

УДК 633.521:631.527

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2020-340-7-80-83>Тип статьи: Оригинальное исследование
Type of article: Original research**Базанов Т.А.,
Ущановский И.В.,
Логинова Н.Н.,
Смирнова Е.В.,
Михайлова П.Д.**

ФГБНУ Федеральный научный центр лубяных культур

170041, Россия, г. Тверь, Комсомольский проспект, 17/56

E-mail: t.bazanov@fncl.ru

Ключевые слова: лен масличный, молекулярные маркеры, ПЦР, генетическая паспортизация, селекция.**Для цитирования:** Базанов Т.А., Ущановский И.В., Логинова Н.Н., Смирнова Е.В., Михайлова П.Д. Формирование системы генетической паспортизации масличного льна. *Аграрная наука*. 2020; 340 (7): 80–83.<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2020-340-7-80-83>**Конфликт интересов отсутствует****Taras A. Bazanov,
Igor V. Uschapovsky,
Natalya N. Loginova,
Ekaterina V. Smirnova,
Polina D. Mikhailova**FSBSI Federal Scientific Center for Bast Crops
17/56, Komsomolsky prospect, Tver, 170041,
Russia

E-mail: t.bazanov@fncl.ru

Key words: linseed, molecular markers, PCR, genetic certification, selection.**For citation:** Bazanov T.A., Uschapovsky I.V., Loginova N.N., Smirnova E.V., Mikhailova P.D. Formation of a system of genetic certification of linseed. *Agrarian Science*. 2020; 340 (7): 80–83. (In Russ.)<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2020-340-7-8-83>**There is no conflict of interests**

Формирование системы генетической паспортизации масличного льна

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Изучение генетического разнообразия масличного льна и четкая идентификация сортов этой культуры является важной частью селекционной работы. ДНК-маркирование, в том числе применение микросателлитных SSR-маркеров, представляется как наиболее эффективный способ для анализа генетического полиморфизма и повышения результативности селекции. Целью данной работы стало изучение полиморфизма ряда современных сортов льна масличного и разработка их генетического паспорта.

Материалы и методы. Объектом исследования стали 22 сорта льна масличного, включенных в Госреестр, различного селекционного происхождения. Генетический анализ проводился методом ПЦР с использованием линейки из 11 SSR-маркеров, разработанных и синтезированных компанией ООО «НПФ Синтол», с последующей детекцией продуктов на генетическом анализаторе.

Результаты. В изучаемой выборке было определено 46 аллелей. Каждый образец льна содержал свойственный только ему набор аллелей. Применение буквенно-цифрового кода для SSR-маркеров позволило сформировать генетические паспорта для каждого изученного сорта. Это позволит проводить точное генотипирование морфологически сложно различимых образцов, что показывает возможность проведения паспортизации всех сортов льна, включенных в Государственный реестр селекционных достижений РФ. Кластерный анализ с построением дендрограммы генетического подобию выявил различия изученных образцов. Сорта исследованных образцов распределились на три обособленных группы, две из которых характеризуются происхождением по оригинатору и родственными связям между ними, сорта третьей группы представляют собой результаты селекционной работы с использованием образцов различного географического происхождения.

Formation of a system of genetic certification of linseed

ABSTRACT

Relevance. The study of the genetic diversity of linseed and the clear identification of cultivars of this crop is an important part of breeding work. DNA marking, including the use of microsatellite SSR markers, is considered to be the most effective method for analyzing genetic polymorphism and improving the efficiency of selection. The purpose of this work was to study the polymorphism of a number of modern cultivars of linseed and develop their genetic passport. Materials and methods. The object of research was 22 varieties of oilseed flax included in the state register, of various breeding origin. The genetic analysis was performed by PCR using a line of 11 SSR markers developed and synthesized by "Syntol" LLC, with subsequent detection of products on a genetic analyzer.

Results. In the study sample, 46 alleles were identified. Each sample contained a unique set of alleles. The use of alphanumeric code for SSR markers allowed the formation of genetic passports for each studied cultivar. This will allow accurate genotyping of morphologically difficult to distinguish samples, which shows the possibility of certification of all flax cultivars included in the State register of breeding achievements of the Russian Federation. Cluster analysis with the construction of a dendrogram of genetic similarity revealed differences in the studied samples. Cultivars of the studied samples were divided into three separate groups, two of which are characterized by origin and relationships between them, the third group of cultivars are the results of selection work using samples of different geographical origin.

Поступила: 16 июля
После доработки: 30 июля
Принята к публикации: 31 июляReceived: 16 July
Revised: 30 July
Accepted: 31 July

Введение

Лен по праву считается одной из наиболее важных сельскохозяйственных культур, которая является источником различного сырья (волокно, масло) во всем мире. Благодаря уникальному составу и свойствам масла культура масличного льна возделывается на всех континентах на площади около 3 млн га [1].

Широкое использование льна масличного приводит к необходимости создания новых сортов для различных сфер применения и высокой адаптивности к условиям возделывания [2]. В связи с этим большое значение приобретает пребридинговый этап исследования культуры, включающий изучение и поиск новых источников генетического материала [3]. Лен не обладает высоким уровнем генетического полиморфизма, что сдерживает традиционный селекционный процесс [4].

В настоящее время для оптимизации этапов селекционного процесса и повышения эффективности отбора наиболее рациональным считается использование высокоточных и надежных молекулярно-генетических методов [5]. ДНК-идентификация сортов может регулировать защиту авторских прав селекционных учреждений и контролировать чистоту сортов. Используемые UPOV методы идентификации сортов сельскохозяйственных растений основаны на оценке морфологических признаков. При создании все большего количества новых сортов этого становится недостаточно. Затруднения, связанные с использованием морфологических признаков, создают необходимость поиска новых, более надежных методов идентификации сортов растений. Поиск и применение молекулярных маркеров в идентификации сортов рекомендуется для видов растений со слабыми межсортными различиями, к числу которых принадлежит лен [6].

Наиболее эффективными ДНК-маркерами являются микросателлитные, или SSR (Simple Sequence Repeats). Полученные с помощью ДНК-маркеров данные можно использовать для подбора родительских форм, генотипирования сортов и линий, идентификации ценных генотипов, а также для маркирования отдельных генов и локусов растений [7].

Создание системы идентификации сортов льна с использованием микросателлитных маркеров является актуальной научной задачей и имеет практическое значение для паспортизации сортов, защиты прав селекционеров и семеноводческого процесса [8]. Целью работы стало изучение полиморфизма ряда современных сортов льна масличного с использованием SSR-маркеров и разработка их генетического паспорта.

Материалы и методы

В качестве материала для исследований было использовано 22 сорта льна масличного различного географического происхождения, включенных в Государственный реестр селекционных достижений Российской Федерации: сорта «Август», «Бирюза», «ВНИИМК 620», «ВНИИМК 620 ФН», «ВНИИМК 630», «Даник», «Исилькульский», «Небесный», «Нилин», «Радуга», «Ручеек», «РФН», «Светлячок», «Северный»,

«Сокол», «Флиз», «Ы-117» (оригинатор ФГБНУ ВНИИМК им. Пустовойтова, Краснодар), «Исток» и «ЛМ 98» (оригинатор ФГБНУ ФНЦ ЛК, Тверь), «Кинельский 2000» (оригинатор ФГБНУ СФИЦ РАН, Самара), «Илим» (оригинатор РУП «Институт льна», Беларусь), «Чибис» (оригинатор Баранник В.А., Белгород).

Для генетического исследования применяли линейку из 11 пар праймеров, меченых флюоресцентными красителями, разработанными и произведенными ООО «НПФ Синтол» (Россия). Объединенную ДНК выделяли с помощью модифицированного СТАВ-метода из листьев четырех растений каждого сорта, выращенных в течение 4 недель. Реакционная смесь ПЦР объемом 25 мкл содержала: 20 нг исследуемой ДНК, 2,5 мкМ MgCl₂, 200 мкМ dNTP, по 0,25 мкМ прямого и обратного праймера и 1 единицу Taq-полимеразы. Амплификация проводилась на термоциклере T100 MyCycler™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Условия реакции: начальная денатурация 5 мин при 94 °С; далее 25 циклов: денатурация при 94 °С — 30 с, отжиг в течение — 45 с (температуру подбирали в зависимости от праймеров), элонгация при 72 °С — 40 с; терминальная элонгация — 5 мин 72 °С.

Продукты амплификации денатурировали формамидом и разделяли на генетическом анализаторе НАНО-ФОР 05 (ООО «НПФ Синтол»). Определение размеров аллелей осуществляли при помощи программного обеспечения «ДНК-ФА» (ООО «НПФ Синтол»). Для оценки полиморфизма микросателлитных локусов использован индекс PIC (Polymorphic Index Content) [9]:

$$PIC = 1 - \sum(P_i^2), \quad (1)$$

где P_i — частота i -аллели, определенной в данном массиве. Для построения дендрограммы генетического подобиya использовали программное обеспечение DARwin v. 6 (DARwin software).

Результаты

В результате исследования были получены данные по полиморфизму изученных сортов масличного льна. В таблице 1 приведены данные, отражающие количество и диапазон размера аллелей с расчетными показателями уровня полиморфизма.

Таблица 1. Характеристика полиморфных SSR-локусов льна масличного

Table 1. Characterization of polymorphic SSR loci in linseed

SSR-маркер	Диапазон полученных аллелей	Число аллелей	PIC
Lin1	323–330	2	0,09
Lin2	425–437	3	0,56
Lin3	194–216	3	0,57
Lin4	307–316	4	0,60
Lin5	406–419	2	0,13
Lin6	164–195	3	0,54
Lin7	379–388	3	0,60
Lin8	117–153	4	0,37
Lin9	288–292	4	0,62
Lin10	234–270	9	0,85
Lin11	163–181	9	0,78
Среднее на локус	4,18	0,52	

В выборке из 22 сортов было определено 46 аллелей размером от 117 до 437 пар нуклеотидов. Среднее число аллелей на локус составило 4,18. Показатель информационного содержания (PIC) составил в среднем 0,52 на локус. Полученные параметры достаточно высоки, что характеризует использованную систему маркеров как эффективную для решения задач по генетической идентификации масличного льна.

При формировании генетических паспортов изученных сортов был применен буквенно-цифровой метод, когда каждому SSR-маркеру присваивается буква латинского алфавита, а подстрочным индексом к букве записываются размеры аллелей (табл. 2). Примененная система SSR-маркеров позволяет отличить генотипы льна масличного друг от друга на молекулярном уровне.

По результатам исследования данной выборки был выполнен кластерный анализ. С использованием метода «neighbor joining method» [10] была построена дендрограмма генетического подобия между изученными образцами (Рисунок 1 (синим цветом выделены сорта селекции ВНИИМК, красным — остальных оригинаторов)).

Исследованные сорта распределились по трем кластерам. В первый кластер вошли три родственных сорта селекции ВНИИМК (сорта Небесный и Сокол происходят от различных комбинаций с сортом Союз, сорт Радуга получен из гибридной комбинации с сортом Небесный). Второй кластер представляет собой однородную группу десяти сортов селекции ВНИИМК. В ней также прослеживаются родственные связи, подтверждаемые из публикаций селекционеров [11,12]: сорт ВНИИМК 620 ФН выведен методом индивидуального отбора из ВНИИМК 620, который также участвовал в создании сорта Даник. Сорт РФН получен методом индивидуального отбора из сорта Ручеек. Несколько обособленно в этой группе держится старый сорт Северный, полученный при скрещивании с сортом из Марокко. Третий кластер представляет собой группу из четырех сортов селекции ВНИИМК и пяти сортов других оригинаторов. Сорта данной группы представляют собой результаты селекционной работы по скрещиванию и многократному индивидуальному отбору из линий и образцов различного географического происхождения (США, Канада, Казахстан, Россия).

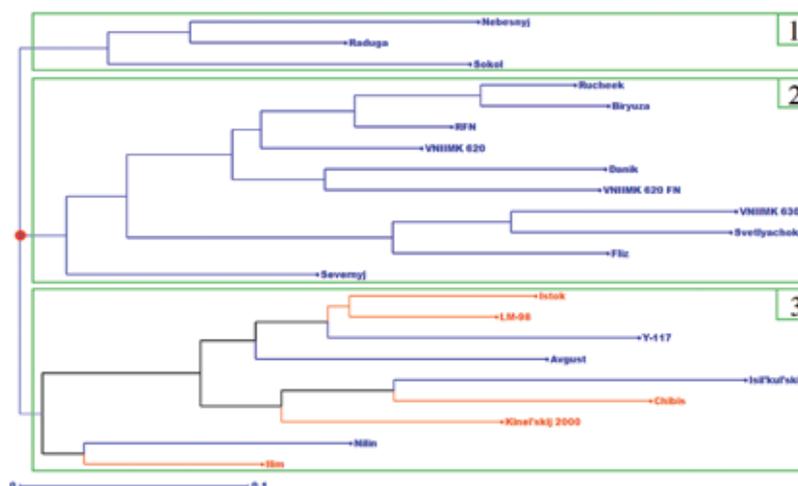
Таблица 2. Идентификация сортов льна масличного

Table 2. Identification of linseed cultivars

Сорт льна	Генетический паспорт
Август	A ₃₂₃ B _{425,437} C ₂₁₆ D ₃₀₇ E ₄₁₉ F _{164,192} G ₃₈₁ H ₁₅₃ I ₂₈₉ J _{251,264} K _{171,179}
Бирюза	A ₃₂₃ B _{425,437} C ₁₉₄ D ₃₁₂ E ₄₁₉ F _{164,192} G ₃₇₉ H _{117,153} I ₂₉₁ J _{254,267} K _{171,179}
ВНИИМК 620	A ₃₂₃ B _{425,437} C _{194,216} D ₃₁₂ E ₄₁₉ F _{164,192} G ₃₇₉ H ₁₅₃ I ₂₉₂ J _{254,267} K _{172,179}
ВНИИМК 620 ФН	A _{323,330} B _{425,437} C ₁₉₄ D ₃₁₂ E ₄₁₉ F _{164,192} G ₃₇₉ H ₁₅₃ I ₂₉₂ J _{251,264} K _{172,179}
ВНИИМК 630	A ₃₂₃ B _{425,437} C ₂₁₆ D ₃₁₆ E ₄₁₉ F _{164,192} G ₃₇₉ H _{117,149} I ₂₉₁ J _{254,267} K _{166,173}
Даник	A ₃₂₃ B _{425,437} C ₁₉₄ D ₃₁₂ E ₄₁₉ F _{164,192} G _{379,388} H ₁₅₃ I ₂₉₂ J _{257,270} K ₁₇₉
Илим	A ₃₂₃ B _{425,437} C ₂₁₆ D ₃₀₇ E ₄₁₉ F _{164,192} G _{379,381} H ₁₅₃ I ₂₉₂ J _{246,267} K _{172,179}
Исилькульский	A ₃₂₃ B _{425,434} C _{194,216} D ₃₀₇ E ₄₀₆ F _{164,192} G ₃₈₁ H ₁₅₃ I ₂₉₁ J _{234,246} K _{172,181}
Исток	A ₃₂₃ B _{425,437} C _{207,216} D ₃₀₇ E ₄₁₉ F _{164,192} G ₃₈₁ H ₁₅₃ I ₂₉₂ J _{251,264} K _{163,173}
Кинельский 2000	A ₃₂₃ B _{425,437} C ₂₁₆ D ₃₀₇ E ₄₁₉ F _{164,192} G ₃₈₁ H ₁₅₃ I ₂₉₂ J _{246,264} K _{166,173}
ЛМ-98	A ₃₂₃ B _{425,437} C _{207,216} D ₃₀₇ E ₄₁₉ F _{164,192} G ₃₈₁ H ₁₅₃ I ₂₉₁ J _{251,264} K _{163,179}
Небесный	A ₃₂₃ B _{425,437} C _{194,216} D _{307,315} E ₄₁₉ F _{164,195} G _{379,388} H _{117,153} I ⁻ ₂₉₂ J _{261,270} K _{169,179}
Нилин	A ₃₂₃ B _{425,437} C ₂₁₆ D ₃₀₇ E ₄₁₉ F _{164,192} G _{379,381} H _{146,153} I _{288,291} J _{264,267} K _{172,179}
Радуга	A ₃₂₃ B _{425,437} C _{194,216} D ₃₀₇ E ₄₁₉ F _{164,195} G _{379,381} H _{117,153} I ₂₉₂ J _{257,270} K _{172,179}
Ручеек	A ₃₂₃ B _{425,437} C ₁₉₄ D ₃₁₂ E ₄₁₉ F _{164,192} G ₃₇₉ H ₁₅₃ I ₂₉₁ J _{267,270} K _{171,179}
РФН	A ₃₂₃ B _{425,437} C _{194,216} D ₃₁₂ E ₄₁₉ F _{164,192} G ₃₇₉ H ₁₅₃ I ₂₉₁ J _{254,267} K _{172,179}
Светлячок	A ₃₂₃ B _{425,437} C ₂₁₆ D ₃₁₆ E ₄₁₉ F _{164,192} G ₃₇₉ H _{117,153} I ₂₈₈ J _{254,267} K _{165,173}
Северный	A ₃₂₃ B _{425,437} C _{194,216} D _{307,312} E ₄₁₉ F _{164,192} G _{379,388} H ₁₅₃ I ₂₈₉ - ₂₉₁ J _{264,267} K _{172,179}
Сокол	A ₃₂₃ B _{425,434} C _{207,216} D ₃₀₇ E ₄₁₉ F _{164,192} G ₃₈₈ H _{117,153} I ₂₉₂ J _{261,270} K _{172,179}
Флиз	A ₃₂₃ B _{425,437} C _{194,216} D ₃₁₆ E ₄₁₉ F _{164,192} G ₃₇₉ H ₁₁₇ I ₂₉₁ J _{254,267} K _{172,179}
Чибис	A ₃₂₃ B _{425,434} C ₁₉₄ D ₃₀₇ E _{406,419} F _{164,192} G ₃₈₁ H ₁₅₃ I ₂₉₂ J _{246,264} K _{166,173}
Ы-117	A _{323,330} B _{425,437} C _{207,216} D ₃₀₇ E ₄₁₉ F _{164,192} G _{381,388} H ₁₅₃ I ₂₉₁ J _{251,264} K _{166,173}

Рис. 1. Дендрограмма генетического подобия сортов льна

Fig. 1. The dendrogram of genetic similarities among flax cultivars



Выводы

Использование оригинальной линейки из 11 SSR-маркеров позволило определить значительное генетическое разнообразие сортов масличного льна различных селекционных учреждений, включенных в Государственный реестр. Были составлены генетические паспорта изученных сортов, что может оказать помощь в охране прав селекционеров и в контроле за семено-

водством. Результаты кластерного анализа выявили наличие родственных связей между изученными сортами, что позволяет расширить применение данного метода в работе селекционеров и Госсортокомиссии и продолжить разработку системы генетической паспортизации культуры льна.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России по теме № 0477–2019–0023.

ЛИТЕРАТУРА

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, Вход свободный. – (дата обращения: 13.04.2020)
2. Андроник Е.Л., Маслинская М.Е., Иванова Е.В. Роль генофонда льна масличного в решении актуальных задач селекции, растениеводства и повышения качества жизни. *Сельскохозяйственный журнал*. 2014. С.4.
3. Cullis C.A. Genetics and genomics of linum. *Plant genetics and genomics: crops and models*, 2019;(23).
4. Егоров С. В., Порхунцова О. А. Изменчивость генотипов льна масличного по критериям внутренней полиморфности. *Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии*. 2019;(3):108–113.
5. Пороховинова Е.А., Шеленга Т.В., Матвеева Т.В. Полиморфизм генов, контролирующих низкое содержание линоленовой кислоты, у линий генетической коллекции льна ВИР. *Экологическая генетика*. 2019;17(2):5–19.
6. Ущачовский И.В., Лемеш В.А., Богданова М.В., Гузенко Е.В. Особенности селекции и перспективы применения молекулярно-генетических методов в генетико-селекционных исследованиях льна (*Linum usitatissimum* L.). *Сельскохозяйственная биология*. 2016;51(5):602–616.
7. Wu J. et al. Development of novel SSR markers for flax (*Linum usitatissimum* L.) using reduced-representation genome sequencing. *Frontiers in plant science*. 2017;(7):2018.
8. Базанов Т.А., Ущачовский И.В., Лемеш В.А., Богданова М.В., Лагуновская Е.В. Генетический полиморфизм современных сортов льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) российской селекции с использованием SSR-маркеров. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2019;180(4):81–87. DOI: 10.30901/2227-8834-2019-4-81-87
9. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 1973. P.3321–3323.
10. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987;4(4):406–425.
11. Росленконопля. Характеристика сортов льна масличного. [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <https://www.rosflaxhemp.ru/fakti-i-cifri/spravochnie-materiali.html/id/10>, Вход свободный. – (дата обращения: 14.07.2020)
12. Агроновости. Сорта и гибриды. [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <https://agro-bursa.ru/gazeta/sorta-gibridy/archive/>, Вход свободный. – (дата обращения: 14.07.2020)

ОБ АВТОРАХ:

Базанов Тарас Александрович, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник
Ущачовский Игорь Валентинович, кандидат биологических наук, заместитель директора по науке, заведующий лаб.
Логина Наталья Николаевна, научный сотрудник
Смирнова Екатерина Витальевна, младший научный сотрудник
Михайлова Полина Дмитриевна, младший научный сотрудник

REFERENCES

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [Electronic resource] - Electron. text data. - Access mode: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, Free admission. - (date of access: 13.04.2020)
2. Andronik E.L., Maslinskaya M.E., Ivanova E.V. The role of the oil flax gene pool in solving urgent problems of breeding, plant growing and improving the quality of life. *Agricultural magazine*. 2014. P.4. (In Russ.)
3. Cullis C.A. Genetics and genomics of linum. *Plant genetics and genomics: crops and models*, 2019;(23).
4. Egorov S.V., Porkhuntsova O.A. Variation of oil flax genotypes according to the criteria of internal polymorphism. *Bulletin of the Belarusian State Agricultural Academy*. 2019;(3):108–113. (In Russ.)
5. Porokhvinova E.A., Shelenga T.V., Matveeva T.V. Polymorphism of genes controlling the low content of linolenic acid in lines of the VIR flax genetic collection. *Environmental genetics*. 2019;17(2):5–19. (In Russ.)
6. Uschapovsky I.V., Lemesh V.A., Bogdanova M.V., Guzenko E.V. Features of breeding and prospects for the application of molecular genetic methods in genetic selection studies of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Agricultural biology*. 2016;51(5):602–616. (In Russ.)
7. Wu J. et al. Development of novel SSR markers for flax (*Linum usitatissimum* L.) using reduced-representation genome sequencing. *Frontiers in plant science*. 2017;(7):2018.
8. Bazanov T.A., Ushchapovsky I.V., Lemesh V.A., Bogdanova M.V., Lagunovskaya E.V. Genetic polymorphism of modern fiber flax (*Linum usitatissimum* L.) varieties of Russian selection using SSR markers. *Works on applied botany, genetics and selection*. 2019;180(4):81–87. (In Russ.) DOI: 10.30901 / 2227-8834-2019-4-81-87
9. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 1973. P.3321–3323.
10. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987;4(4):406–425.
11. Roslenkonoplya. Characteristics of varieties of oil flax. [Electronic resource] - Electron. text data. - Access mode: <https://www.rosflaxhemp.ru/fakti-i-cifri/spravochnie-materiali.html/id/10>, Admission is free. - (date of access: 07/14/2020) (In Russ.)
12. Agnews. Varieties and hybrids. [Electronic resource] - Electron. text data. - Access mode: <https://agro-bursa.ru/gazeta/sorta-gibridy/archive/>, Admission is free. - (date of access: 07/14/2020) (In Russ.)

ABOUT THE AUTHORS:

Taras A. Bazanov, Candidate of Chemical Sciences, Leading Researcher
Igor V. Uschapovsky, Candidate of Biological Sciences, Deputy Director for Science, Head of the laboratory.
Natalya N. Loginova, Researcher
Ekaterina V. Smirnova, Junior Researcher
Polina D. Mikhailova, Junior Researcher