N2-1R, N1-3F/N2-2R, N1-3F/N2-3R F4/R1 являются доминантными и маркируют наличие мутации Ol у высокоолеиновых генотипов. Данные маркеры просты в использовании и требуют использования только агарозных гелей. Преимущество использования этих молекулярных маркеров заключается в том, что результаты генотипирования могут быть получены на любом этапе развития растения. Следовательно, селекционеры могут выбраковывать генотипы без мутации высокоолеиновости до цветения, экономя затраты на поддержание нежелательных генотипов. Представленные результаты могут быть использованы для маркер-сопутствующего отбора родительских мутантных форм при получении гибридов на основе генотипов, различающихся по жирно-кислотному составу.

Благодарности. Автор выражает благодарность заведующему лабораторией генетики ВНИИМК Демурину Я.Н. и ведущему научному сотруднику лаборатории генетики ВНИИМК Борисенко О.М. за предоставленные семена линий генетической коллекции и гибридов F_1 .

Список литературы

- 1. Афанасьева В.А., Алферов С.В. Определение соотношения полиненасыщенных жирных кислот в пищевых маслах // Известия ТулГУ. Естественные науки. 2018. Вып. 4. С. 76—83.
- 2. Солдатов К.И., Воскобойник Л.К., Харченко Л.Н. Высокоолеиновый сорт подсолнечника Первенец // Бюл. НТИ по масличным культурам. 1976. Вып. 3. С. 3—7.
- 3. *Vannozzi G.P.* The perspectives of use of high oleic sunflower for oleochemistry and energy raws // Helia. 2006. V. 29 (44). P. 1–24.
- 4. Lacombe S., Leger S., Kaan F., Bervillé A., Sas M. Genetic, molecular and expression features of the Pervenets mutant leading to high oleic acid content of seed oil in

- sunflower // Oléagineux, Corps gras, Lipides 2002. V. 9. P. 17–23.
- 5. 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.
- 6. 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.
- 7. 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.
- 8. 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.
- 9. Bilgen B.B. Characterization of sunflower inbred lines with high oleic acid content by DNA markers // In: Proc. of the 19th Intern. Sunfl. Conf., Turkey, Edirne, 2016. P. 662–668.
- 10. Dimitrijević A., Imerovski I., Miladinović D., Cvejić S., Jocić S., Zeremski T., Sakač Z. Oleic acid variation and markerassisted detection of Pervenets mutation in high- and low-oleic sunflower cross // Crop Breeding and Applied Biotechnology. 2017. V. 17. P. 229–235. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332017v17n3a36.
- 11. Демурин Я.Н., Борисенко О.М., Чебанова Ю.В. Наследование признака среднеолеиновости масла в семенах подсолнечника у гибридов второго и третьего поколений // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. 2018. № 3 (175). С. 3—8. DOI: 10.25230/2412-608X-2018-3-175-3-8
- 12. Демурин Я.Н., Борисенко О.М., Чебанова Ю.В. Осевой градиент содержания олеиновой кислоты в частях семени подсолнечника // Масличные культуры. Науч.-

- тех. бюл. ВНИИМК. 2014. № 1 (157–158). С. 7–10.
- 13. Demurin Y., Borisenko O., Bochkarev N. Relationship of inheritance of a high palmitic mutation and plant height in sunflower // Helia. 2010. V. 33. No. 53. P. 149–154.
- 14. Демурин Я.Н., Попов П.С., Ефимен-ко С.Г. Гибридологический анализ призна-ка высокоолеиновости масла семян подсолнечника // Науч.-тех. бюл. ВНИ-ИМК. 2001. № 2 (125). С. 3–20.
- 15. Чебанова Ю.В., Демурин Я.Н., Борисенко О.М. Классификация генетической коллекции подсолнечника ВНИИМК на фенотипические классы по содержанию олеиновой кислоты // Мат-лы IV-й междунар. науч.-практич. конф. «Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки» / Науч. ред. В.С. Паштецкий. 2019. С. 213—214.
- 16. Saghai-Maroof M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics // PNAS USA. 1984. 81. P. 8014–8018.

References

- 1. Afanas'eva V.A., Alferov S.V. Opredelenie sootnosheniya polinenasyshchennykh zhirnykh kislot v pishchevykh maslakh // Izvestiya TulGU. Estestvennye nauki. 2018. Vyp. 4. S. 76–83.
- 2. Soldatov K.I., Voskoboynik L.K., Kharchenko L.N. Vysokooleinovyy sort podsolnechnika Pervenets // Byul. NTI po maslichnym kul'turam. 1976. Vyp. 3. S. 3–7.
- 3. Vannozzi G.P. The perspectives of use of high oleic sunflower for oleochemistry and energy raws // Helia. 2006. V. 29 (44). P. 1–24.
- 4. Lacombe S., Leger S., Kaan F., Bervillé A., Sas M. Genetic, molecular and expression features of the Pervenets mutant leading to high oleic acid content of seed oil in sunflower // Oléagineux, Corps gras, Lipides 2002. V. 9. P. 17–23.

- 5. 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.
- 6. 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.
- 7. 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.
- 8. 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.
- 9. Bilgen B.B. Characterization of sunflower inbred lines with high oleic acid content by DNA markers // In: Proc. of the 19th Intern. Sunfl. Conf., Turkey, Edirne, 2016. P. 662–668.
- 10. Dimitrijević A., Imerovski I., Miladinović D., Cvejić S., Jocić S., Zeremski T., Sakač Z. Oleic acid variation and markerassisted detection of Pervenets mutation in high- and low-oleic sunflower cross // Crop Breeding and Applied Biotechnology. 2017. V. 17. P. 229–235. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332017v17n3a36.
- 11. Demurin Ya.N., Borisenko O.M., Chebanova Yu.V. Nasledovanie priznaka sredneoleinovosti masla v semenakh podsolnechnika u gibridov vtorogo i tret'ego pokoleniy // Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. 2018. № 3 (175). S. 3–8. DOI: 10.25230/2412-608X-2018-3-175-3-8.

- 12. Demurin Ya.N., Borisenko O.M., Chebanova Yu.V. Osevoy gradient soderzhaniya oleinovoy kisloty v chastyakh semeni podsolnechnika // Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. 2014. № 1 (157–158). S. 7–10.
- 13. Demurin Y., Borisenko O., Bochkarev N. Relationship of inheritance of a high palmitic mutation and plant height in sunflower // Helia. 2010. V. 33. No. 53. P. 149–154.
- 14. Demurin Ya.N., Popov P.S., Efimenko S.G. Gibridologicheskiy analiz priznaka vysokooleinovosti masla semyan podsolnechnika // Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. 2001. № 2 (125). S. 3–20.
- 15. Chebanova Yu.V., Demurin Ya.N., Borisenko O.M. Klassifikatsiya geneticheskoy podsolnechnika kollektsii **VNIIMK** fenotipicheskie klassy po soderzhaniyu oleinovoy kisloty // Mat-ly IV-y mezhdunar. nauch.-praktich. «Sovremennoe konf. sostoyanie, problemy i perspektivy razvitiya agrarnoy nauki» / Nauch. red. V.S. Pashtetskiy. – 2019. – S. 213–214.
- 16. Saghai-Maroof M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics // PNAS USA. 1984. 81. P. 8014–8018.

Получено: 17.04.2020 Принято: 27.05.2020 Received: 17.04.2020 Accepted: 27.05.2020