



ПОЛИМОРФИЗМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ, СЦЕПЛЕННЫХ С ЛОКУСАМИ *Rf1* И *Pl₅/Pl₈* ПОДСОЛНЕЧНИКА *Helianthus annuus* L.

Карабицина Ю. И.¹, Алпатьева Н. В.¹, Кузнецова Е. Б.¹, Гаврилова В. А.¹, Титов Н. В.²,
Радченко Е. Е.¹, Анисимова И. Н.^{1*}

¹Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г.Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44;

* irina_anisimova@inbox.ru

²Ленинградский государственный университет имени А. С. Пушкина, 196605 Россия, г. Санкт-Петербург, Пушкин, Петербургское шоссе, д. 10.

Актуальность. Микросателлитные (SSR) маркеры являются эффективным инструментом для паспортизации коллекций генетических ресурсов растений, а также для идентификации генов, детерминирующих важные биологические и агрономические признаки. Изучение их полиморфизма важно для характеристики генетического разнообразия коллекции подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) Цель настоящего исследования – анализ нуклеотидного полиморфизма SSR-маркеров, сцепленных с генами восстановления фертильности пыльцы (*Rf1*) и устойчивости к ложной мучнистой росе (*Pl5/Pl8*). **Материал и методы.** Изученный материал включал 84 самоопыленные линии генетической коллекции подсолнечника ВИР, гибриды F_1 и F_2 от скрещивания фертильных линий ВИР 365 и RIL130, а также гибриды от анализирующего скрещивания. С помощью ПЦР-анализа изучали полиморфизм SSR-маркеров ORS224, ORS511, ORS799 и HA4011. Для определения структуры микросателлитов и оценки характера их вариабельности, амплифицированные фрагменты были клонированы и секвенированы. **Результаты.** Уникальные, отличающиеся по длине от типичных (свойственных большинству генотипов), аллели маркерного локуса ORS224 выявлены у четырех линий выборки, а уникальные аллели локуса ORS511 — у 10 генотипов. У линии ВИР 365 уникальный аллель ORS511 был представлен двумя фрагментами длиной 161 пн и 240 пн, линия RIL 130 характеризовалась типичным фрагментом 159 пн. В F_2 (ВИР 365 × RIL 130) и популяции от скрещивания ВИР 111А × (ВИР 365 × RIL 130) профили типичного и уникального маркеров наследовались как аллельные варианты одного локуса. Нуклеотидные последовательности уникальных аллелей отличались от типичных аллельных вариантов по длине и числу повторяющихся единиц (GA у ORS224 и AT/GT — у ORS511), а также наличие инделей и нуклеотидных замен. Отличия по длине аллельных вариантов 240 пн и 200 пн SSR-маркера HA4011 были обусловлены инделями длиной 80 пн, 47 пн и 4 пн. **Заключение.** Ряд линий генетической коллекции подсолнечника ВИР маркирован уникальными аллелями микросателлитных локусов ORS224 и ORS511, которые отличаются от часто встречающихся аллельных вариантов по длине и числу повторяющихся единиц, наличию инделей и нуклеотидных замен. Полиморфизм аллельных вариантов микросателлита HA4011 связан с наличием инделей 80 пн, 47 пн и 4 пн.

Ключевые слова: *Helianthus annuus* L., самоопыленные линии, генетическая коллекция, SSR-маркеры, наследование, повторяющийся мотив, индели

Для цитирования:

Карабицина Ю.И., Алпатьева Н.В., Кузнецова Е.Б., Гаврилова В.А., Титов Н.В., Радченко Е.Е., Анисимова И.Н. Полиморфизм микросателлитных маркеров, сцепленных с локусами *Rf1* и *Pl₅/Pl₈* подсолнечника *Helianthus annuus* L. *Биотехнология и селекция растений*. 2021;4(4):5-14. DOI: 10.30901/2658-6266-2021-4-ol


Прозрачность финансовой деятельности. Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. **Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.** **Дополнительная информация.** Полные данные этой статьи доступны <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2021-4-ol> **Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы. Все авторы одобрили рукопись. Конфликт интересов отсутствует.**

Благодарности: Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту № 0662-2019-0001 «Коллекция масличных и прядильных культур ВИР: Изучение и расширение генетического разнообразия».

POLYMORPHISM OF MICROSATELLITE MARKERS LINKED WITH *Rf1* AND *Pl₅/Pl₈* LOCI IN SUNFLOWER *Helianthus annuus* L.

Karabitsina Yu. I.¹, Alpatieva N. V.¹, Kusnetsova E. B.¹, Gavrilova V. A.¹, Titov N. V.²,
Radchenko E. E.¹, Anisimova I. N.^{1*}

¹N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR),
42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia;

*  irina_anisimova@inbox.ru

²Pushkin Leningrad State University,
10 Petersburgskoye shosse, Pushkin, St. Petersburg 196605, Russia

Background. Microsatellite (SSR) markers are an effective tool for certifying collections of plant genetic resources, as well as for identifying genes that determine valuable biological and agronomic traits. The knowledge of their polymorphism is important for characterizing genetic diversity within the sunflower (*Helianthus annuus* L.) collection. The present study was aimed at analyzing nucleotide polymorphism of SSR-markers linked with the genes for fertility restoration (*Rf1*) and downy mildew resistance (*Pl5/Pl8*). **Materials and methods.** The material included 84 self-pollinated lines of VIR sunflower genetic collection, F₁ and F₂ hybrids from crosses between fertile lines VIR 365 and RIL130, and offspring from test crosses. Polymorphism of SSR markers ORS224, ORS511, ORS799 and HA4011 was studied by means of PCR analysis. To determine the microsatellite structure and variability, the amplified fragments were cloned and sequenced. **Results.** The unique alleles which differed from the typical ones (characteristic for most genotypes) were revealed in the ORS224 marker locus of four lines, and the unique alleles in the ORS511 locus were observed in 10 lines. The ORS511 unique allele of line VIR 365 included two 161 and 240 bp fragments, while line RIL130 was characterized by a typical 159 bp fragment. The profiles of typical and unique markers were inherited as allelic variants of the same locus in F₂ of (VIR 365 × RIL130) and a population from VIR IIIA × (VIR 365 × RIL130). The nucleotide sequences of unique alleles differed from typical allelic variants in the length and number of repeat units (GA in ORS224 and AT/GT in ORS511), and also by the presence of indels and nucleotide substitutions. Differences in length of HA4011 marker 240 and 200 bp allele variants were caused by 80, 47 and 44 bp indels. **Conclusions.** A number of lines in the VIR sunflower genetic collection are marked by the unique alleles of microsatellite loci ORS224 and ORS511, which differ from the frequently occurring variants in the length and number of repeat units, as well as in the presence of indels and nucleotide substitutions. Polymorphism of allele variants of HA4011 microsatellite is associated with the presence of indels of 80, 47 and 4 bp.

Key words: *Helianthus annuus* L., self-pollinated lines, genetic collection, SSR markers, inheritance, repeat motif, indels

For citation:

Karabitsina Yu.I., Alpatieva N.V., Kusnetsova E.B., Gavrilova V.A., Titov N.V., Radchenko E.E., Anisimova I.N. Polymorphism of microsatellite markers linked with *Rf1* AND *Pl₅/Pl₈* loci in sunflower *Helianthus annuus* L. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2021;4(4):5-14. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2021-4-01

Financial transparency. The authors have no financial interest in the presented materials or methods.

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work. Additional information.

Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2021-4-01> **The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer. All authors approved the manuscript. No conflict of interest.**

ORCID ID:

Karabitsina Yu.I. <https://orcid.org/0000-0002-8384-5134>

Alpatieva N.V. <https://orcid.org/0000-0002-5531-2728>

Kusnetsova E.B. <https://orcid.org/0000-0002-9804-1286>

Gavrilova V.A. <https://orcid.org/0000-0002-8110-9168>

Radchenko E.E. <https://orcid.org/0000-0002-3019-0306>

Anisimova I.N. <https://orcid.org/0000-0003-0474-8860>

УДК 575.13:633.85

Поступила в редакцию: 06.12.2021

Принята к публикации: 20.12.2021

Acknowledgments: The research was performed within the framework of the State Assignment according to the Thematic Plan of VIR, Project No. 0662-2019-0001 “The Collection of Oil and Fiber Crops at VIR: Maintenance, Study, and Genetic Diversity Expansion”.

Введение

Подсолнечник *Helianthus annuus* L. — ведущая масличная культура в России и основная в ряде стран мира. Производство семян подсолнечника в настоящее время основано на возделывании высокопродуктивных, устойчивых к болезням и вредителям сортов и гибридов. В общей структуре сортовых посевов в Российской Федерации доля площадей, занятых отечественными сортами и гибридами, не превышает 28% (Bochkovoy et al., 2019). Так, в государственном реестре сортов, зарегистрированных на территории РФ (по данным 2021 г.), числится 764 сорта и гибрида, из них всего 219 гибридов российской селекции (State Register of Selection Achievements, URL : <https://reestr.gossortrf.ru>). Для получения семян F_1 гибридов подсолнечника в качестве материнских форм используются линии с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС) преимущественно PET1-типа (Lecleq, 1969). Приоритетная задача при создании межлинейных гибридов подсолнечника заключается в расширении генетического разнообразия родительских форм — материнских стерильных линий и отцовских восстановителей фертильности. Для восстановления фертильности пыльцы при ЦМС PET1-типа необходимо присутствие в генотипе доминантного аллеля гена *Rf1*, локализованного в группе сцепления 13 (LG13) (Horn et al., 2003). Особое внимание при создании гибридов уделяется наличию у родительских линий эффективных генов устойчивости к фитопатогенам, в том числе к возбудителю ложной мучнистой росы — грибу *Plasmopara halstedii* (Farl) Berl. & De Toni), паразиту *Orobanche cumana* Wallr. и другим (Antonova et al., 2011).

Вследствие эффекта «бутылочного горлышка», на ранних этапах селекции культурный подсолнечник имеет узкую генетическую основу, поэтому особое значение для расширения генофонда культуры имели методы интрогрессии ценных генов от диких видов и примитивных форм (Baute et al., 2015). В связи с задачами селекции, важное значение приобрели исследования генетического разнообразия исходного селекционного материала. Значительный прогресс в изучении генетического разнообразия подсолнечника был достигнут благодаря широкому использованию молекулярных маркеров. Для оценки уровня генетического разнообразия селекционных линий и коллекционных образцов, выяснения степени их родства, в исследованиях по межвидовой гибридизации применялись различные типы молекулярных маркеров: RFLP (Berry et al. 1995; Gentzbittel et al., 1995), RAPD (Arias, Rieseberg, 1995), AFLP (Hongtrakul et al., 1997, Cheres, Knapp, 1998). В последние десятилетия широкое распространение у подсолнечника и других культурных растений получили молекулярные маркеры, микросателлитные (SSR от англ. Simple Sequence Repeats) и SNP (от англ. Single Nucleotide Polymorphism). Они нашли применение в исследованиях генотипической структуры коллекций,

сохраняемых в генетических банках семян (Garayalde et al., 2011; Filippi et al., 2015; 2020), а также при анализе уровня генетического разнообразия селекционных линий (Sujatha et al., 2008; Darvishzadeh et al., 2010; Dimitrijević et al., 2010; Duca et al., 2013; Zia et al., 2014; Mwangi et al., 2019).

Полиморфизм микросателлитных последовательностей и возможности их использования для генотипирования у *H. annuus* впервые были продемонстрированы Н. Паньего с соавторами (Paniego et al., 2002). Из 170 праймеров авторы отобрали 20 маркеров, оказавшихся наиболее информативными при анализе 16 образцов культурного подсолнечника *H. annuus*. Среднее число аллелей на locus варьировало от 3 до 8, а уровень полиморфизма составил 0,55. Первая карта микросателлитных повторов генома *H. annuus*, включающая 579 полиморфных локусов, была получена С. Тангом (Tang et al., 2002). Эта карта в дальнейшем послужила основой для поиска молекулярных маркеров, сцепленных с генами интереса. К настоящему времени идентифицированы SSR-маркеры, сцепленные с локусами *Plarg* (LG1), *Pl6* (LG8) и *Pl5/Pl8* (LG13), детерминирующими устойчивость к широкому набору рас возбудителя ложной мучнистой росы *P. halstedii*. Показаны возможности применения SSR-маркеров для идентификации этих генов в селекционном материале (Ramazanova, Antonova, 2019). Определены отличающиеся по размеру варианты маркеров ORS610, ORS716, ORS1039, ORS1182, сцепленных с аллелями устойчивости/восприимчивости к патогену в локусах *Plarg* (Wieckhorst et al., 2010; Imerovski et al., 2014; Solodenko, Fait, 2017) и *Pl5/Pl8* (Şahin et al., 2018). Картированы SSR-маркеры гена *Rf1*, контролирующего признак восстановления фертильности пыльцы при ЦМС PET1-типа (Yue et al., 2010; Bulos et al., 2013). Диагностическая ценность ряда микросателлитных маркеров оценена с использованием методов ассоциативного и гибридологического анализов (Markin et al., 2013; 2017; Anisimova et al., 2021). Однако, детальные исследования полиморфизма аллелей микросателлитных локусов у подсолнечника до сих пор не проводились, информация о характеристике отличающихся по длине аллельных вариантов отсутствует. Цель настоящего исследования — характеристика нуклеотидного полиморфизма трех локализованных в группе сцепления 13 *H. annuus* микросателлитных маркеров, сцепленных с генами восстановления фертильности пыльцы (*Rf1*) и устойчивости к ложной мучнистой росе (*Pl5/Pl8*).

Материал и методы

Изученный материал включал 84 самоопыленные линии генетической коллекции подсолнечника *H. annuus*. Большинство из них созданы в ВИР в результате многолетних исследований; в их происхождении принимали участие 66 различных источников: сорта российской и зарубежной селекции, внутривидовые и межвидо-

вые гибриды, а также российские и зарубежные линии (Gavrilova et al., 2014). Коллекция изученных линий характеризовалась разнообразием морфологических признаков: высотой растения (от 60 до 170 см), окраской листовой пластинки (зеленая, темно-зеленая, светло-зеленая, салатная), характером прикрепления к стеблю и длиной черешка (длинный, короткий, эректоидный, сидячий), наличием и разными типами ветвления (отсутствие ветвления, верхнее или нижнее ветвление, ветвление по всему стеблю из каждой пазухи листа), формой (длинные, короткие, полное отсутствие, махровые) и окраской (желтые, лимонные, красные, желто-коричневые) ложноязычковых цветков. В зависимости от предполагаемого генотипа по локусу *Rfl*, линии относились к следующим группам: стерильные линии ЦМС (генотип *rflrfl*), закрепители стерильности (генотип *rflrfl*) и восстановители фертильности пыльцы (генотип *RflRfl*). Генотипы линий по локусу *Rfl* установлены методом тестерных скрещиваний (Rozhkova, Anaschenko, 1977; Gavrilova, Rozhkova, 2005; Gavrilova et al., 2014), а также с помощью диагностических молекулярных маркеров (Anisimova et al., 2021).

Суммарную ДНК выделяли из настоящих листьев полевых растений пятинедельного возраста с использованием СТАВ-буфера (Li et al., 2007). Для анализа полиморфизма микросателлитов, сцепленных с локусом *Rfl*, были выбраны три диагностических SSR-маркера: ORS224, ORS511, ORS799. Их расстояние от локуса по данным разных исследователей, варьирует от 2,2 сМ для ORS511 до 18,8 сМ для ORS224 (Yue et al., 2010; Bulos et al., 2013; Anisimova et al., 2021). Изучали также полиморфизм вариантов SSR-маркера HA4011, который ассоциирован с геном *Pl8*, относящимся к сложному кластеру *Pl5/Pl8* (Şahin et al., 2018). Последовательности праймеров ORS224, ORS511, ORS799 были отобраны из базы данных, опубликованной С. Тангом (Tang et al., 2002), последовательности праймеров, фланкирующих локус HA4011 опубликованы в работах Н. Паньего (Paniego et al., 2002) и Э. Шахин (Şahin et al., 2018). Разделение амплифицированных (клонированных) фрагментов ДНК проводили в 3% агарозном геле. В качестве маркера для определения размера фрагментов использовали GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA).

Для оценки полиморфизма нуклеотидных последовательностей аллелей микросателлитных локусов, амплифицированные фрагменты были клонированы и секвенированы. Продукты амплификации выделяли из реакционной смеси с помощью набора реактивов «Cleanup Standard» (Евроген, Москва) и клонировали в клетках штамма DH5α *Escherichia coli* с использованием вектора pAL-TA (Евроген, Москва). Клоны отбирали с помощью ПЦР. Протоколы лигирования, трансформации и анализа данных приведены в Методических указаниях ВИР (Alpatieva et al., 2019). Секвенирование фрагментов выполнено на приборе ABI Prism3500xL (Applied Biosystems, USA) в Цен-

тре коллективного пользования научным оборудованием «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

Для определения аллельных отношений вариантов маркера ORS511: было выполнено скрещивание фертильной линии ВИР 365, ее предварительно стерилизовали обработкой гиббереллином (Anashchenko, 1967), с линией — восстановителем фертильности пыльцы RIL 130; получены гибриды F_1 и F_2 ; проведено скрещивание со стерильной линией ВИР IIIA (ЦМС РЕТ1), у которой маркер отсутствовал. Скрещивания проводили в 2015 и 2016 годах на Кубанской опытной станции — филиале ВИР. Гибриды F_1 выращены в 2016 году на Кубанской опытной станции — филиале ВИР и на опытном поле НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» (ППЛ ВИР), гибриды F_2 (ВИР 365 × RIL 130) и ВИР IIIA × (ВИР 365 × RIL 130) — в 2017 году на опытном поле ППЛ ВИР.

Для статистической обработки результатов расщепления применяли метод хи-квадрат (χ^2).

Результаты и обсуждение

У 55 линий выборки полиморфизм микросателлитных локусов ORS224, ORS511 и ORS799 изучен ранее с помощью системы микрочипового электрофореза для исследования нуклеиновых кислот MCE-202 MultiNA (Shimadzu, Япония) (Karabitsina et al., 2016). В результате этого исследования для каждого из микросателлитных локусов были идентифицированы отличающиеся по длине варианты маркерных фрагментов. У ряда линий маркерные фрагменты не удалось амплифицировать, поэтому такие варианты были обозначены как «нулевые». «Нулевые» аллели в трех локусах были характерны для рецессивных гомозигот *rflrfl*, но отмечались также и у отдельных фертильных линий-закрепителей стерильности и восстановителей фертильности пыльцы. В локусах ORS224 и ORS511, наряду с «типичными» (по С. Тангу с соавторами, Tang et al., 2002) аллелями, выявлены новые, не описанные в литературе. Наибольшее число аллелей отмечено для локуса ORS511: в нем выявлено 5 аллелей («нулевой», 201-214 пн, 161+240 пн, 198 пн и типичный 159 пн), в то время как для локусов ORS224 и ORS799 идентифицировано соответственно четыре («нулевой», 105-106 пн, 124+140-146 пн, типичный 136 пн) и два аллеля («нулевой» и типичный 143 пн) (Karabitsina et al., 2016).

Линии ВИР 210 и ВИР 370 характеризовались уникальными профилями микросателлитов ORS224 (105-106 пн) и ORS511 (210-214 пн), а линии ВИР 376 и ВИР 378 обладали уникальным аллелем ORS224 (124 пн) и типичным ORS511 (159 пн). Заметим, что линии ВИР 376 и ВИР 378 получены на основе одного и того же источника — линии ВИР 104, в происхождении которой, по данным анализа полиморфизма запасного белка семян гелиантина, по-видимому, участвовали формы однолетнего дикорастущего подсолнечника (Gavrilova

et al., 2014). Всего в изученной выборке генотипов четыре линии (ВИР 210, ВИР 370, ВИР 376 и ВИР 378) характеризовались уникальными профилями маркера ORS224, тогда как уникальные аллели маркерного локуса ORS511 встречались чаще: они были характерны для 10 линий (ВИР 210, ВИР 370, ВИР 376, ВИР 378, ВИР 343, ВИР 381, ВИР 365, ВИР 705, ВИР 377, ВИР 130Б). Лишь две из 10 линий, у которых были выявлены уникальные аллели микросателлитных локусов ORS224 и ORS511 — ВИР 130 и ВИР 377 — не являлись восстановителями фертильности, то есть были рецессивными гомозиготами по локусу *Rfl*.

Результаты оценки размера амплифицированных фрагментов с использованием системы микрочипового электрофореза имеют погрешность ± 5 пн, поэтому полученные в исследовании Ю Карабитсиной с соавторами (Karabitsina et al., 2016) размеры ампликонов отличались от приведенных в оригинальной работе С. Танга с соавторами (Tang et al., 2002). Кроме того, одной из причин появления уникальных ампликонов у ряда линий могла быть неспецифическая амплификация. Для того, чтобы уточнить, являются ли уникальные аллели маркера ORS511 аллельными вариантами одного и того же локуса, мы изучили наследование ампликонов в расщепляющейся гибридной популяции F_2 ВИР 365 \times RIL 130, а также у растений популяции от скрещивания ВИР 111А \times (ВИР 365 \times RIL 130). У линии ВИР 365 ампли-

коны, полученные с парой праймеров ORS511, были представлены двумя фрагментами — размером 161 пн и 240 пн, у линии RIL 130 — одним фрагментом размером 159 пн, свойственным большинству генотипов; у стерильной линии ВИР 111 с ЦМС РЕТ1-типа (рецессивный генотип по локусу *rflrfl*), фрагменты отсутствовали (Karabitsina et al., 2016).

В F_2 (ВИР 365 \times RIL 130) наблюдали два профиля амплифицированных фрагментов: фенотип отцовского родителя RIL 130 (единичный фрагмент размером 159 пн и фенотип материнского родителя ВИР 365, включавший два ампликона длиной 161 пн и 240 пн). Разница в подвижности между фрагментами 159 пн и 161 пн на электрофореграммах незаметна, поэтому гетерозиготы (гибридный фенотип) и гомозиготы по аллелю, характерному для линии ВИР 365, не различались. Соотношение фенотипических классов соответствовало теоретически ожидаемому 3:1 ($\chi^2=0,27$; $p>0,05$) (рис. 1, табл. 1). Популяция F_2 ВИР 111А \times (ВИР 365 \times RIL 130) расщеплялась на два фенотипических класса, соответствовавших фенотипам линий ВИР 365 и RIL 130; их соотношение соответствовало ожидаемому 1:1 ($\chi^2=0,38$; $p>0,05$). Рекомбинантные фенотипы в обеих популяциях не обнаружены. Результаты гибридологического анализа позволили предположить, что в локусе ORS511 линии ВИР 365 находятся две тесно сцепленные дублированные последовательности.

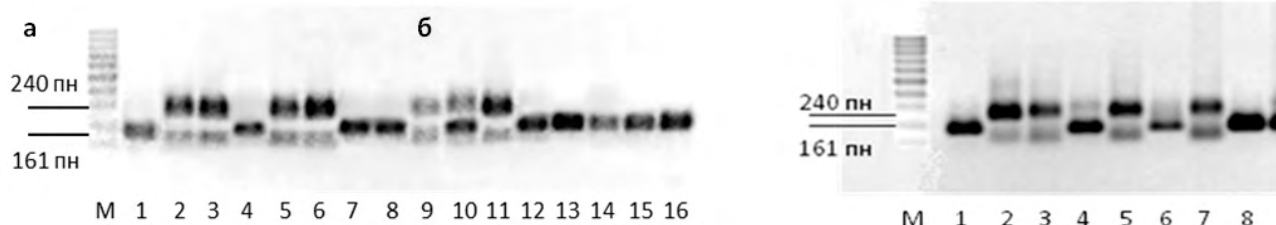


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов амплификации маркера ORS511.

а) F_2 (ВИР 365 \times RIL 130): 1 – RIL 130, 2 – ВИР 365, 3–16 – растения F_2 ;
б) ВИР 111А \times (ВИР 365 \times RIL 130): 1 – RIL 130, 2 – ВИР 365, 3–8 – гибридные растения,
М – маркер молекулярного веса ДНК

Fig. 1. Electrophoregrams of the marker ORS511 amplification products.

а) F_2 (VIR 365 \times RIL 13), 1 – RIL 130, 2 – VIR 365, 3–16 – F_2 plants;
б) VIR 111А \times (VIR 365 \times RIL 130): 1 – RIL 130, 2 – VIR 365, 3–8 – hybrid plants,
M – DNA molecular weight marker

Таблица 1. Наследование аллелей микросателлитного локуса ORS511 в гибридных популяциях F₂ (ВИР 365 × RIL 130) и ВИР 111А × (ВИР 365 × RIL 130)

Table 1. Inheritance of alleles of the microsatellite locus ORS511 in hybrid F₂ populations (VIR 365 × RIL 130) and VIR 111A × (VIR 365 × RIL 130)

Гибрид Hybrid	Число растений с аллелями Number of plants with alleles		Ожидаемое соотношение Expected ratio	χ^2	p
	159 пн	161, 240 пн			
F ₂ (ВИР 365 × RIL 130)	44	17	3 : 1	0,27	> 0,05
ВИР 111А × (ВИР 365 × RIL 130)	19	23	1 : 1	0,38	> 0,05

Для уточнения структуры изучаемых аллелей ORS224 и ORS511, амплифицированные фрагменты из отдельных генотипов выделяли из геля, клонировали и секвенировали. Полиморфизм нуклеотидных последовательностей аллельных вариантов локуса ORS224 изучали у линий ВИР 376 и ВИР 740. Согласно литературным данным, аллель микросателлитного локуса ORS224 длиной 136 пн имеет структуру (GA)₈N₂(GA)₁₃ (Tang et al.,

2002). Варианты маркерного фрагмента ORS224 отличались по структуре и длине у изученных генотипов (рис. 2). У линии ВИР 740 последовательность ORS224 длиной 127 пн включала 20 динуклеотидов GA, а вариантный аллель линии ВИР 376 имел длину 113 пн, содержал 13 повторов GA и отличался от стандартного наличием делеции семи динуклеотидов GA в позиции 90 от начала фрагмента.



Рис. 2. Выравнивание нуклеотидных последовательностей аллельных вариантов микросателлитного локуса ORS224 линий ВИР 376 и ВИР 740

Fig. 2. Alignment of nucleotide sequences of the microsatellite locus ORS224 allelic variants from lines VIR 376 and VIR 740

Полиморфизм аллельных вариантов маркера ORS511 изучали у линий ВИР 740, ВИР 376, ВИР 210 и ВИР 370. Согласно ранее полученным оценкам, для линий ВИР 740 и ВИР 376 характерен типичный аллель ORS511 длиной около 158 пн. У линий ВИР 210, ВИР 370 и ВИР 130 Б выявлены отличающиеся по длине варианты маркера ORS511. Длина фрагмента у линии ВИР 210 составила 210-214 пн, у ВИР 370 – 244 пн, а у линии ВИР 130 Б – 198 пн (Karabitsina et al., 2016). Результаты анализа клонированных и секвенированных фрагментов показали, что полиморфные аллели локуса ORS511 у разных генотипов различаются не только по числу динуклеотидных мотивов AT и GT, но также по наличию вставки пяти

нуклеотидов G внутри микросателлита и однонуклеотидных замен во фланкирующих последовательностях у линий ВИР 370 и ВИР 210 (рис. 3). У отдельных растений линий ВИР 740 и ВИР 376 наблюдали гетерогенность ампликонов ORS511: у линии ВИР 740 присутствовали варианты 154 пн и 158 пн, а у линии ВИР 376 – 156 и 158 пн. Такие различия могли быть обусловлены специфической ошибкой амплификации (проскальзыванием матричной цепи). Внутрелинейный полиморфизм микросателлитных маркеров, а также наличие дублированных локусов, наблюдали и другие исследователи (Paniego et al., 2002). У линий ВИР 210 и ВИР 370 обнаружены транзигция (T→C) в пределах повторяющегося мотива AT,

Таблица 2. Нуклеотидный полиморфизм типичного и уникальных аллелей локуса ORS511
Table 2. Nucleotide polymorphism of typical and unique alleles of the microsatellite locus ORS511

Линия Line	Число повторяющихся единиц Number of repeat units		Длина фрагмента, пн Fragment length, bp	Наличие вставки 5G Presence of 5G insertion	Наличие SNP во фланкирующих последовательностях Presence of SNPs in flanking sequences
	AT	GT			
ВИР 740	7, 10	10, 11	154, 158	-	-
ВИР 376	9	10, 11	156, 158	-	-
ВИР 210	12, 13 + AC	16, 17	183	+	+
ВИР 370	13 + AC	16, 17	181, 183	+	+

У разных генотипов выборки наблюдали два варианта отличающихся по длине продуктов амплификации с парой праймеров HA4011: размером 200 пн и 240 пн. Согласно ранее опубликованным данным (Şahin et al., 2018), маркерный фрагмент гена устойчивости *P18* имеет размер 240 пн, тогда как у генотипов, не имеющих аллеля устойчивости, длина фрагмента составляет 200 пн. Так, у сте-

рильной линии ВИР 116А амплифицированный фрагмент HA4011 имел длину 200 пн, а у фертильных линий ВИР 740, ВИР 210, ВИР 365 и ВИР 558 — около 240 пн. Результаты анализа полиморфизма нуклеотидных последовательностей аллельных вариантов HA4011 показали, что отличия по длине двух аллельных вариантов обусловлены инделями длиной 80 пн, 47 пн и 4 пн (рис. 4).

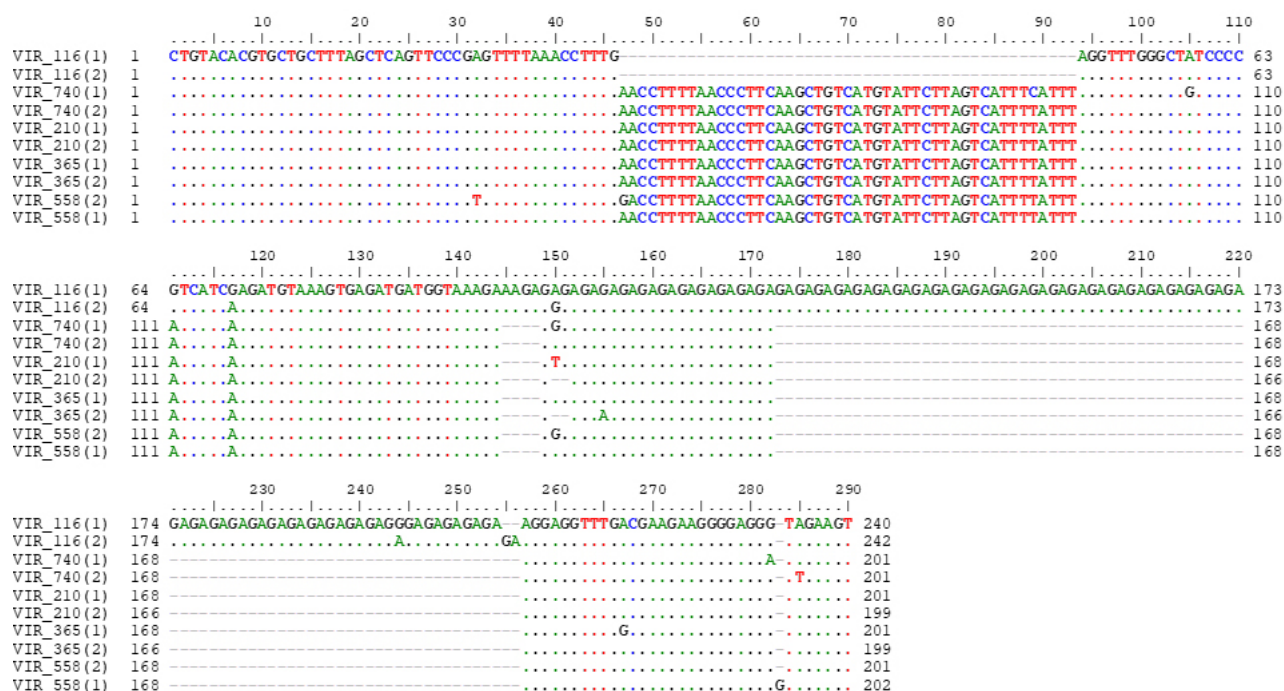


Рис. 4. Выравнивание нуклеотидных последовательностей аллельных вариантов микросателлитного локуса HA4011 линий ВИР 116А, ВИР 740, ВИР 210, ВИР 365 и ВИР 558

Fig. 4. Alignment of nucleotide sequences of the microsatellite locus HA4011 allelic variants from lines VIR 116A, VIR 740, VIR 210, VIR 365 and VIR 558

Полученные результаты свидетельствуют о том, что все три изученных микросателлитных локуса имеют в своей структуре повторяющиеся динуклеотидные мотивы: ORS224 и HA4011 – мотив GA, ORS511 – два мотива (AT и GT). Эти данные согласуются с наблюдениями Н. Паньего с соавторами (Paniego et al., 2002), показавших, что в геноме *H. annuus* преобладают микросателлитные мотивы (GA)_n, (GT)_n, (AT)_n, тогда как (ATT)_n, (TGG)_n, и (ATC)_n, а также тетра nukлеотид (CATA)_n встречаются значительно реже. Заслуживает внимания наличие точковой мутации в пределах повторяющегося мотива микросателлита ORS511 у линий ВИР 210 и ВИР 370, а также вставки из пяти нуклеотидов G в повторяющейся области у этих линий. Как следует из литературных источников, частота мутирования в микросателлитных локусах в 10-100000 раз выше, чем в других областях генома, но мутации в микросателлитах преимущественно связаны с изменением числа повторяемых мотивов, а не с точковыми мутациями (Galinskaya et al., 2019). Микросателлиты ORS224 и ORS511 характеризовались вариабельностью по длине за счет изменения числа повторов, тогда как варианты последовательности в локусе HA4011 длиной 200 пн и 240 пн различались наличием вставок/делеций по всей длине исследованного фрагмента.

Отсутствие фрагмента («нулевой» аллель) в ПЦР с парами праймеров ORS224 и ORS511 наблюдалось у стерильных линий с ЦМС PET1-типа и фертильных линий-закрепителей стерильности, то есть у рецессивных гомозигот по локусу *Rfl*. Кроме того, такие аллели наблюдали и у отдельных линий-восстановителей фертильности (Karabitsina et al., 2016). Согласно данным из литературных источников, «нулевые» аллели негативно сказываются на оценке результатов популяционно-генетических исследований. Наиболее вероятной причиной «нулевых» аллелей микросателлитных локусов считается недостаточно эффективный отжиг праймеров вследствие мутаций во фланкирующих последовательностях, в частности, на 3'-конце сайта праймирования (Dakin, Avise, 2004).

Заключение

У представителей репрезентативной выборки, включающей 84 линии генетической коллекции ВИР различного происхождения, описаны и детально охарактеризованы полиморфные аллели SSR-локусов ORS224 и ORS511, сцепленных с геном *Rfl*, а также локуса HA4011, ассоциированного с геном *Pl8*, относящимся к сложному кластеру *Pl5/Pl8*. Уникальные варианты маркера ORS224 выявлены у четырех линий, уникальные аллели ORS511 характерны для 11,9% изученных линий. Они отличаются от часто встречающихся аллельных вариантов по длине и числу повторяющихся единиц, наличию инделей и нуклеотидных замен. Охарактеризованные в работе уникальные аллели микросателлитных

локусов свидетельствуют об уникальности генетической коллекции подсолнечника и могут быть использованы как маркерные признаки при паспортизации отдельных линий.

References / Литература

- Anashchenko A.V. The chemical castration of sunflower plants. *Doklady Vsesoyuznoi Akademii Sel'skokhozyaystvennykh Nauk imeni V.I. Lenina = Reports of the All-Union Academy of Agricultural Sciences named after V.I. Lenin*. 1967(2):17-18. [in Russian] (Анащенко А.В. Химическая кастрация подсолнечника. *Доклады Всесоюзной академии сельскохозяйственных наук имени В.И. Ленина*. 1967(2):17-18).
- Alpatieva N.V., Antonova O.Yu., Radchenko E.E., Abdullaev R.A., Karabitsina Y.I., Anisimova I.N. PCR diagnostics for harmful organisms of guar: (guidelines). E. K. Potokina (ed.). St. Petersburg: VIR; 2019. [in Russian] (Алпатьева Н.В., Антонова О.Ю., Радченко Е.Е., Абдуллаев Р.А., Карабицина Ю.И., Анисимова И.Н. ПЦР-диагностика вредных организмов гуара: (методические указания) / под ред. Е.К. Потокиной. Санкт-Петербург: ВИР; 2019). DOI: 10.30901/978-5-907145-44-3
- Anisimova I.N., Karabitsina Yu.I., Alpatieva N.V., Kusnetsova E.B., Titov N.V., Lyutko A.Yu., Gavrilova V.A. Diagnostic value of *Rfl* gene molecular markers in sunflower. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2021;4(2):28-37. [in Russian]. (Анисимова И.Н., Карабицина Ю.И., Алпатьева Н.В., Кузнецова Е.Б., Титов Н.В., Лютко А.Ю., Гаврилова В.А. Диагностическая ценность молекулярных маркеров гена *Rfl* подсолнечника. *Биотехнология и селекция растений*. 2021;4(2):28-37). DOI: 10.30901/2658-6266-2021-2-03
- Antonova T.S., Ivebor M.V., Rozhkova V.T., Araslanova N.P., Gavrilova V.A. Results of evaluation of accessions from the VIR sunflower collection for resistance to downy mildew strains spread in the Krasnodar Territory. *Bulletin of Applied Botany, of Genetics, and Plant Breeding*. 2011;167:90-95. [in Russian] (Антонова Т.С., Ивебор М.В., Рожкова В.Т., Арасланова Н.М., Гаврилова В.А. Результаты оценки образцов подсолнечника коллекции ВИР на устойчивость к расам возбудителя ложной мучнистой росы, распространенным в Краснодарском крае. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2011;167:90-95).
- Arias D.M., Rieseberg L.H. Genetic relationship among domesticated and wild sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Economic Botany*. 1995;49:239-248.
- Baute G.J., Kane N.C., Grassa C.J., Lai Z., Rieseberg L.H. Genome scans reveal candidate domestication and improvement genes in cultivated sunflower, as well as post-domestication introgression with wild relatives. *New Phytologist*. 2015;206:830-838. DOI: 10.1111/nph.13255
- Berry S.T., Leon A.J., Hanfrey C.C., Challis P., Burkholz A., Barnes S.J., Rufener G.K., Lee M., Caligari P.D.S. Molecular-marker analysis of *Helianthus annuus* L. II. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*. 1995;91:195-199. DOI: 10.1007/BF00220877
- Bochkovoy A.D., Khatnyansky V.I., Kamardin V.A. Types of sunflower hybrids and features of their use in conditions of the Russian Federation (review). *Oil Crops*. 2019;1(177):110-123. [in Russian] (Бочковой А.Д., Хатнянский В.И., Камардин В.А. Типы гибридов подсолнечника и особенности их использования в условиях Российской Федерации. *Масличные культуры*. 2019;1(177):110-123. DOI: 10.25230/2412-608X-2019-1-177-110-123
- Bulos M., Ramos M.L., Altieri E., Sala C.A. Molecular mapping of a sunflower rust resistance gene from HAR6. *Breeding Science*. 2013;63(1):141-146. DOI: 10.1270/jsbbs.63.141
- Cheres M.T., Knapp S. Ancestral origins and genetic diversity of cultivated sunflower: coancestry analysis of public germplasm. *Crop Science*. 1998;38:1476-1482. DOI: 10.2135/cropsci1998.001183X003800060012x
- Dakin E.E., Avise J.C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*. 2004;93(5):504-509. DOI: 10.1038/sj.hdy.6800545
- Darvishzadeh R., Azizi M., Hatami-Maleki H., Bernousi I., Abdolla-

- hi Mandoulakani B., Jafari M., Sarrafi A. Molecular characterization and similarity relationships among sunflower (*Helianthus annuus* L.) inbred lines using some mapped simple sequence repeats. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9(43):7280-7288. DOI: 10.5897/AJB10.902
- Dimitrijević A., Imerovski I., Miladinović D., Tančić S., Dušanić N., Jocić S., Miklič V. Use of SSR markers in identification of sunflower isogenic lines in late generations of backcrossing. *Helia*. 2010;33(53):191-198. DOI: 10.2298/HEL1053191D
- Duca M., Port A., Šestacova T., Siniauskaya M., Aksyonova E., Davydenko O. Microsatellite marker application in sunflower (*Helianthus annuus* L.) fingerprinting. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 2013;27(3):3772-3775. DOI: 10.5504/BBEQ.2013.0021
- Filippi C.V., Aguirre N., Rivas J.G., Zubrzycki J., Puebla A., Cordes D., Moreno M.V., Fusari C.M., Alvarez D., Heinz R.A., Hopp H.E., Paniego N.B., Lia V.V. Population structure and genetic diversity characterization of a sunflower association mapping population using SSR and SNP markers. *BMC Plant Biology*. 2015;15:52. DOI: 10.1186/s12870-014-0360-x
- Filippi C.V., Gabriela A., Merino G.A., Montecchia J.F., Aguirre N.C., Rivarola M., Naamati G., Fass M.J., Álvarez D., Rienzo J.D., Heinz R.A., Moreira B.C., Lia V.V., Paniego N.B. Genetic diversity, population structure and linkage disequilibrium assessment among international sunflower breeding collections. *Genes*. 2020;11:283. DOI: 10.3390/genes11030283
- Galinskaya T.V., Schepetov D.M., Lysenkov S.N. Prejudices against microsatellite studies and how to resist them. *Russian Journal of Genetics*. 2019;55(6):657-671. DOI: 10.1134/S1022795419060048
- Garayalde A.F., Poverene M., Cantamutto M., Carrera A.D. Wild sunflower diversity in Argentina revealed by ISSR and SSR markers: an approach for conservation and breeding programmes. *Annals of Applied Botany*. 2011;158(3):305-317. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2011.00465.x
- Gavrilova V.A., Rozhkova V.T. Donors of Pollen Fertility Restoration of Sunflower CMS Lines for Heterosis Breeding. In: *Identified plant gene pool and breeding*. St. Petersburg: VIR; 2005. p.377-379. [in Russian] (Гаврилова В.А., Рожкова В.Т. Доноры восстановления фертильности пыльцы линий ЦМС подсолнечника для гетерозисной селекции. В кн.: *Идентифицированный генофонд растений и селекция*. Санкт-Петербург: ВИР, 2005. С.377-379).
- Gavrilova V.A., Rozhkova V.T., Anisimova I.N. Sunflower genetic collection at the Vavilov Institute of Plant Industry. *Helia*. 2014;37(60):1-16. DOI: 10.1515/helia-2014-0001
- Gentzbittel L., Vear F., Zhang Y.-X., Berville A., Nicolas P. Development of a consensus linkage RFLP map for cultivated sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*. 1995;90:1079-1086.
- Hongtrakul V., Huestis G.M., Knapp S. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics*. 1997;95(3):400-407. DOI: 10.1007/s001220050576
- Horn R., Kusterer B., Lazarescu E., Prüfe M., Friedt W. Molecular mapping of the *Rfl* gene restoring fertility in PET1-based F1 hybrids in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2003;106(4):599-606. DOI: 10.1007/s00122-002-1078-y
- Imerovski I., Dimitrijević A., Miladinović D., Jocić S., Dedić B., Cvejić S., Surlan-Momirović G. Identification and validation of breeder-friendly DNA markers for *Plarg* gene in sunflower. *Molecular Breeding*. 2014;34(3):779-788. DOI: 10.1007/s11032-014-0074-7
- Leclercq P. Une sterilité cytoplasmique chez le tournesol. *Annales de l'Amélioration des Plantes*. 1969;19(2):99-106. [in French]
- Li J.T., Yang J., Chen D.C., Zhang X.L., Tang Z.S. An optimized mini-preparation method to obtain high-quality genomic DNA from mature leaves of sunflower. *Genetics and Molecular Research*. 2007;6(4):1064-1071.
- Karabitsina Yu.I., Anisimova I.N., Gavrilova V.A., Alpatieva N.V., Pinaev A.G., Kuznetsova E.B., Rozhkova V.T. Molecular marking of sunflower lines with different ability to suppression of the cytoplasmic male sterility phenotype. *Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2016;177(2):99-107. [in Russian] (Карабицина Ю.И., Анисимова И.Н., Гаврилова В.А., Алпатиева Н.В., Пинаев А.Г., Кузнецова Е.Б., Рожкова В.Т. Молекулярное маркирование линий подсолнечника, различающихся по способности к супрессии фенотипа цитоплазматической мужской стерильности. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2016;177(2):99-107). DOI: 10.30901/2227-8834-2016-2-99-107
- Markin N.V., Usatenko T.V., Usatov A.V., Tikhobaeva V.E., Gorbachenko O.F., Kulishova G.A., Azarin K.V. Informative DNA markers of gene *Rfl* – pollen fertility restorer CMS PET1 in sunflower. *Modern Problems of Science and Education*. 2013;(4):110-122. [in Russian] (Маркин Н.В. Усатенко Т.В., Усатов А.В., Тихобаева В.Е., Горбаченко О.Ф., Кулишова Г.А., Азарин К.В. Определение информативных ДНК-маркеров гена *Rfl* – восстановителя фертильности пыльцы ЦМС PET1 подсолнечника. *Современные проблемы науки и образования*. 2013;(4):110-122).
- Markin N., Usatov A., Makarenko M., Azarin K., Gorbachenko O., Kolokolova N., Usatenko T., Markina O., Gavrilova V. Study of informative DNA markers of the *Rfl* gene in sunflower for breeding practice. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. 2017;53(2):69-75. DOI: 10.17221/108/2016-CJGPB
- Mwangi E.W., Marzougui S., Sung J.S., Bwalya E.C., Choi Y.-M., Lee M.-C. Assessment of genetic diversity and population structure on Kenyan sunflower (*Helianthus annuus* L.) breeding lines by SSR markers. *Korean Journal of Plant Resources*. 2019;32(3):244-253. DOI: 10.7732/kjpr.2019.32.3.244
- Paniego N., Echaide M., Munoz M., Fernandez L., Torales S., Faccio P., Fuxan I., Carrera M., Zandomeni R., Suarez E.Y., Hopp H.E. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome*. 2002;45(1):34-43. DOI: 10.1139/g01-120
- Rozhkova V.T., Anashchenko A.V. Creation of self-pollinated lines and heterotic hybrids of sunflower on the basis of global collection. *Research Bulletin of the N.I. Vavilov Institute of Plant Industry*. 1977;69:53-55. [in Russian] (Рожкова В.Т., Анащенко А.В. Создание самоопыленных линий и гетерозисных гибридов подсолнечника на материале мировой коллекции. *Научно-технический бюллетень Всесоюзного научно-исследовательского института растениеводства им. Н.И. Вавилова*. 1977;69:53-55).
- Şahin E., Kalenderoğlu A., Aydın Y., Evci G., Uncuoğlu A. SSR markers suitable for marker assisted selection in sunflower for downy mildew resistance. *Open Life Sciences*. 2018;13(1):319-326. DOI: 10.1515/biol-2018-0039
- Solodenko A.Ye., Fait V.I. Identification of sunflower hybrids with markers of resistance to downy mildew gene *Plarg*. *Fiziologiya rastenij i genetika = Plant Physiology and Genetics*. 2017;49(6):506-512. [in Ukrainian] (Солоденко А.Е., Файт В.І., Ідентифікація генотипів соняшника гібридного походження за маркерами гена *PLARG* стійкості до несправжньої борошнистої роси. *Фізіологія рослин і генетика*. 2017;49(6):506-512). DOI: 10.15407/frg2017.06.506
- Sujatha M., Prabakaran A.J., Dwivedi S.L., Chandra S. Cytomorphological and molecular diversity in backcross-derived inbred lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome*. 2008;51(4):282-293. DOI: 10.1139/G08-008
- Tang S., Yu J.K., Slabaugh M.B., Shintani K., Knapp J. Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theoretical and Applied Genetics*. 2002;105:1124-1136. DOI: 10.1007/s00122-002-0989-y
- Wieckhorst S., Bachlava E., Dušle C.M., Tang S., Gao W., Saski C., Bauer E. Fine mapping of the sunflower resistance locus *Plarg* introduced from the wild species *Helianthus argophyllus*. *Theoretical and Applied Genetics*. 2010;121(8):1633-1644. DOI: 10.1007/s00122-010-1416-4
- Yue B., Vick B.A., Cai X., Hu J. Genetic mapping for the *Rfl* (fertility restoration) gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by SSR and TRAP markers. *Plant Breeding*. 2010;129(1):24-28. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2009.01661.x
- Zia Z.U., Sadaqat H.A., Tahir M.H.N., Sadia B., Bushman B.S., Hole D., Michaels L., Malik W. Estimation of genetic diversity using SSR markers in sunflower. *Russian Journal of Genetics*. 2014;50:498-507. DOI: 10.7868/s0016675814050142