

УДК 633.854.434

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛО СПЕЦИФИЧНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА СЕМЯН ОДНОДОМНЫХ СОРТОВ КОНОПЛИ ПОСЕВНОЙ\*

О.В. РАЗУМОВА<sup>1</sup>, О.С. АЛЕКСАНДРОВ<sup>1</sup>, Т.И. СУХОРАДА<sup>2</sup>,  
М.Г. ДИВАШУК<sup>1</sup>, С.В. ДОЛГОВ<sup>3</sup>, Г.И. КАРЛОВ<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева;

<sup>2</sup> Краснодарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства  
имени П.П. Лукьяненко; <sup>3</sup> Станция искусственного климата «БИОТРОН»,  
Филиал института биоорганической химии имени академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова)

*В работе показана возможность использования молекулярных маркеров для анализа чистоты партий семян сортов однодомной конопля южного типа и среднерусской селекции. Для этой цели протестировано три ДНК-маркера половой принадлежности растений конопля посевной. Показано, что амплификация маркеров у однодомных сортов соответствует женскому типу. Предложено использование MADC2 маркера как наиболее эффективного для анализа семян однодомных сортов конопля посевной на наличие засорения двудомными формами.*

*Ключевые слова: конопля посевная, Cannabis sativa, маркер-ассоциированная селекция, однодомность, семеноводство.*

Конопля посевная (*Cannabis sativa* L.) — одна из старейших сельскохозяйственных культур. Ее возделывание началось около 10000 лет назад [18]. Волокно конопля используют для изготовления бумаги, пеньки, веревок, тканей, а из семян получают масло, широко используемое в лакокрасочной и пищевой промышленности. Высокие показатели биомассы (6-12 т/га) позволяют рассматривать конопля как перспективную культуру для получения биотоплива [4, 15].

В норме конопля — двудомное растение с половым диморфизмом, что определяет особенности ее агротехники. Мужские растения (поскось) отличаются от женских (матерка) не только по наличию андроцейных/гинецейных цветков, но и по общему габитусу, срокам цветения и созревания. Мужские растения зацветают в среднем на 8-10 дней раньше женских и к моменту созревания женских прекращают вегетацию. При этом качество волокна значительно снижается. В связи с этим перспективным является получение и выращивание равномерно созревающих и пригодных для механизированной уборки однодомных сортов [4, 9, 15].

В Российской Федерации активно ведется селекция на однодомность. Из 23 сортов и гибридов конопля, находящихся в Государственном реестре селекцион-

\* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, Соглашение 13-04-01804.

ных достижений, допущенных к использованию, 21 сорт является однодомным [1]. При всех преимуществах однодомных сортов их семеноводство затруднено, поскольку такие сорта весьма неустойчивы, и в случае появления в популяции мужских генотипов как результата спонтанной гибридизации с двудомными формами растений, возвращение к двудомности может происходить уже за два поколения [13]. Таким образом, требуется постоянный контроль за наличием примеси мужских генотипов в семенном материале однодомных сортов конопли. Традиционно наличие таких примесей можно оценить после проведения грунт-контроля семенного материала, что требует материальных затрат и приводит к потере времени (один календарный год). Альтернативой грунт-контролю может служить использование молекулярных маркеров. Для многих культур оценка качества семян осуществляется с использованием ДНК-маркеров, показывающих достоверную воспроизводимость и высокую степень надежности [2, 3].

Двудомность конопли определяется XY системой половых хромосом, где генотипы, несущие XX хромосомы являются женскими, а XY — мужскими [7]. ДНК-маркеры пола, сцепленные с Y-хромосомой мужских генотипов, разработаны для ряда двудомных видов растений и показали свою высокую эффективность [5, 6, 11, 19]. На конопле также разработаны молекулярно-генетические маркеры, позволяющие успешно определять половую принадлежность растений на ранних этапах онтогенеза [9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 20]. При этом в ряде исследований было показано, что однодомные растения конопли демонстрируют амплификацию ДНК-маркеров по женскому типу, что косвенно свидетельствует об отсутствии Y-хромосомы в их генотипах [9]. Таким образом, с использованием ДНК-маркеров возможно выявлять наличие примеси мужских (генотипов) растений в семенном материале.

В нашей работе проведена оценка эффективности использования ранее разработанных полоспецифичных ДНК-маркеров конопли посевной, выявлен наиболее эффективный маркер и предложено его использование в семеноводстве для определения чистоты семян однодомных сортов на наличие примесей мужских генотипов.

### Материалы и методы

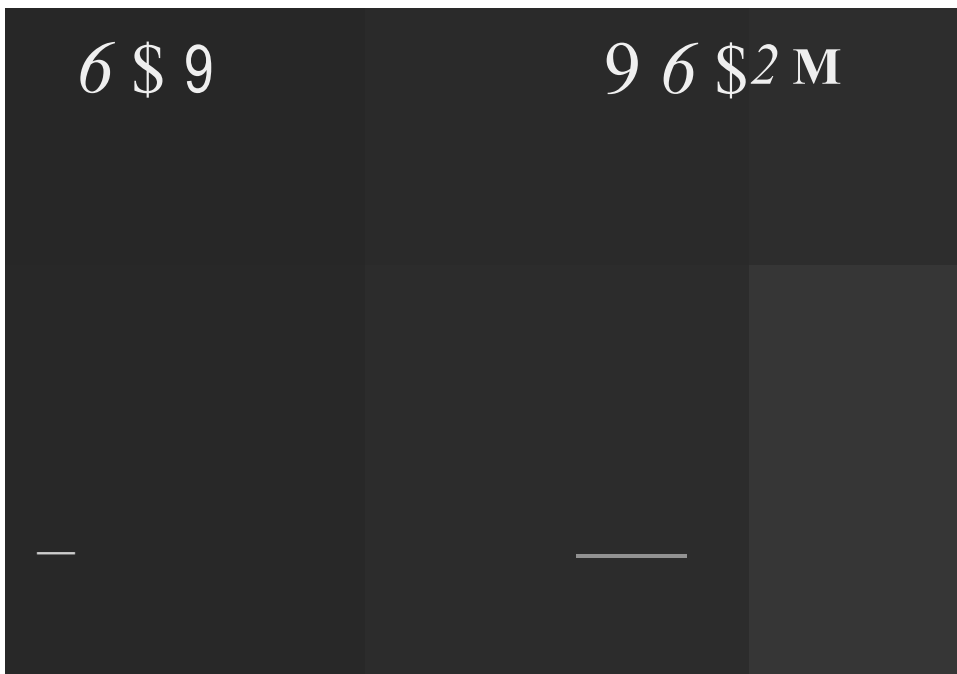
В работе использовали однодомные и двудомные сорта конопли южного и среднерусского типов, предоставленные Краснодарским научно-исследовательским институтом сельского хозяйства имени П.П. Лукьяненко (двудомный сорт Зеница и однодомные сорта Кубанка и Мария южного типа) и ГНУ «Чувашский научно-исследовательский институт сельского хозяйства» (двудомный сорт Игоркин и однодомные сорта Диана, Диман и Юлиана среднерусского типа). Для подтверждения эффективности ДНК-маркера использовали партии семян однодомного сорта Кубанка с известным по фенотипическим данным соотношением полов.

Выделение ДНК проводили из индивидуально пророщенных семян по методике Doyle and Doyle с небольшими модификациями [8]. Буфер для экстракции содержал 100 мМ Трис-НС1 (рН 8,0), 20 мМ ЭДТА (рН 8,0), 2 М NaCl, 1,5% СТАВ, 1,5% PVP и 0,2% Р-меркаптоэтанола. Очистку выделенной ДНК проводили в 70%-м этаноле. Для определения пола использовали три SCAR-маркера: MADC2 (5-GTGACGTAGGTAGAGTTGAA-3', 5-GTGACGTAGGCTATGAGAG-3) [12], SCAR 119 (5 -TCAAACAACAACAACCG-3', 5 - GAGGCCGATAATTGACTG-3 ) и SCAR323 (5' -GAGCGGACATCATTCGCT-3', 5' -ATCACCCACCGTTTAGG-3') [20].

Праймеры синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва). ПЦР проводили на амплификаторе Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, США) в реакционной смеси объемом 25 мкл. Условия ПЦР оптимизировали отдельно для каждой пары праймеров. Измененная программа для праймеров MADC2: 94°C в течение 5 мин, затем 35 циклов 94°C — 30 с, 60°C — 1 мин, 72°C — 1 мин, конечная элонгация 72°C течение 5 мин. Модифицированная программа для праймеров SCAR323: 94°C в течение 2 мин, затем 35 циклов 94°C — 10 с, 62,5°C — 30 с, 72°C — 1 мин, конечная элонгация 72°C в течение 2 мин. Программа для SCAR 119: 94°C — 2 мин, затем 39 циклов 94°C — 10 с, 52°C — 30 с, 72°C — 1 мин, после 72°C в течение 2 мин. Визуализацию результатов проводили в 2%-м агарозном геле с бромистым этидием в трис-боратном буферном растворе (ТБЕ) с последующей документацией в системе гель-документирования Gel Doc XR Plus (BioRad). Размер амплифицированных фрагментов определяли с использованием маркера GeneRuler™ «100 bp plus» (Fermentas, Литва).

### Результаты и их обсуждение

На первом этапе нами была оценена эффективность практического использования ранее разработанных ДНК-маркеров пола конопли (MADC2, SCAR323 и SCAR 119). Из трех маркеров стабильную амплификацию демонстрировали два: маркер MADC2 [12] и SCAR323 (MADC5) [20]. У мужских растений маркер SCAR323 (MADC5) амплифицирует участок ДНК размером 323 п.о., а у женских и однодольных амплификация отсутствует полностью, или же ее интенсивность значительно ниже (рис. 1). Это совпадает с результатами, полученными Torjek et al. (2002) [20].



**Рис. 1.** Амплификация маркера SCAR323 у растений двудомного сорта Зеница: ♂ — мужские растения; ♀ — женские растения; М — маркер размера «100 bp Plus»

Маркер MADC2 также является специфичным для мужских растений, у которых наблюдается амплификация фрагмента ДНК размером около 390 п.н. У женских и однодомных растений амплификация этого фрагмента не наблюдается, но присутствуют два фрагмента размером около 560 п.н. и 870 п.н. (рис. 2).

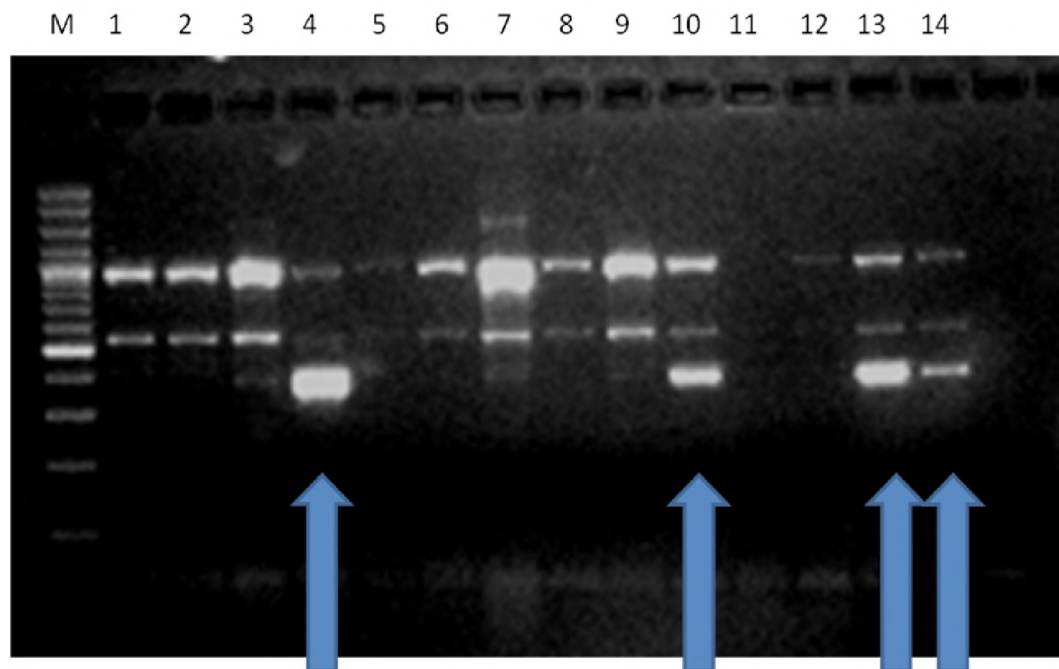
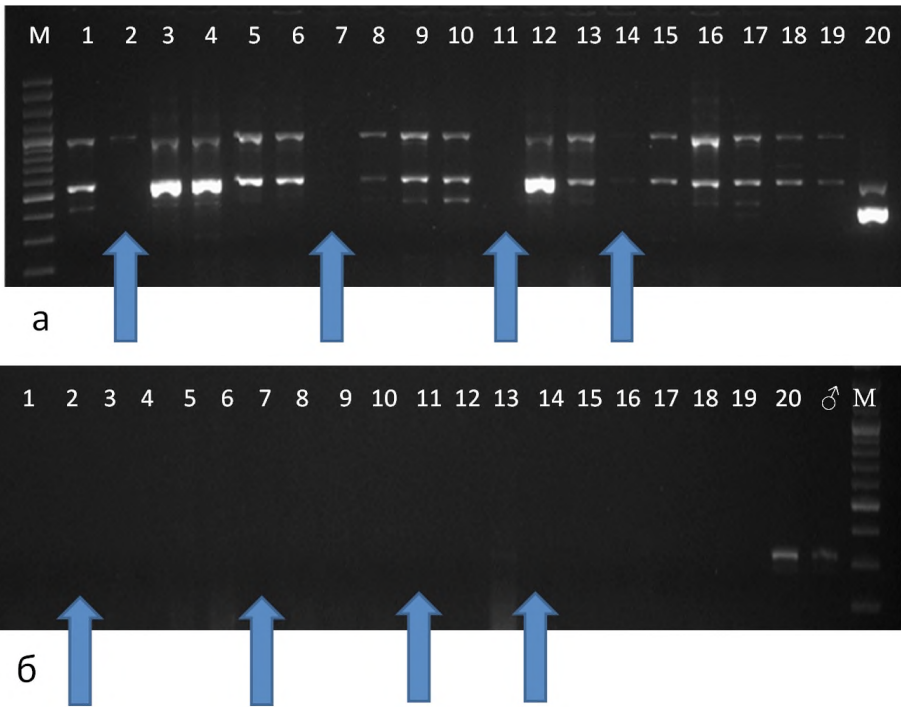


Рис. 2. Электрофореграмма результатов ПЦР с праймерами MADC2. М — маркер размеров «100 bp plus», стрелками показаны мужские растения

Поскольку маркер SCAR323 не исключает получение ложных результатов из-за ингибирования полимеразной цепной реакции, целесообразно использовать более надежный кодоминантный маркер MADC2, дающий амплификацию фрагментов на ДНК мужских, женских и однодомных генотипов. Апробация маркера MADC2 на 20 растениях показала отсутствие амплификации в образцах под номерами 2, 7, 11 и 14 (рис. 3а) вследствие ее ингибирования. При использовании маркера SCAR323 данные образцы были бы определены как женские (рис. 3б). Поэтому для дальнейшего анализа применялся только маркер MADC2.

Изначально этот маркер был разработан для выявления мужских и женских растений у двудомных сортов и линий конопли посевной. При этом в работах Mandolino с соавторами (1999) [12] и Tojtek с соавторами (2002) [20] было показано, что при использовании данного маркера на однодомных формах амплификация наблюдается по женскому типу. Этот результат был получен на ограниченном количестве однодомных генотипов родственного происхождения. В нашей работе при использовании маркера на однодомных сортах южного и среднерусского типов конопли посевной также показана амплификация маркера по женскому типу. Результаты, полученные



**Рис. 3.** Сравнение результатов амплификации маркеров пола MADC2 (а) и SCAR323 (б) на однодомной конопле сорта Диман: 1-20 — исследуемые образцы; ♂ — мужское растение (контроль); М — маркер размеров «100 bp plus». Стрелками показаны образцы, дающие ложноположительные результаты при амплификации с маркером SCAR323

нами и другими авторами на однодомных сортах конопли из разных селекционных центров, свидетельствуют о сходной генетической природе однодомности. Таким образом, наличие примесей мужских генотипов в выбранных нами однодомных сортах можно эффективно определять с помощью ДНК-маркера MADC2.

Для оценки эффективности маркера MADC2 были использованы две партии семян сорта Кубанка с наличием разного уровня примеси мужских генотипов. Наличие таких примесей было оценено при выращивании растений в полевых условиях. При проверке первой партии семян ДНК-анализ показал, что 10 из 50 семян представляют собой мужские генотипы, что составляет порядка 20%. Эти данные совпадают с результатами фенотипической оценки растений, выращенных в поле из этой же партии семян. По данным грунт-контроля, семена 2009-2010 гг. содержали до 26% мужских растений. Во второй партии (семена 2012 г.) было выявлено менее 1% мужских генотипов, что также совпадало с результатами полевых испытаний. При анализе партий семян (проба — 50 шт.) однодомных сортов Мария, Диана, Диман и Юлиана характерный для мужских растений фрагмент не амплифицировался, что совпадает с данными оригинаторов о возможной примеси мужских генотипов в количестве не более 1%. При этом в двудомных сортах Зеница и Игоркин соотношение мужских и женских растений было близко к ожидаемому 1:1.

Таким образом, использование ДНК-маркера MADC2 позволяет в кратчайшие сроки проводить оценку качества партий семян однодомных сортов конопли посевной, что имеет важное значение для селекции, поскольку фенотипическая оценка в полевых условиях приводит к потере одного вегетационного периода, а применение оценок материала в теплице связано с большим объемом затрат.

#### Библиографический список

1. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию // Официальное издание. М., 2012.
2. Сахарова А.Н., Андреева Г.Н., Фесенко П.А., Хрусталева Л.П., Карлов Г.П. Применение SSR-маркеров для оценки уровня гибридности семян F1 огурца // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2011. № 6. С. 150-155.
3. Соболев В.В., Карлов Г.Л., Соболева А.Г., Озеровский А.В., Казаков И.В., Феськов А.А. Использование ISSR-маркеров для молекулярно-генетической идентификации и папортизации сортов малины // Сельскохозяйственная биология. 2006. № 5. С. 48-53.
4. Степанов Г.С., Фадеев А.П., Романова И.В. Атлас-определитель половых типов растений конопли // Чувашский НИИСХ. Чебоксары, 2011. 164 с.
5. Aleksandrov O.S., Divashuk M.G., Karlov G.I. Development of a sex-specific molecular marker for Japanese hop *Humulus japonicus* Siebold & Zucc // Russian Journal of Genetics. 2011. V 47. № 8. P. 1016-1020.
6. Danilova T.V., Karlov G.I. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Humulus lupulus* L.) // Euphytica. 2006. V. 151. № 1.P. 15-21.
7. Divashuk M.G., Alexandrov O.S., Razumova O. V, Kirov I. V, Karlov G.I Molecular Cytogenetic Characterization of the Dioecious *Cannabis sativa* with an XY Chromosome Sex Determination System//PloS one. 2014. 9 (1). e85118.
8. Dovle J.J., Dovle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. 1990. V. 12. P. 13-15.
9. Faux A.M., Berhin A., Dauguet N., Bertin P. Sex chromosomes and quantitative sex expression in monoecious hemp (*Cannabis sativa* L.) // Euphytica. 2014. V. 196. № 2. P. 183-197.
10. Flachowsky H., Schumann E., Weber W.E., Peil A. Application of AFLP for the detection of sex specific markers in hemp // Plant Breeding. 2001. V. 120. № 4. P. 305-309.
11. Han'ey C.F., Gill G.P., Fraser L.G., McNeilage M.A. Sex determination in Actinidia.
1. Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis* // Sexual Plant Reproduction. 1997. V. 10. №3. P. 149-154.
- Yl.Mandolino G., Carboni A., Forapani S., Faeti V, Ranalli P. Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.) // Theoretical and Applied Genetics. 1999. V. 98. № 1. P. 86-92.
13. Mandolino G., Carboni A. Potential of marker-assisted selection in hemp genetic improvement // Euphytica. 2004. V. 140. № 1-2. P. 107-120.
14. Rode J., In Choi K, Saal B., Flachowsky H., Kriese U., Weber W.E. Sex linked SSR markers in hemp // Plant Breeding. 2005. V. 124. № 2. P. 167-170.
15. Russo E.B. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet // Chemistry & Biodiversity. 2007. V. 4. № 8. P. 1614-1648.
16. Sakamoto K, Shimomura K, Komeda Y, Kamada H., Satoh S. A male-associated DNA sequence in a dioecious plant. *Cannabis sativa* L. // Plant and Cell Physiology. 1995. V 36. № 8. P. 1549-1554.
17. Sakamoto K, Ohmido N., Fukui K, Kamada H., Satoh S. Site-specific accumulation of a LINE-like retrotransposon in a sex chromosome of the dioecious plant *Cannabis sativa* // Plant Molecular Biology. 2000. V. 44. № 6. P. 723-732.
18. Schultes R.E., Klein W.M., Plowman T., Lockwood T.E. Cannabis, an example of taxonomic neglect // Bot Mus Leaf! Harv Univ. 1974. № 23. P. 337-367.



19. Stehlik L, Blattner F.R. Sex-specific SCAR markers in the dioecious plant *Rumex crispus* (Polygonaceae) and implications for the evolution of sex chromosomes // Theoretical and Applied Genetics. 2004. V. 108. № 2. P. 238-242.

20. Torjek O. et al. Novel male-specific molecular markers (MADC5, MADC6) in hemp // Euphytica. 2002. V. 127. № 2. P. 209-218.

## USING OF SEX LINKED DNA MARKERS FOR ASSESSMENT THE QUALITY OF MONOECIOUS HEMP SEEDS

O.V. RAZUMOVA<sup>1</sup>, O.S. ALEKSANDROV<sup>1</sup>, T.I. SUKHORADA<sup>2</sup>,  
M.G. DIVASHUK<sup>1</sup>, S.V. DOLGOV<sup>3</sup>, G.I. KARLOV<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev;<sup>2</sup> P.P. Lukyanenko Krasnodar research and development institute of agriculture;<sup>3</sup> Artificial climate station "BIOTRON" . affiliate enterprise of M.M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry)

*Hemp is a valuable crop, cultivated for fiber and oil. Normally it is a dioecious plant with male plants mature earlier than female ones, that creates some inconvenience for mechanical harvesting. In this regard it is very important to create and cultivate the monoecious varieties. In view of the fact that hemp is a cross-pollinating crop, the strict spatial isolation of monoecious varieties by seed growing is required in order to prevent the return to dioecious state. Methods of high-performance genetic control of seed impurity of monoecious varieties by male genotypes is needed as well. In our work, the possibility of using molecular markers to analyze the purity of seed lots of monoecious hemp varieties of southern or middle-Russian type is observed. For this purpose, three DNA markers was tested for belonging to gender of hemp seed plants. The amplification of markers in monoecious varieties on female type was recorded. It is proposed to use AMDC2 marker as the most effective for the analysis of seeds of monoecious hemp varieties for the presence of dioecious forms.*

*Key words: hemp, Cannabis sativa L., marker-associated selection, monoecious, seed production.*

**Разумова Ольга Владимировна** — асп. Центра молекулярной биотехнологии РЕАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел. (499) 977-70-01; e-mail: razumovao@gmail.com).

**Александров Олег Сергеевич** — к. б. н., ст. науч. сотр. Центра молекулярной биотехнологии РЕАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49, тел. (499) 977-70-01; e-mail: olegsandrov@gmail.com).

**Сухорада Татьяна Ивановна** — д. с.-х. н., зав. лабораторией селекции и семеноводства конопли ЕНУ Краснодарского научно-исследовательского института сельского хозяйства имени П.П. Лукьяненко (350012, Россия, Краснодарский край, г. Краснодар, Центральная Усадьба КНИИСХ; тел. (861) 222-62-98; e-mail: hemp-kniish@inail.m).

**Дивашук Михаил Георгиевич** — к. б. н., ст. науч. сотр. Центра молекулярной биотехнологии РЕАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел. (499) 977-70-01; e-mail: divashuk@gmail.com).

**Долгов Сергей Владимирович** — д. б. н., зав. филиалом ФЕБУН Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (ФИБХ РАН),

Станцией искусственного климата «БИОТРОН» (142290, Московская обл., г. Пущино, проспект Науки, 6; тел. (4967) 73-17-19; e-mail: fibkh@bibch.ru).

**Карлов Геннадий Ильич** — д. б. н., проф., руководитель Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел. (499) 977-70-01; e-mail: karlovg@gmail.com).

**Razumova Olga Vladimirovna** — PhD student of the Centre for molecular biotechnology, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel. (499) 977-70-01; e-mail: razumovao@gmail.com).

**Aleksandrov Oleg Sergeevich** — PhD in Biology, senior researcher of the Centre for molecular biotechnology, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel. (499) 977-70-01; e-mail: olegsandrov@gmail.com).

**Sukhorada Tatyana Ivanovna** — Doctor of Agricultural Sciences, P.P. Lukyanenko Krasnodar Research and Development Institute of Agriculture (350012, the Russian Federation, Krasnodar-12, Tsentralnaya Usadba KNIISKH; tel. (861) 222-62-98; e-mail: hemp-kniish@mail.ru).

**Divashuk Mikhail Gergievich** — PhD in Biology, senior researcher of the Centre for molecular biotechnology, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel. (499) 977-70-01; e-mail: divashuk@gmail.com).

**Dolgov Sergey Vladimirovich** — Doctor of Biological Sciences, head of the affiliate enterprise of M.M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry of the Russian Academy of Sciences (Moscow region, Pushchino, Avenue of Science, 6; tel. (4967) 73-17-19; e-mail: fibkh@bibch.ru).

**Karlov Gennadiy Iliyich** — Doctor of Biological Sciences, professor, head of the Centre for molecular biotechnology, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel. (499) 977-70-01; e-mail: karlovg@gmail.com).