

АКИНИНА Г.Е. ✉, **ТЕРЕНЯК Ю.Н.**, **ШАРЫПИНА Я.Ю.**, **ПОПОВ В.Н.**

*Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН,
Украина, 61060, г. Харьков, Московский проспект, 142*

✉ *gakinina@gmail.com, (097) 737-15-14*

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ЧИСТОТА СЕМЯН – АКТУАЛЬНЫЙ ВОПРОС СОВРЕМЕННОЙ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

Под генетической чистотой или типичностью семян понимают процент соответствия партии семян эталонному образцу сорта, гибрида и (или) его родительским формам. Контаминация партии семян другими сортами, гибридами или видами растений неминуемо сказывается на качестве конечной продукции. Особо пристальное внимание обычно уделяется генетической чистоте гибридных семян перекрёстноопыляющихся культур, поскольку их создание связано с влиянием многих внешних факторов, которые потенциально могут снижать посевные качества семян и конечной продукции.

На территории Украины среди гибридов сельскохозяйственных культур, безусловно, превалирует подсолнечник в связи с его привлекательной экономической составляющей. Так, в реестре сортов растений Украины 2016 года зарегистрировано более 500 гибридов этой культуры, представленных более чем 60 отечественными и зарубежными оригинаторами. Вместе с тем, получение семенного материала подсолнечника с высоким уровнем типичности связано с определенными сложностями, поскольку данная культура требует значительной пространственной изоляции для семеноводческих посевов, которую достаточно непросто выдержать в связи с обширными площадями товарных посевов на территории Украины. Кроме того, высокая стоимость семян подсолнечника по сравнению с другими сельскохозяйственными культурами часто становится причиной создания неподлинных партий гибридных семян. Так, по данным украинской лаборатории ООО «Агроген», которая предоставляет услуги по анализу генетической чистоты семян по ДНК-маркерам, в более чем 50% образцах подсолнечника, передаваемых для анализа генетической чистоты, выявляется низкая типичность, а также их несоответствие заявленным образцам, и такая партия семян, как

правило, относится к фальсифицированной (устное сообщение).

В зарубежных странах вопрос генетической чистоты семян регулируется рядом нормативно-правовых документов, которые учитывают современные технологии в генетике и селекции растений [1, 2]. Так, в 2015 году Международной организацией стандартизации (ISO) издано два стандарта по определению типичности кукурузы и подсолнечника с помощью ДНК-маркеров [3, 4]. В Украине типичность семян большинства сельскохозяйственных культур нормируется по морфологическим признакам в устаревшем ГСТУ 2240-93 [5]. По подсолнечнику в 2008 году издан новый ГСТУ 6068:2008, в котором типичность семян нормирована по морфологическим признакам и запасным белкам [6]. Утвержденные нормативные документы по определению типичности сельскохозяйственных культур с помощью ДНК-маркеров, в том числе подсолнечника, в Украине отсутствуют.

Учитывая вышесказанное, а также переход Украины на европейские стандарты с 2016 года, очевидно, что введение и стандартизация современных методов анализа генетической чистоты семян являются особо актуальным вопросом отечественной генетики и селекции сельскохозяйственных растений.

В связи с этим целью наших исследований стало изучение генетической чистоты семян гибридов подсолнечника согласно стандарту ISO/TR 17622:2015 и сравнение полученных данных с типичностью образцов гибридов в полевых условиях.

Материалы и методы

В исследования были вовлечены 9 образцов семян гибридов подсолнечника украинской и зарубежной селекции. Выбор данных образцов обусловлен значительным отличием по типичности их семян, идентифицированным

по результатам предварительного анализа по ДНК-маркерам.

Определение типичности образцов по ДНК-маркерам проводилось согласно стандарту ISO/TR 17622:2015 [4]. Шестнадцать пар микросателлитных праймеров к SSR-локусам, предложенных в стандарте для анализа генетической чистоты подсолнечника, были объединены нами в 5 мультиплексов в зависимости от температуры отжига и размеров продуктов амплификации (табл. 1). Две пары SSR-праймеров не вошли в мультиплексы и использовались для амплификации отдельно.

ДНК выделяли из 50 отдельных семян каждого образца подсолнечника, а также из смеси 30 семян родительских линий и (или) эталонного образца гибрида (F_1) подсолнечника с помощью набора реактивов «Diatom Prep100» производства ООО «Лаборатория Изоген» (Россия). Затем готовили смеси ДНК экспериментальных образцов путем объединения аликвот из 10 семян в одной пробирке, то есть получали пять пробирок со смесью ДНК по каждому из образцов. Далее проводили амплификацию по пяти мультиплексам и двум парам праймеров, которые не вошли в мультиплексы. По результатам анализа смесей ДНК экспериментальных и эталонных образцов выбирали наиболее информативную систему, которую далее использовали для анализа типичности ДНК из 50 отдельных семян.

Для амплификации ДНК использовали следующую программу: начальная денатурация – 10 мин. при 94 °C с последующими 33–40 циклами (в зависимости от SSR-праймеров) в таком режиме: денатурация – 30 с при 94 °C, отжиг 30 с при температуре отжига соответствующего праймера, элонгация 30 с при 72 °C, а затем конечная элонгация 10 мин при 72 °C. Визуализа-

цию результатов анализа осуществляли с помощью электрофореза продуктов амплификации в 3% агарозном геле в буфере с низкой ионной силой [7]. Электрофореграммы документировали с помощью фотографирования. Полученные электрофоретические спектры экспериментальных образцов сравнивали со спектрами родительских форм и (или) эталонных образцов гибридов, выявляли типичные и нетипичные генотипы.

Для анализа типичности гибридов в полевых условиях образцы подсолнечника высевали по 5 рядов на площади 26,25 м² с междурядьями 70 см в двухкратной повторности на экспериментальных полях Института растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН [8]. Краевые ряды в анализе не учитывали. Регистрировали такие морфологические признаки: образование пыльцы в период цветения; форма корзинки, ветвление и высота растений в период налива зерна [9]. Типичными считали однокорзиночные растения с фертильной пыльцой. Типичной формой корзинки принимали ту, которая встречалась в образце наиболее часто. Нетипичные по высоте растения выявляли с помощью статистического алгоритма анализа выбросов [10]. Выбросами принимали такие значения высоты растений, которые выходили за пределы 1,5 межквартильных расстояний [10].

Расчет типичности образцов подсолнечника по SSR-маркерам и морфологическим признакам осуществляли путем деления типичных генотипов (растений) на общее количество проанализированных растений с последующим выражением полученного значения в процентах.

Анализ взаимосвязи лабораторной и полевой типичности образцов подсолнечника оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона, который рассчитывали в программе Excel.

Таблица 1

SSR-локусы, использованные в анализе

Мультиплекс	Праймер	Тип ПЦР	Температура отжига (T_m), °C
Multiplex I	ORS 307, ORS 329, ORS 342	touchdown	60 °C – 1 °C каждый цикл – 5 циклов, 56 °C – 30 циклов
Multiplex II	ORS 407, ORS 309	touchdown	58 °C – 1 °C – 3 цикла, 56 °C – 30 циклов
Multiplex III	ORS 613, ORS 432, ORS 502		
Multiplex V	ORS 510, ORS 547, SSL 003		
Multiplex VI	ORS 621, ORS 605, SSL 171	touchdown	60 °C – 1 °C каждый цикл – 5 циклов, 56 °C – 30 циклов
–	ORS 811	классический	59 °C – 40 циклов
–	SSL 283	классический	57 °C – 40 циклов

Результаты и обсуждение

С помощью 16 пар микросателлитных праймеров, рекомендованных в международном стандарте ISO/TR 17622:2015, путем анализа и сравнения электрофоретических спектров родительских линий и (или) эталонных образцов гибридов с экспериментальными образцами были подобраны информативные SSR-локусы для анализа генетической чистоты семян каждого образца: для гибридов № 1, 3 – multiplex I; № 4, 5 – multiplex II; № 6 – multiplex III; № 7–9 – Multiplex V; № 2 – ORS 811 (рис. 1).

По результатам анализа исследованные образцы гибридов подсолнечника были объединены в три условные группы по уровню генетической чистоты – с высокой типичностью 99–92% (гибриды № 1–3); средней типичностью – 66–48% (гибриды № 4–6) и низкой типичностью – 44–24% (гибриды № 7–9) (табл. 2).

В полевых условиях в группе образцов с высокой генетической чистотой изученные морфологические признаки также характеризовались высоким уровнем выравненности. В группах образцов со средним и низким уровнями генетической чистоты проявлялась значительная вариация морфологических признаков (табл. 2). Так, наибольшей изменчивостью в этих группах характеризовались признаки фертильность пыльцы

и форма корзинки. В образцах гибридов № 5–9 выявлен значительный процент стерильных растений, что, предположительно, может быть связано с биологическим или механическим засорением родительских линий. По признаку форма корзинки у гибридов № 1–3, 8 данный признак проявлялся в виде двух, у гибридов № 4 и 6 – трех, а у гибридов № 5, 7, 9 – четырех градаций.

Ветвистость и высота растений характеризовались высоким уровнем выравненности у всех изученных образцов гибридов подсолнечника (табл. 2, рис. 2). Минимальное значение типичности по признаку ветвистость составило 99%, а по признаку высота растений – 96%.

Для расчета среднего значения полевой типичности образцов подсолнечника использовали только полиморфные морфологические признаки. С помощью коэффициента корреляции определена высокая положительная корреляция между генетической чистотой семян по SSR-маркерам и полевой типичностью, оцененной по полиморфным морфологическим признакам (рис. 3).

В частности, высокая положительная корреляция выявлена между генетической чистотой и типичностью по признакам фертильность пыльцы и форма корзинки. Низкой отрицательной взаимосвязью характеризовались генетическая

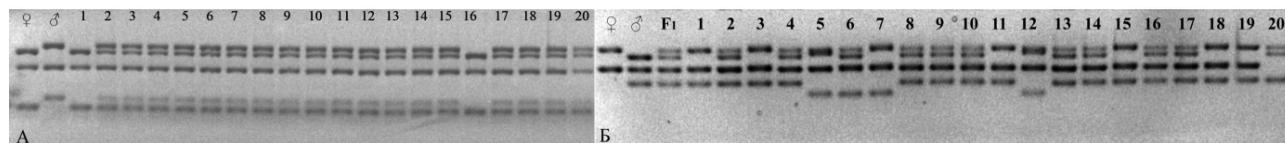


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов амплификации SSR-локусов в образцах гибридов подсолнечника. ♀ – материнская линия; ♂ – отцовская линия; F₁ – эталонный образец гибрида. А – гибрид № 4, multiplex I: 1, 16 – нетипичные генотипы; 2–15, 17–20 – типичные генотипы. Б – гибрид № 6, multiplex III: 1, 3, 5–7, 11, 12, 15, 18–20 – нетипичные генотипы; 2, 4, 8–10, 13, 14, 16, 17 – типичные генотипы

Таблица 2

Типичность образцов гибридов подсолнечника по морфологическим признакам и SSR-маркерам

Образцы гибридов подсолнечника	Типичность по морфологическим признакам, %					Типичность по SSR-маркерам, %
	образование пыльцы	ветвление	форма корзинки	высота растения	среднее по полиморфным признакам	
№ 1	100	100	93	96	95	99
№ 2	100	100	96	98	97	95
№ 3	99	99	98	98	99	92
№ 4	100	99	45	100	72	66
№ 5	52	100	62	97	70	58
№ 6	87	100	69	96	84	48
№ 7	43	99	65	100	69	44
№ 8	38	100	60	99	66	36
№ 9	34	100	46	99	60	24

чистота по SSR-маркерам и типичность по признакам ветвистость и высота растений.

Следует отметить, что для адекватной оценки типичности посевов необходимо выявить полиморфный признак (если такой имеется) и провести мониторинг в определенный период вегетации растений, когда данный признак проявляется и его можно легко и правильно идентифицировать. При этом SSR-маркеры нечувствительны к характеру загрязнения семян и позволяют провести достоверный анализ генетической чистоты семян еще до посева.

Выводы

С помощью 16 пар SSR-праймеров, рекомендованных в стандарте ISO/TR17622:2015, нам удалось подобрать информативные микросателлитные локусы, которые позволили проанализировать генетическую чистоту 9 образцов гибридов подсолнечника. Полученные в лабораторных условиях данные характеризовались высокой положительной корреляцией с полевой типичностью образцов, что свидетельствует о значительных перспективах использования SSR-маркеров для установления генетической чистоты семян подсолнечника.

Для развития данного вопроса в нашей стране считаем необходимым утверждение стандарта ISO/TR17622:2015 в Украине. Приоритетной задачей ближайших исследований считаем определение минимального значения генетической чистоты семян подсолнечника, которое обеспечивает полевую типичность на уровне 95–97%. Также, по нашему мнению, важно исследовать взаимосвязь генетической чистоты семян с данными устойчивости к гербицидам, определенной методом грунт-контроля для гербицидоустойчивых гибридов подсолнечника. На основе полученных ре-

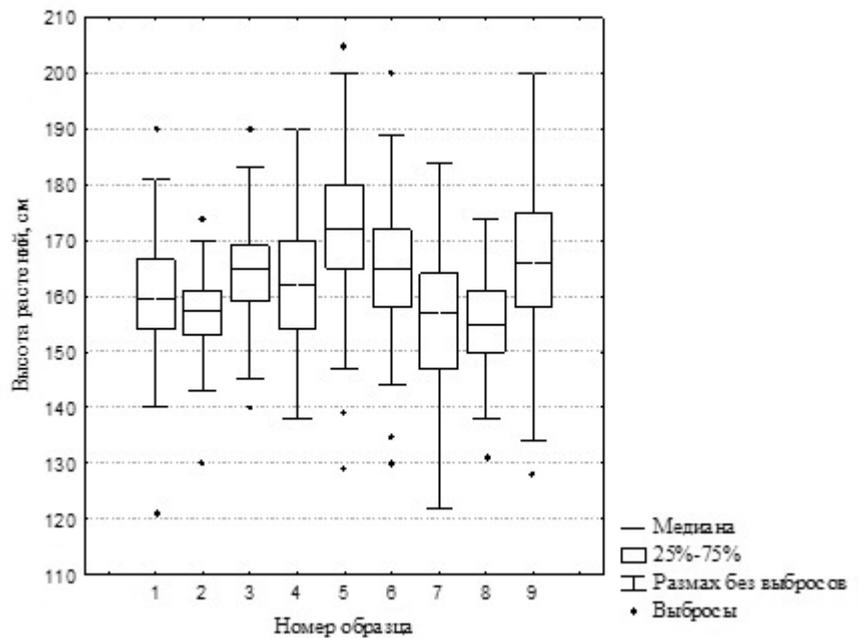


Рис. 2. Оценка типичности образцов гибридов подсолнечника по высоте растений с помощью анализа выбросов

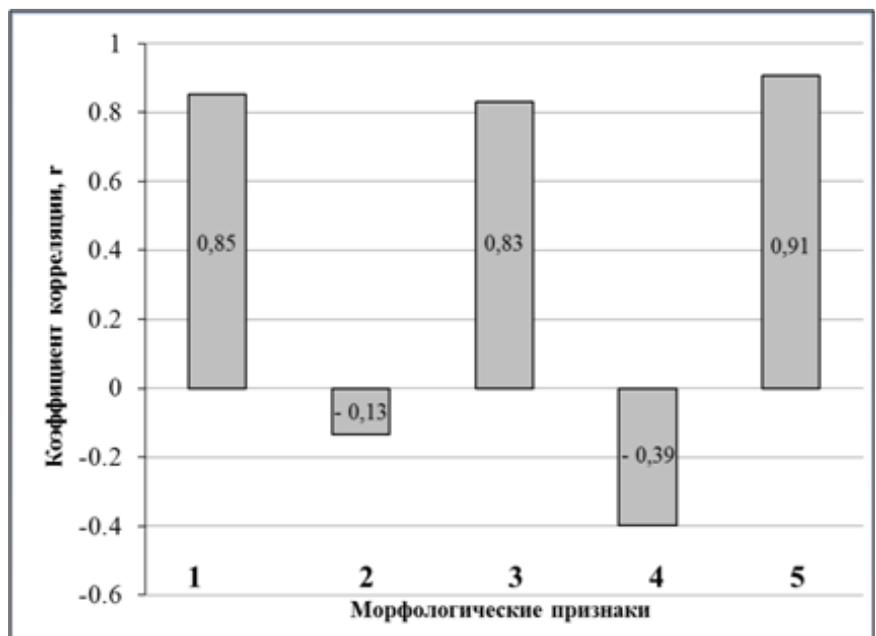


Рис. 3. Взаимосвязь генетической чистоты семян подсолнечника по SSR-маркерам с полевой типичностью по морфологическим признакам: 1 – фертильность пыльцы, 2 – ветвистость, 3 – форма корзинки, 4 – высота растений, 5 – среднее по полиморфным морфологическим признакам

зультатов необходимо разработать допустимые нормы генетической чистоты гибридных семян подсолнечника для разных типов гибридов с последующим утверждением их на государственном уровне.

ЛИТЕРАТУРА

1. Guidelines for control plot tests and field inspection of seed crops. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) seed schemes. [Електронний ресурс]. – 2012. – 36 p. – Режим доступа: <http://www.oecd.org/tad/code/>.
2. Seed Certification. Crop Standards. Sunflower. CCIA (California Crop Improvement Association). [Електронний ресурс]. – Режим доступа: http://ccia.ucdavis.edu/Crop_Standards_pages/Sunflower/.
3. biomarker analysis – SSR analysis of maize. ISO/TR 17623:2015. International standard. – 2015. – 10 p.
4. Molecular biomarker analysis – SSR analysis of sunflower. ISO/TR 17622:2015. International standard. – 2015. – 11 p.
5. Насіння сільськогосподарських культур. Сортові та посівні якості. Технічні умови: ДСТУ 2240-93 [Чинний від 1994-07-01]. – К.: Держстандарт України, 1994. – 73 с. (Держстандарт України).
6. Насіння соняшнику. Сортові та посівні якості. Технічні умови. ДСТУ 6068:2008. [Чинний від 2008-12-31]. – К.: Держспоживстандарт України, 2008. – 7 с. (Національний стандарт України).
7. Brody J.R., Calhoun E.S., Gallmeier E., Creavalle T.D., Kern S.E. Ultra-fast high-resolution agarose electrophoresis of DNA and RNA using low-molarity conductive media // Bio-techniques. – 2004. – 37, № 4. – P. 598–602.
8. Методика державного сортовипробування сільськогосподарських культур. Загальна частина. – К., 2000. – Вип. 1. – 100 с.
9. Кириченко В.В., Петренко В.П., Кривошеева О.В., Рябчун В.К., Маркова Т.Ю. Ідентифікація морфологічних ознак соняшнику (*Helianthus L.*). Посібник. – Харків: Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН, 2007. – 78 с.
10. Seo S. A Review and Comparison of Methods for Detecting Outliers in Univariate Data Sets. Thesis of master of science. [Електронний ресурс] – University of Pittsburgh. – 2006. – 53 p. – Режим доступа: d-scholarship.pitt.edu/7948/1/Seo.pdf.

AKININA G.E., TERENIAK YU.N., SHARYPINA YA.YU., POPOV V.N.

Plant Production Institute named after V.Ya. Yuriev of NAAN,

Ukraine, 61060, Kharkov, Moskovskiy prospect, 142, e-mail: gakinina@gmail.com

GENETIC PURITY OF SEEDS – ACTUAL QUESTION OF MODERN GENETICS AND PLANT BREEDING

Aim. The genetic purity of hybrids of sunflower seeds according to the standard ISO/TR 17622:2015 and correlation of the obtained data with plant uniformity in the field were studied. **Methods.** The genetic purity of sunflower hybrid samples using SSR-markers according to ISO/TR 17622:2015 was evaluated. Morphological traits during vegetation period in the field were registered. Statistical analysis of the obtained data was used. **Results.** Sixteen pairs of SSR-primers were allowed to analyze the genetic purity of 9 samples of sunflower hybrids. The laboratory data was highly positive correlated with plants uniformity in the field. **Conclusions.** Based on the obtained results it is necessary to approve ISO/TR17622:2015 in Ukraine and to develop threshold of genetic purity of sunflower seeds on the state level.

Keywords: genetic purity of seeds, sunflower, SSR-markers, morphological traits, international standards.