

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ КАЗАХСТАНСКОГО КОЛЛЕКЦИОННОГО ФОНДА ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА ПО БЕЛКОВЫМ И SSR МАРКЕРАМ

К.М. БУЛАТОВА^{1*}, Ш. МАЗКИРАТ¹, О.А. ГАВРИЛОВА²,
Д.А. ЮСАЕВА¹, Д. И. БАБИСЕКОВА¹, П.А. АЛЬЧИМБАЕВА¹

¹ Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства, п. Алмалыбак, Алматинская обл., Казахстан

² Опытное хозяйство масличных культур», с. Солнечное, Глубоковский р-н, Восточно-Казахстанская область, Казахстан

E-mail: bulatova_k@rambler.ru

В статье представлены результаты изучения генетического разнообразия 126 инбредных линий подсолнечника из коллекционного фонда «Опытное хозяйство масличных культур» Казахстана по белковым и SSR маркерам. Полиморфность коллекций по составу гелиантинина – запасного белка семян была не высокой, в зоне быстро-подвижных белков выявлено три варианта компонентов, характерных для всех типов инбредных линий. Вместе с тем, установлены компоненты, специфичные для линий с rf и Rf генами. ПЦР анализ ДНК инбредных линий с использованием 16 SSR маркеров показал отсутствие вариаций в продуктах амплификации локуса ORS 428, низкую полиморфность локуса ORS 785 ($PI_C \leq 0.2$). Высокую полиморфность ($PI_C > 0,8$) в изучаемых коллекциях проявили маркеры: ORS316, ORS381, ORS 437, ORS456, ORS505, ORS, ORS630, ORS761, ORS925. На основе молекулярного маркирования проведена регистрация инбредных линий коллекционного фонда Казахстана, для оценки уровня гибридности семян F1 коммерческих гибридов подсолнуха подобраны SSR маркеры, способные дифференцировать генетический материал исходных родительских линий в ДНК гибрида.

Ключевые слова: *Helianthus annuus L.*, инбредные линии, полиморфность, гелиантинин, SSR маркер, генетическое разнообразие.

Введение. Подсолнечник (*Helianthus annuus L.*) является одной из важнейших масличных культур, возделываемых в Казахстане. Посевы подсолнечника в стране составляет около 900 тыс. га, основные площади сосредоточены в Восточно-Казахстанской и Павлодарской областях. Аграриями Республики используются как сорта так и гибриды подсолнечника. В Госреестр селекционных достижений РК включены 2 сорта и 15 гибридов подсолнечника, из кото-

рых 2 сорта и 9 гибридов созданы научными учреждениями Казахстана.

Эффективность селекции сельскохозяйственных культур, в том числе и подсолнечника зависит от наличия генетических ресурсов, представленных разнообразием генов ценных селекционных признаков.

Генетическая чистота самоопыленных отцовских форм и стерильных материнских форм, а также линий закрепителей стерильности имеет важное значение в успешности селекционной и семеноводческой работы. Типичность линий определяется в полевых условиях путем наблюдения за растениями в течение всего периода вегетации и оценке по значительному ряду морфологических и биологических признаков. Белковые маркеры, в частности запасные белки семян и ферменты достаточно эффективно использовались в селекции и семеноводстве подсолнечника [1] в качестве точных методов определения генетической чистоты и все еще востребованы в практической селекции при лабораторном анализе чистоты самоопыленных линий и уровня гибридности семян F1 поколения [2, 3].

Молекулярные маркеры белкового и ДНК уровня уверенно входят в арсенал используемых селекционерами признаков, позволяющих на уровне единичных семян, частей индивидуальных растений идентифицировать ценные генотипы, подбирать исходные для гибридизации формы, на ранних этапах селекции маркировать перспективные линии с комплексом важнейших признаков [4]. Монолокусные SSR (simple sequence repeats) маркеры большей частью полиморфны, кодоминантно наследуются, ПЦР (полимеразная цепная реакция) ана-

© К.М. БУЛАТОВА, Ш. МАЗКИРАТ,
О.А. ГАВРИЛОВА, Д.А. ЮСАЕВА, Д.И. БАБИСЕКОВА,
П.А. АЛЬЧИМБАЕВА, 2020

лизы с их использованием воспроизводимы, в связи с чем они широко используются в оценке генетического разнообразия коллекционного материала, отборе генотипов с желаемыми признаками.

К настоящему времени разработано значительное число SSR маркеров для подсолнечника, которые используются как в оценке генетического разнообразия сортовых популяций, коллекций инбредных линий, так и в непосредственной селекции гибридов [5–7]. Установлено что генетическое разнообразие культивируемых форм подсолнечника составляет 2/3 такового диких форм [8], что свидетельствует о сужении их генетической базы за счет использования в селекции одних и тех же источников и необходимости ее расширения путем внедрения новых генов [9].

Значительные исследования по применению молекулярных маркеров в селекции подсолнечника ведутся в институте полевых и овощных культур в Сербии. Так, RAPD (random amplified polymorphic DNA) и SSR маркеры обеспечивают важную информацию относительно генетического различия между инбредными линиями, отбора родительских форм для планируемых скрещиваний (10, 11). Усиливаются исследования по применению молекулярных маркеров с селекции и семеноводстве подсолнечника в странах постсоветского пространства. Так, молдавские ученые разрабатывают и применяют в исследованиях маркеры, тесно сопряженные с генами восстановителями фертильности, устойчивости к болезням [12–14]. Значительные успехи по использованию ДНК маркеров в улучшении подсолнечника достигнуты российскими учеными. В НИИ биологии Южного федерального университета проведена паспортизация селекционного материала [15, 16], ведутся исследования по подбору SSR-маркеров, ассоциированных с эффектом гетерозиса [17, 18], кодоминантных маркеров гена восстановителя фертильности [19].

Идентификация имеющихся коллекций самоопыленных линий и выделение перспективных с комплексом ценных признаков линий для создания гибридов с помощью маркерной селекции повышает качество процесса селекци-

онного отбора, сокращает сроки и трудоемкость создания инбредных родительских линий и, в конечном счете, высокоурожайных гибридов, что отражается на рентабельности возделывания культуры в производстве и благосостоянии аграриев.

Целью наших исследований являлось изучение генетического разнообразия инбредных линий подсолнечника из коллекционного фонда «Опытное хозяйство масличных культур» Казахстана по белковым и SSR маркерам и разработка молекулярно-маркерных подходов к оценке чистоты линий и уровня гибридности семян F1 гибридов.

Материалы и методы. Объектами исследований являлись 38 линий с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС), далее – А, 45 линий закрепителей стерильности, далее – Б и 43 линии восстановителей фертильности (далее – В) подсолнечника из коллекции «Опытное хозяйство масличных культур», Восточно-Казахстанская область, Казахстан.

Выделение запасных белков – гелиантининов велось методом Galili, Feldman, 1983 [20]. Система электрофоретического разделения соответствовала методу Лэммли (1970). Фиксация и окрашивание белковых полос проводилась в 12,5%-ной трихлоруксусной кислоте (ТХУ). В качестве маркера молекулярных масс использовали набор ThermoScientific (Литва).

Геномная ДНК выделялась из первой пары настоящих листьев проростков. Для выделения ДНК в эппендорф пробирку 2 мл отбирали приблизительно 200 мг ткани 2-го настоящего листа, добавляли 800 мкл СТАВ экстрагирующего буфера, содержащего кроме базовых компонентов 1,0 % PVP40, 0,2 % бета-меркаптоэтанола (ВМЕ) и гомогенизировали пестиком. Экстрагированную и осажденную ДНК перерастворяли в 1М NaCl и обрабатывали RNase A (10 мг/мл), осаждали охлажденным 95%-ным этанолом, отмывали 70%-ным этанолом. Выделенную ДНК растворяли в ddH₂O, определяли качество и измеряли концентрацию на спектрофотометре Jenway, доводили концентрацию до 0,1 мкг/мкл.

Проверку качества ДНК проводили также электрофорезом в 8%-ном полиакриламидном геле.

Для ПЦР анализа состав реакционной смеси был следующим: 20 нг геномной ДНК, 1.6x PCR буфер, 2,5 мМ MgCl₂, 200 мкМ каждого dNTP, 0,5 мкМ каждого праймера, 0,5 ед Taq – полимеразы. Амплификацию проводили в термощиклере iCycler «BIORAD». Условия амплификации: начальная денатурация – 94 °С 5 мин, затем семь циклов 30 с при 94 °С, 30 с при 63 °С и 45 с при 72 °С. Температура отжига снижалась на 1 °С при каждом цикле. Далее следовали 30 циклов: 30 с при 94 °С, 30 с при 57 °С и 45 с при 72 °С, финальная элонгация 10 мин. Электрофорез продуктов амплификации проводили в полиакриламидном геле (8 %

акриламид, 1xтрис – боратный буфер) при 200 В в течение 70 мин. Продукты амплификации окрашивали бромистым этидием. Документирование полученных электрофореграмм проводили с помощью геле документирующей системы QuantumST4. Размерность продуктов определяли с помощью компьютерной программы «quantumsoft, imageanalysis» относительно маркеров длины фрагментов ДНК.

Электрофорез продуктов амплификации проводили в агарозном геле (2 % агароза, 1 x TAE-буфер) с использованием камеры для горизонтального электрофореза (SE.2, ДНК-технология, Россия) в течение 1–1,5 часов при силе

Таблица 1. Праймеры, использованные для амплификации SSR маркеров и идентификации линий подсолнечника

SSR маркер	Праймер	Хромосома	Размерность, п.н.
ORS 316	f: TGGCGTCTTCATAGCATCAG r: GAGATTTGAGCTTCGTGTTGC	13	189
ORS 381	f: CCAACGGTGATGTAAGTAGGAA r: GTTCTCCTGGATAGCTCGACA	6	216
ORS 420	f: TCATGGTGTGTTGGTTTGTGTC r: TGCCAAATTCCTCTTCTTTCT	15	138
ORS 428	f: TGCATTCATGATCAAAGGTTG r: CATCACATCATTATCATCTCATCATG	9	221
ORS 437	f: GACGTCTTCACAGTTCAAATAACG r: GCATCGACTCTGTTCTTCTCG	10	342
ORS 456	f: CAAGGAATTCTAACAAGAGTTTAAG r: GATTTCTCACTTCACTCCTCTATGC	8	322
ORS 505	f: GTGCGTTGGCTCTTATGGAT r: AGTGATGGCATTCCCAATTT	5	239
ORS 630	f: TGTGCTGAGGATGATATGCAG r: GCACGACCCGGATATGTAAC	11	347
ORS 656	f: TCGTGGTAAGGGAAGACAACA r: ACGGACGTAGAGTGGTGGAG	16	196
ORS 716	f: CCCACAACCCATAGCCTAA r: GAACTAACCGCCATCCAAGA	1	312
ORS 735	f: TGCTAACCTGAAACCCCATC r: ACTGAAAAACAGAACAAGGAGGT	17	373
ORS 761	f: GGTGCCGGTGTCTCTTAC r: ACGGTTGCGATCACTTGTTA	12	346
ORS 785	f: CAAAATACCCAGGTCAAAGCA r: CCTAGCTTATGGGACGTATGGA	4	161
ORS 925	f: ATGATTCTAAGTTGCGGTAGTGC r: GTTGGGTTTAAGTTGTGCTTCC	2	201
ORS 1114	f: AGATGGTGGCAGGAGAGTTAAAG r: GCAGAAACAGATCAGGAGGGTAT	3	253
ORS 1248	f: TGTCCGATCTACCATCTGAAATC r: TAGAGCGAAATCTAGTTACATGAGTG	14	374

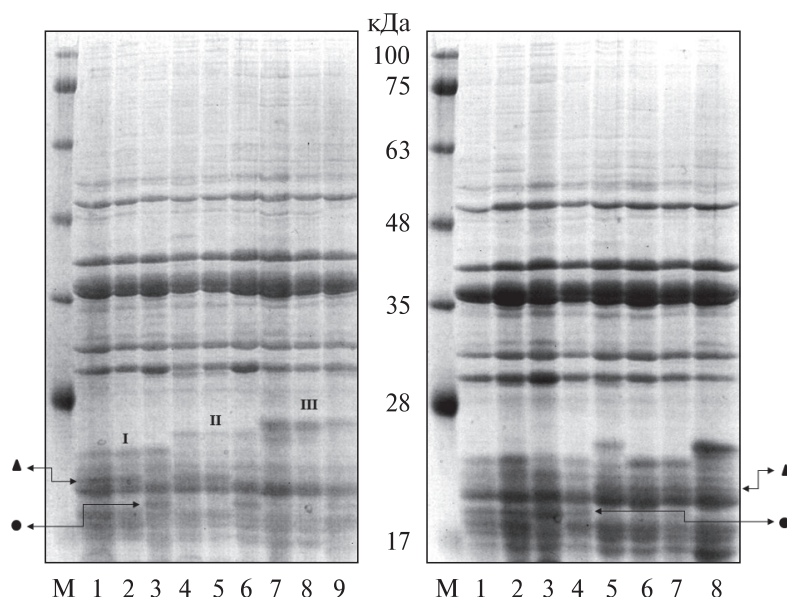


Рис. 1. Спектр гелиантининов инбредных линий подсолнечника: *a* – типы гелиантинина (1,4,7 – А; 2,5, 8 – Б; 3,6,9 – В линии); *b* – маркерные белки *rf* (▲) и *Rf* (●) генов (1–4: В, 5–9: А линии)

тока 58 мА и напряжении 90–100 В. Последующее окрашивание осуществляли бромистым этидием. Визуализация результатов электрофореза в ультрафиолетовом свете и их документирование обеспечивались при помощи системы цифровой документации видеоизображения BIO-PRINT (Vilber Lourmat, Франция).

Для молекулярного маркирования использовались 16 маркеров SSR типа, разработанных Tang и др. (2003)., [7], (табл. 1).

Число эффективных аллелей оценивалось по Kimura, Crow (1964) [21], генетическое разнообразие – методом Nei, (1973) [22], индекс Шеннона по Lewontin (1972) [23]. Математическая обработка данных осуществлялись при помощи пакета программ StatisticaV 7.0, кластеризация методом Ward, полиморфизм коллекций самоопыленных линий определяли с помощью программы Popgene, версия 1.32 [24].

Результаты исследований. В спектре запасных белков семян анализированных образцов подсолнечника насчитывается до 40 минорных и интенсивных компонентов с молекулярной массой от 17 до 110 кДа (рис. 1). Žilić с соавторами [26] выявляют 32 компонента, имеющих молекулярную массу от 11 до 94 кДа. Наиболее интенсивные компоненты имеют молекулярную массу ниже 60 кДа, аналогичные

результаты приведены в работе Nikolić Z. и др. (2007) [27].

В целом, генетическое разнообразие коллекций инбредных линий по составу компонентов гелиантинина было незначительным.

По спектру гелиантинина наибольшие различия между линиями всех типов наблюдались, в основном, в зоне быстроподвижных компонентов с молекулярной массой от 20 до 27 кДа (рис. 1, *a*).

В этой зоне выявлено 3 типа спектра с частотой встречаемости 1-ого 65,8 % у линий с ЦМС, 68,9 % среди линий закрепителей стерильности, 81,3 % у линий восстановителей фертильности. Доля образцов со вторым типом спектра составила 31,5 % у ЦМС линий, 28,9 % – среди Б линий и 14,0 % у линий восстановителей фертильности. Генотипы с 3 типом спектра встречались в коллекционных наборах в незначительном количестве (2,6 % среди ЦМС линий, 2,2 % среди линий закрепителей стерильности и 4,7 % среди линий восстановителей фертильности).

Эта группа компонентов контролируется локусом *Hel C* и наличие 3-х аллелей (а, в и с) с молекулярной массой от 21 до 24 кДа отмечено Анисимовой (2015) [25]. Автор полагает, что во многих случаях полиморфизм локусов

гелиантинина связан с происхождением линий, наличием в родословной генетического материала дикорастущих форм.

Спектр гелиантинина выявил также очень важную специфичность инбредных линий, для которых характерно наличие доминантного либо рецессивного варианта гена восстановления фертильности (рисунок 1, *b*). Так линии с геном *Rf* (отцовские формы) имели компонент гелиантинина с молекулярной массой 24,5 кДа, тогда как у линий с рецессивным *rf* геном (ЦМС и закрепители стерильности) этот белок отсутствовал, но обнаруживался компонент с молекулярной массой 26 кДа. Эти белковые компоненты могут служить надежными маркерами наличия генов *Rf/rf* в селекционном материале и в контроле уровня гетерозиготности семян F1 гибридных популяций.

ПЦР анализ ДНК инбредных линий с использованием 16 SSR маркеров показал отсутствие вариаций в продуктах амплификации локуса *ORS 428*, в связи с чем, его данные были исключены из обработки.

Число аллелей остальных анализированных локусов в коллекции всех инбредных линий, включающих А, Б и В линии, варьировало

от 3-х (локус *ORS785*) до 16 (локусы *ORS505*, *ORS630*). Максимальное число эффективных аллелей (*ne*) проявилось у маркера *ORS505*, минимальное — у маркера *ORS785* (табл. 2).

Высокая гетерозиготность (*h*), индекс Шеннона (*I*), полиморфность (*PIC*) выявлена для маркеров *ORS505*, *ORS456*. Известно, что чем выше полиморфность маркерного локуса, тем эффективнее роль маркера в оценке генетического разнообразия. Полагают, что при значении *PIC* маркера ниже 0,2 следует избегать его использования в различении генотипов [28]. Среди изученных маркеров наименьшее значение *PIC* выявлено для *ORS785* (0,169), исходя из чего можно предположить, что разрешающая способность маркеров *ORS428* (имеет один продукт амплификации размерностью 221 п.н., в таблицах не указан) и *ORS785* очень низка в оценке генетического разнообразия коллекционных образцов.

В коллекции 38 ЦМС линий число аллелей (*na*) оцениваемых локусов варьировало от 5 до 12, (данные не приведены), максимальное число эффективных аллелей (*ne*) проявилось у маркера *ORS630*, минимальное — у маркера *ORS785*.

Таблица 2. Генетическое разнообразие коллекции инбредных линий подсолнечника по 15 микросателлитным локусам

Локус	na	ne	h	I	PIC
ORS316	11,000	7,037	0,858	2,106	0,842
ORS381	15,000	8,167	0,878	2,312	0,866
ORS420	11,000	5,072	0,803	1,799	0,775
ORS437	13,000	7,805	0,872	2,257	0,857
ORS456	14,000	10,074	0,900	2,420	0,892
ORS505	16,000	10,243	0,902	2,461	0,894
ORS630	16,000	7,309	0,862	2,362	0,853
ORS656	6,000	3,848	0,740	1,566	0,674
ORS716	7,000	4,333	0,769	1,645	0,736
ORS735	12,000	5,497	0,818	1,950	0,796
ORS761	11,000	6,582	0,848	2,067	0,829
ORS785	3,000	1,849	0,4592	0,722	0,169
ORS925	13,000	8,666	0,885	2,299	0,874
ORS1114	6,000	3,468	0,712	1,402	0,639
ORS1248	7,000	4,3687	0,771	1,650	0,739
average	10,733	6,288	0,805	1,935	0,762

Примечание. *na* — число аллелей; *ne* — число эффективных аллелей; *h* — генетическое разнообразие Нея; *I* — индекс Шеннона; *PIC* — Polymorphic information content.

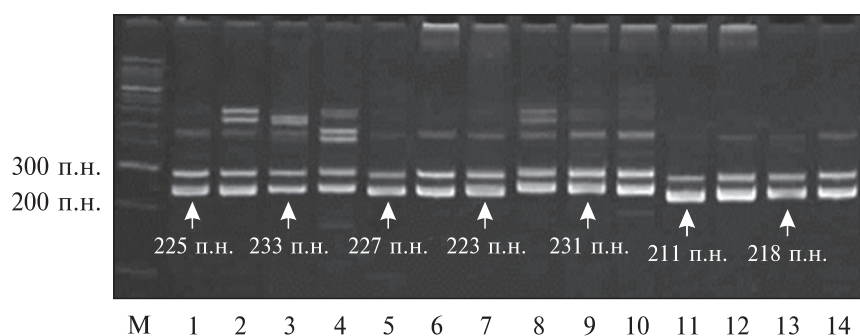


Рис. 2. Электрофореграмма разделения продуктов ПЦР, полученных с использованием праймеров к маркеру *ORS 505*: М – маркер, 100 п.н.; 1 – ВКУ 1А; 2 – ВКУ 5А; 3 – ВКУ 9А; 4 – ВКУ 19А; 5 – ВКУ 25А; 6 – 27А; 7 – ВКУ 35А; 8 – 64А; 9 – ВКУ 65А; 10 – ВКУ 77А; 11 – ВКУ 94А; 12 – ВКУ 101А; 13 – ВКУ 102А; 14 – 108А

Таблица 3. Разнообразие аллелей SSR локусов в коллекциях инбредных линий подсолнечника

Маркер	Тип	Размерность аллелей, п.н.	na	
			a	b
<i>Ors 316</i>	А	186, 188, 190, 193, 195	5	11
	Б	179, 180, 181, 186 , 188, 193, 195, 198, 202	9	
	В	178 179, 180, 181, 186, 188 , 193, 195, 202	9	
<i>Ors 381</i>	А	182, 186, 188 , 194, 202	5	15
	Б	203, 210, 213, 216 , 220, 226	6	
	В	198, 202, 203, 206, 208, 210, 213 , 216, 218, 220, 226	11	
<i>Ors 420</i>	А	123, 125, 130, 133, 135, 138	6	11
	Б	119, 128, 130 , 133, 138, 140, 145, 149	8	
	В	128, 130, 133 138 , 140, 145, 149	7	
<i>Ors 428</i>	А	221	1	1
	Б	221	1	
	В	221	1	
<i>Ors 437</i>	А	335, 342 , 357, 360, 371, 382	6	13
	Б	342, 347, 354 , 360, 368	5	
	В	328, 335 , 342, 347, 354, 360, 368, 382, 399, 403, 409	11	
<i>Ors 456</i>	А	320, 322, 324 331, 334	5	14
	Б	331, 334, 340, 345 , 358	5	
	В	308, 309, 311, 313, 318, 320 , 322, 330, 331, 334	10	
<i>Ors 505</i>	А	211, 214, 218, 220, 223, 225, 227, 229, 231 , 233, 239	11	16
	Б	220, 223, 225, 227, 229, 231 , 233, 236 , 239, 242	10	
	В	221, 227, 229, 231, 233, 236, 239, 242 , 245, 250	10	
<i>Ors 630</i>	А	358, 364, 378, 384, 393 409 , 418, 424	8	16
	Б	329, 337, 340, 347, 351, 358 , 364, 378, 385, 409	10	
	В	337, 342, 347, 364, 398, 409 , 418	7	

Маркер	Тип	Размерность аллелей, п.н.	na	
			a	b
<i>Ors 656</i>	A	191, 193 , 196, 198, 200, 206	6	6
	Б	191, 193, 196, 198, 200, 206	6	
	В	193 , 196, 198, 206	4	
<i>Ors 716</i>	A	300, 306 , 310, 312 , 318, 334	6	7
	Б	306, 310, 312, 318 , 326, 334	6	
	В	300, 306, 310, 312 , 318	5	
<i>Ors 735</i>	A	338, 348, 357, 360, 366, 373, 380 , 390	8	12
	Б	328, 338, 348, 357, 366, 380, 390, 410 , 467, 480	10	
	В	357, 366, 380, 390 , 410	5	
<i>Ors 761</i>	A	328, 339 , 353, 372	4	11
	Б	339, 350, 360, 366, 372 , 382, 388, 392	8	
	В	353, 360 , 366, 372, 380, 392	6	
<i>Ors 785</i>	A	144, 148	2	3
	Б	144, 148	2	
	В	144, 148 , 151	3	
<i>Ors 925</i>	A	196, 200, 201, 203, 205, 208, 212 , 214, 218, 222, 225, 227, 232	13	13
	Б	196, 200, 201, 203, 205, 208, 212 , 218, 222	9	
	В	196, 200, 201, 203, 205, 208, 212, 214, 218, 222, 232	11	
<i>Ors 1114</i>	A	224, 231 , 238, 240, 244	5	6
	Б	224, 231 , 238, 248	4	
	В	224, 231, 238, 240, 248	5	
<i>Ors 1248</i>	A	340, 348, 358 , 374, 384, 394	6	7
	Б	348, 358, 366, 384	4	
	В	358, 366 , 374, 384	4	

Примечание. na – число аллелей; a – число аллелей в коллекциях А, Б и В линий; b – число аллелей во всей коллекции.

Высокая гетерозиготность (h), индекс Шеннона (I), полиморфность (PIC) выявлена в этом наборе линий для маркеров *ORS505* и *ORS925*.

На рис. 2 приведены электрофореграммы разделения продуктов ПЦР, полученных с использованием праймеров к маркерам *ORS 505* и ДНК ЦМС линий.

Идентификация и паспортизация 45 линий закрепителей стерильности показала, что число аллелей изучаемых локусов варьировало от 2 (локус *ORS785*) до 10 (локусы *ORS505*, *ORS630*, *ORS 735*).

Максимальное число эффективных аллелей (ne), высокая гетерозиготность (h), индекс Шеннона (I), полиморфность (PIC) выявлена

в этом наборе линий для большего числа маркеров: *ORS316*, *ORS505*, *ORS630*, *ORS925*. Маркеры *ORS785* и *ORS428* недостаточно эффективны в различении коллекционных образцов.

Оценка генетического разнообразия коллекции линий восстановителей фертильности показала, что наряду с высокой полиморфностью локусов *ORS316*, *ORS505*, *ORS925*, которая проявлялась в коллекциях ЦМС линий и в наборе линий-закрепителей стерильности, в данном наборе локусы *ORS 381* и *ORS437* также характеризовались высоким числом аллелей, высокой гетерозиготностью, индексом Шеннона (I), полиморфностью (PIC).

Сравнение продуктов амплификации в ходе ПЦР анализа ДНК коллекционных образцов с участием ряда маркеров, использованных в исследованиях другими авторами показало большее число аллельных вариантов, что объяснимо, поскольку авторы использовали ограниченное число линий для решения специфических задач селекции [29, 30]. Так, маркер *ORS656* проявил мономорфность при анализе 10 линий подсолнечника коллегам из Молдавии [31], тогда как при анализе 124 инбредных линий этот маркер показал достаточно высокую полиморфность [28].

Анализ наших образцов также показал высокую полиморфность данного маркера в коллекциях инбредных линий с ЦМС и линиях закрепителей стерильности. Несколько ниже число аллелей было в коллекции линий восстановителей фертильности.

Значительная часть продуктов амплификации анализированных SSR маркеров была аналогичной по размерности как у ЦМС линий (А), так и у линий закрепителей стерильности (Б) и восстановителей фертильности (В), табл. 3. Наиболее распространенные аллели SSR локуса в каждом наборе инбредных линий выделены в таблице полужирным шрифтом.

Маркеры *ORS381*, *ORS456* и *ORS505* достаточно четко дифференцировали А и В линии, которые распределились в 2 кластера (рис. 3). Исключение составили 6 линий восстановителей стерильности, 5 из которых сосредоточились в одном из субкластеров, среди ЦМС линий.

Полученные результаты по ДНК маркированию самоопыленных линий подсолнечника на основе SSR маркеров показывают их большую информативность, обеспечивающую точную идентификацию генотипов по сравнению с белковыми маркерами, высокую генетическую чистоту линий

Наличие специфических аллелей SSR маркеров для родительских форм позволяет определять гибридность семян подсолнечника, кукурузы и других перекрестных культур [32, 33]. Анализ данных по генотипированию коллекции самоопыленных линий позволил выявить SSR маркеры, по которым родительские линии 6-ти коммерческих гибридов подсолнечника (Солнечный 20, Юбилейный 40, Казахстан-

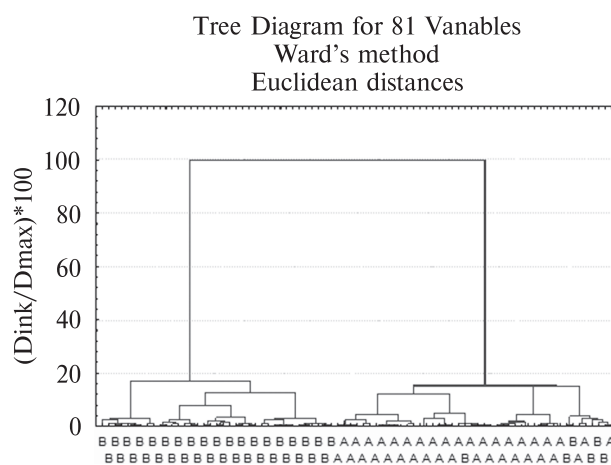


Рис. 3. Распределение 38 А и 43 В инбредных линий подсолнечника по продуктам амплификации *ORS381*, *ORS456* и *ORS505* маркеров

кий 95, Казахстанский 5, СК 2594, Астана) отличались размерностью продуктов амплификации. Эти данные будут использоваться в оценке уровня гибридности производимых семян этих гибридов.

Выводы. Результаты изучения генетического разнообразия 95 инбредных линий подсолнечника из коллекционного фонда «Опытное хозяйство масличных культур» Казахстана по белковым и SSR маркерам показали, что полиморфность коллекций по составу гелиантина была не высокой, выявлено три варианта компонентов в зоне быстро-подвижных компонентов с молекулярной массой от 20 до 27 кДа, которые встречаются как у линий с цитоплазматической стерильностью, так и у закрепителей стерильности и восстановителей фертильности. Вместе с тем, в спектре гелиантина всех стерильных форм и закрепителей стерильности присутствовал компонент с молекулярной массой 26 кДа, который можно считать белковым маркером *rf* гена, тогда как в спектре гелиантина линий восстановителей фертильности присутствует белковая полоса массой 24,5 кДа, которую можно считать белковым маркером гена *Rf*.

ПЦР анализ ДНК инбредных линий с использованием 16 SSR маркеров показал отсутствие вариаций в продуктах амплификации локуса *ORS 428*, низкую полиморфность локуса *ORS 785* ($PI_C \leq 0,2$). Наибольшее число

высокополиморфных маркеров ($PIC > 0,8$) выявлено в коллекции инбредных линий восстановителей фертильности (*ORS 316, ORS 381, ORS 437, ORS 456, ORS 505, 925*). На основе молекулярного маркирования проведена регистрация инбредных линий коллекционного фонда Казахстана, для оценки уровня гибридности семян F1 коммерческих гибридов подсолнечника подобраны SSR маркеры, способные дифференцировать генетический материал исходных родительских линий в ДНК гибрида.

Соответствие этическим стандартам. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Это исследование поддержано грантом МОН РК 0788/ГФ4 и программно-целевым финансированием МСХ РК (БП 267 МСХ РК, О. 0868).

GENETIC DIVERSITY OF SUNFLOWER INBRED LINES OF KAZAKHSTAN COLLECTION FUND ON THE PROTEIN AND SSR MARKERS

K.M. Bulatova, Sh. Mazkirat, O.A. Gavrilova, D.A. Yusaeva, D.I. Babissekova, P.A. Alchinbayeva

Kazakh Scientific Research Institute of Agriculture and Plant Growing, Almaty region, Kazakhstan "Experimental farm of oilseeds", Solnechnoye v., Glubokovskiy distr., Eastern Kazakhstan region, Kazakhstan

E-mail: bulatova_k@rambler.ru

The article presents the results of the study on genetic diversity of 126 sunflower inbred lines from «Experimental farm of Oilseeds» of Kazakhstan collection fund by protein and SSR markers. The polymorphism of collections in composition of helianthinin was not high, in the zone of fast migrated proteins three variants of components were found that are characteristic of all types of inbred lines. At the same time, components specific to lines with *rf* and *Rf* genes have been identified. PCR analysis of inbred lines DNA by 16 SSR markers showed no variations in the amplification products of the *ORS 428* locus, low polymorphism of the *ORS 785* locus ($PIC \leq 0.2$). High polymorphism ($PIC > 0.8$) in the studied collections was demonstrated by the following markers: *ORS316, ORS381, ORS 437, ORS456, ORS505, ORS, ORS630, ORS761, ORS925*. Based on

molecular marking, registration of inbred lines of Kazakhstan collection fund was carried out. In order to assess the level of hybridity of F1 seeds of commercial sunflower hybrids, SSR markers were selected that can differentiate the genetic material of the original parental lines in the DNA of hybrid.

ГЕНЕТИЧНА РІЗНОМАНІТНІСТЬ КАЗАХСТАНСЬКОГО КОЛЕКЦІЙНОГО ФОНДУ ІНБРЕДНИХ ЛІНІЙ СОНЯШНИКА ПО БІЛКОВИМ ТА SSR МАРКЕРАМ

К.М. Булатова, Ш. Мазкират, О.А. Гаврилова, Д.А. Юсаева, Д.И. Бабисекова, П.А. Альчимбаева

У статті представлені результати вивчення генетичної різноманітності 126 інбредних ліній соняшнику з колекційного фонду «Дослідне господарство олійних культур» Казахстану за білковими і SSR маркерами. Поліморфність колекцій за складом геліантініну – запасного білка насіння була не високою, в зоні швидко-рухомих білків виявлено три варіанти компонентів, характерних для всіх типів інбредних ліній. Разом з тим, встановлено компоненти, специфічні для ліній з *rf* і *Rf* генами. ПЛП аналіз ДНК інбредних ліній з використанням 16 SSR маркерів показав відсутність варіацій в продуктах ампліфікації локусу *ORS 428*, низьку поліморфність локусу *ORS 785* ($PIC \leq 0,2$). Високу поліморфність ($PIC > 0,8$) в досліджуваних колекціях проявили маркери: *ORS316, ORS381, ORS437, ORS456, ORS505, ORS, ORS630, ORS761, ORS925*. На основі молекулярного маркування проведено реєстрацію інбредних ліній колекційного фонду Казахстану, для оцінки рівня гібридності насіння F1 комерційних гібридів соняшнику підібрані SSR маркери, здатні диференціювати генетичний матеріал вихідних батьківських ліній у ДНК гібрида.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Popereya, F.O., Geneticheskaya interpretatsiya elektroforegram geliantinina semyan F1 podsolnechnika, *Cytol. Genet.* 2000, vol. 34, no. 2, pp. 84–90.
2. Bochkovoy, A.D., Antonova, T.S., Kamardin, V.A., Araslanova, N.M., Veter, I.I., Guchetl, S.Z., and Chelyustnikova, T.A., The efficiency of different methods of determination of the genetic purity of the seed lots of self-pollinated lines and hybrids of the F1 generation of sunflower, *Oil crops. Scientific technical bulletin of VNIIMK*, 2014, vol. 157–8, no. 1, pp. 1–5.
3. Aksyonov, I.V., Mishchenko, L., Use of Electrophoretic Spectra of Reserve Seed Proteins to Improve Typicalness of Sunflower Parental Lines, *Rus. Agric. Sci.*, 2016, vol. 42, no. 3–4, pp. 211–4. doi: 10.3103/S1068367416030034.
4. Sivolap, Y.M., Molecular markers and plant breed-

- ing, *Cytol. Genet.*, 2013, vol. 47, no. 3, pp. 188–95. doi: 10.3103/S0095452713030080.
5. Paniego, N., Echaide, M., Munoz, M., Fernandez, L., Torales, S., Faccio, P., Fuxan, I., Carrera, M., Zandomeni, R., Suarez, E.Y., and Hopp, H.E., Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Genome*, 2002, vol. 45, no. 1, pp. 34–43. doi: 10.1139/G01–120.
 6. Yu, J.K., Mangor, J., Thompson, L., Edwards, K.J., Slabaugh, M.B., and Knapp, S.J., Allelic diversity of simple sequence repeat markers among elite inbred lines in cultivated sunflower, *Genome*, 2002, vol. 45, no. 4, pp. 652–60. <https://doi.org/10.1139/g02-025>.
 7. Tang, S., Yu, J.K., Slabaugh, M.B., Shintani, D.K., and Knapp, S.J., Simple sequence repeat map of the sunflower genome, *Theor. Appl. Genet.*, 2002, vol. 105, no. 8, pp. 1124–36. doi:10.1007/s00122-002-0989-y.
 8. Mandel, J.R., Dechaine, J.M., Marek, L.F., and Burke, J.M., Genetic diversity and population structure in cultivated sunflower and a comparison to its wild progenitor, *Helianthus annuus* L., *Theor. Appl. Genet.*, 2011, vol. 123, no. 5, pp. 693–704. doi: 10.1007/s00122-011-1619-3.
 9. Zeinalzadeh-Tabrizi, H., Haliloglu, K., Ghaffari, M., and Hosseinpour, A., Assessment of genetic diversity among sunflower genotypes using microsatellite markers, *Mol. Biol. Res. Commun.*, 2018, vol. 7, no. 3, pp. 143–52. doi: 10.22099/mbrc.2018.30434.1340.
 10. Pankovic, D., Application of molecular markers in sunflower breeding, *Genetika*, 2007, vol. 39, no. 1, pp. 1–11. doi: 10.2298/GENSR0701001S
 11. Imerovski, I., Dimitrijevic, A., Miladinovic, D., Dedic, D., Jovic, S., and Miklic, V., Molecular profiles of sunflower lines resistant to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.), *Proc. of Intern. Symposium on Broomrape (Orobanche spp.) in Sunflower. Chisinau, Republic of Moldova*, 2011, pp. 25.
 12. Duca, M., Port, A., Midoni, A., Rotaru, T., and Anisimova, I., RAPD analysis of the genetic variation among *CMS*, *Rf* lines and hybrid sunflower genotypes, *J. Acad. Sci. Moldova, Life Sci.*, 2010, vol. 2, no. 31, pp. 103–9.
 13. Duca M., Port A., and Şestacova T., Screening of the R2 rust resistance gene in different sunflower genotypes using SSR markers. *J. Acad. Sci. Moldova, Life Sci.*, 2011, vol. 2, no. 314, pp. 106–10.
 14. Port, A., Nechifor, V., Midoni, A., and Duca, M., Usefulness of the diagnostic markers for the restorer-gene *Rf1* in inheritance studies at sunflower, *Annals of the «Alexandru Ioan Cuza University» Sect. II.a Genetics and Molecular Biology*, 2013, vol. 14, no. 2, pp. 11–9.
 15. Markin, N.V., Tikhobaeva, V.E., Tikhonova, M.A., Gavrilova, V.A., Tolstaya, T.T., and Usatov, A.V., Genomic DNA polymorphism in annual sunflower species, *Oil crops. Scientific technical bulletin of VNI-IMK*, 2010, vol. 2, no. 144–5, pp. 3–7. doi: 10.3844/ajbbsp.2014.136.140.
 16. Guchetl, S.Z., Tchelustnikova, T.A., and Antonova, T.S., Certification of new sunflower lines and hybrids of VNIIMK breeding by means of biochemical and molecular markers, *Oil crops. Scientific technical bulletin of VNIIMK*, 2015, vol. 163, no. 3, pp. 16–23.
 17. Usatov, A.V., Gorbachenko, F.I., Azarin, K.V., Gorbachenko, O.F., Tikhobaeva, V.E., and Markin, N.V., The relation between the heterosis effect of hybrids and genetic distance of sunflower parental lines vol, *Oil crops. Scientific technical bulletin of VNIIMK*, 2013, vol. 155–6, no. 2, pp. 8–13.
 18. Usatov, A.V., Klimenko, A.I., Azarin, K.V., Gorbachenko, O.F., Markin, N.V., Tikhobaeva, V.E., Kolosov, Yu. A., Usatova, O.A., Bakoev, S., Makarenko, M., and Getmantseva, A., The relationship between heterosis and genetic distances based on SSR markers in *Helianthus Annuus*, *Amer. J. Agric. Biol. Sci.*, 2014, vol. 9, no. 3, pp. 270–6. doi: 10.3844/ajabssp.2014.270.276.
 19. Markin, N.V., Gorbachenko, O.F., Tikhonova, M.A., and Usatov, A.V., Condominant markers of *rf1* gene in cultivated sunflower, *Oil crops. Scientific technical bulletin of VNIIMK*, 2010, vol. 142–3, no. 1, pp. 3–8.
 20. Galili, G., Feldman, M., Genetic control of endosperm proteins in wheat. 2. Variation in high molecular weight glutenin and gliadin subunits of *Triticum aestivum*, *Theor. Appl. Genet.*, 1983, vol. 66, no. 1, pp. 77–86. doi:10.1007/BF00281853.
 21. Kimura, M., Crow, J.F., The number of alleles that can be maintained in a finite population, *Genetics*, 1964, vol. 49, no. 4, pp. 725–38.
 22. Nei, M., Analysis of gene diversity in subdivided populations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, vol. 70, pp. 3321–3.
 23. Lewontin R.C. Testing the theory of natural selection, *Nature*, 1972, vol. 236. —P. 181–182. doi: <https://doi.org/10.1038/236181a0>.
 24. Yeh, F.C., Boyle, T.J.B., Population Genetic Analysis of Codominant and Dominant Markers and Quantitative Traits, *Belgian J. Bot.*, 1997, vol. 129, pp. 157–63.
 25. Anisimova, I.N., Proteins of Compositae's seeds: heterogeneity, poly-morphism, usage in selection and genetic researches (review), *Agrarnaya Rossiya*, 2015, vol. no. 11, pp. 27–35.
 26. Žilić S., Barać M., Pešić M., Crevar M., Stanojević S., Nišavić A., Saratlić G., Tolimir M. Characterization of sunflower seed and kernel proteins, *Helia*, 2010, vol. 33, no. 52, pp. 103–14. doi: 10.2298/HEL1052103Z.

27. Nikolić Z., Vujaković, Jevtić, Genetic purity of sunflower hybrids Determined on the basis of isozymes and seed storage proteins, *Helia*, 2008, vol. 31, no. 48, pp. 47–54. doi: 10.2298/HEL0848047N.
28. Zhang, L., Le Clerc, V., Li, S., and Zhang, D., Establishment of an effective set of simple sequence repeat markers for sunflower variety identification and diversity assessment, *Canadian J. Bot.*, 2005, vol. 83, no. 1, pp. 66–72. doi: <https://doi.org/10.1139/b04-155>.
29. Hvarleva, Tz., Bakalova, A., Chepinski, I., Hristova-Cherbadji, M., Hristov, M., and Atanasov, A., Characterization of Bulgarian sunflower cultivars and inbred lines with microsatellite markers, *Biotechnol. Biotechnol. eq.*, 2007, vol. 21, no. 4, pp. 408–12. doi: <https://doi.org/10.1080/13102818.2007.10817484>.
30. Dimitrijević, A., Imerovski, I., Miladinović, D., Tančić, S., Dušanić, N., Jocić, S., and Miklič, V., Use of ssr markers in identification of sunflower isogenic lines in late generations of backcrossing, *Helia*, 2010, vol. 33, no. 53, pp. 191–8. doi: 10.2298/HEL1053191D.
31. Duca, M., Port, A., Şestacova, T., Siniauskaya, M., Aksonova, E., and Davydenko, O., Microsatellite marker application in sunflower (*helianthus Annuus* L.) Fingerprinting, *Biotechnol. Biotechnol. Eq.*, 2013, vol. 27, no. 3, pp. 3772–5. doi: 10.5504/BBeQ.2013.0021.
32. Pallavi, H.M., Gowda, R., Shadakshari, Y.G., Bhannuprakash, K., and Vishwanath, K., Identification of ssr markers for hybridity and seed genetic purity testing in sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Helia*, 2011, vol. 34, no. 54, pp. 59–66. doi: 10.2298/HEL1154059P.
33. Sudharani, M., Rao, P.S., and Subba Rao, L.V., Identification of SSR Markers for Testing of Hybridity and Seed Genetic Purity in Maize (*Zea Mays* L.), *International Journal of Science and Research*, 2014, vol. 3, no. 10, pp. 92–5.

Поступила в редакцию 31.10.18
После доработки 15.03.19
Принята к публикации 18.01.20