МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ПЦР ДНК ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ ЛИНИЙ И ГИБРИДОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА

Гучетль С.З., канд. биол. наук, Фролов С.С., канд. с.-х. наук

Армавирская опытная станция –
филиал ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В. С. Пустовойта»,
Российская Федерация, г. Армавир

Аннотация. Для оптимизации метода определения параметров генетической чистоты линий и гибридов подсолнечника на основе микросателлитных локусов ДНК, с использованием критериев уровня полиморфизма были отобраны семь пар праймеров. Две пары праймеров – ORS 5 и Har 432, объединены в мультиплексный набор. Остальные 5 локусов: ORS 559, Har 432, ORS5, ORS 815, ORS 1144, амплифицировались отдельно. Создание смесей, состоящих из объединенных аликвот ДНК отдельных проростков в одной пробирке, также позволяет сократить количество анализов.

Ключевые слова. Подсолнечник, линии, гибриды, генетическая чистота, ПЦР ДНК, микросателлитные локусы.

A MULTIPLEX PCR DNA FOR OPTIMIZATION OF THE METHOD DETERMINATION OF GENETIC PURITY OF SUNFLOWER LINES AND HYBRIDS

Guchetl S.Z., Cand. Sc. (Biol.), Frolov S.S., Cand. Sc. (Agric.)

FSBSI «The Armavirskaya Experimental Station of All-Russian Research Institute of Oil Crops by V.S. Pustovoit», Russian Federation, Armavir

Abstract. To optimize the method of determination the genetic purity of sunflowers lines and hybrids based on microsatellite DNA loci, seven pairs of primers were chosen using criteria of polymorphism level. The two pairs of primers (ORS 5 and Har 432) were united into a multiplex set. The last 5 loci (ORS 559, Har 432, ORS5, ORS 815 and ORS 1144) were amplified separately. Creation of mixture containing united aliquots of DNA of the separate seedlings in a vial allows also decrease analyzes quantity.

Keywords. Sunflower, lines, hybrids, genetic purity, DNA, microsatellite loci.

Подсолнечник – одна из основных масличных культур, как в Российской Федерации, так и во всем мире. Межлинейные гибриды занимают значительные посевные площади. Ограничением внедрения гибридов в производство может служить сложное семеноводство, предусматривающее поддержание родительских линий и поколения F_1 на высоком уровне генетической чистоты [1]. Существующий для определения генетической чистоты метод грунтового контроля семян энергозатратен, получаемая оценка достаточно субъективна, и тре-

бует длительного времени. Наиболее удобными для характеристики генотипов являются маркеры, основанные на полиморфизме биохимических признаков, таких как изоферменты и запасные белки [2-4], а также нуклеотидные последовательности ДНК (ДНК-маркеры) [5-7], в частности микросателлитные повторы ДНК (SSR). Данные маркеры позволяют проводить как оценку генетической чистоты партий семян, так и осуществлять идентификацию линий и гибридов сельскохозяйственных культур. На подсолнечнике в разных учреждениях оценивают генетическую чистоту линий и гибридов всеми перечисленными выше способами [2, 4, 7, 8, 9]. Ограничением применения ДНК маркеров для селекционно-генетических исследований является стоимость расходных материалов и лимит времени, накладываемый требованиями экспресс-анализа. Для создания эффективной и экономичной системы, Акинина Г.Е. с соавторами объединили шестнадцать пар микросателлитных праймеров к SSR-локусам, предложенным к использованию в стандарте ISO/TR 17622:2015 для определения генетической чистоты подсолнечника [9], в 5 мультиплексов в зависимости от температуры отжига и размеров продуктов амплификации [7]. Исследовательской группой Супруна И.И. разработан мультиплексный набор ДНК локусов для маркерной селекции яблони на устойчивость к парше и для идентификации штаммов парши яблони [10]. Целью нашей работы была оптимизация определения параметров генетической чистоты линий и гибридов подсолнечника на основе микросателлитных локусов ДНК.

Материалом для исследования служили 12 линий и 7 гибридов коллекции подсолнечника АОС ВНИИМК: линии ВА 93, ВА 760, ВА 761, ВА 4, ВА 6, ВА 384, ВА 389, ВА 317, ВА 325, ВК 21, ВА 337, ВА 737, гибриды Барс, Натали, Ирэн, Мэлин, Медас, Арис, Арнеб.

Геномную ДНК выделяли из 100 отдельных 5-7 дневных этиолированных проростков подсолнечника каждого образца с помощью модифицированного метода Saghai-Maroof *et al* [11] с использованием CTAB буфера. Для проведения ПЦР использовали 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 67 мМ трис-HCl, pH8,8; 16,6 мМ сульфата аммония; 1,5-3 мМ $MgCl_2$; 0,01 % Tween 20; по 0,2 мМ дезоксирибонуклеозидфосфатов; по 10 пМ праймеров; 10 нг матричной ДНК и 1 ед. рекомбинантной термостабильной ДНК полимеразы. Амплификацию проводили в приборе Терцик (ДНК-технология, Россия). Условия амплификации: начальная денатурация при 96 ^{0}C в течение 2 мин; затем 30 циклов при соблюдении температурно-временного режима: отжиг при 55-60 ^{0}C в течение 40 с, элонгация – 1 мин при 70 ^{0}C, денатурация при 94 ^{0}C – 30 с, финальная элонгация – 2 мин. Использовали 11 SSR локусов, описанных в работе Гучетль С.З. с соавторами [12]. Электрофорез продуктов амплификации проводили в агарозном геле (2 % агароза, 1 х TAE-буфер и 1 х SB-буфер) с использованием камеры для горизонтального электрофореза (SE. 2, ДНК-технология, Россия) в течение 1-1,5 часов при силе тока 60 mA и напряжении 90-100 V. Последующее окрашивание осуществляли бромистым этидием. Визуализация и документирование результатов электрофореза обеспечивались при помощи трансиллюминатора ECX-F20.M (WILBER LOURMAT, Франция) и фотоаппарата Canon EOS 550D (Япония). Идентификацию и определение размеров алле-

лей микросателлитных локусов проводили путём сравнения со стандартным образцом – маркером молекулярной массы 100 bp (Сибэнзим, Москва)

Индекс полиморфного содержания (PIC) [13] и эффективное число аллелей (n_e) [14] вычисляли по формулам:

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^{n} P_{ij}^2$$

где –P частота j паттерна для локуса i и суммирование распространяется на n паттернов

$$n_e = 1 / \sum_{j=1}^{n} P_{ij}^2$$

где n_e – эффективное число аллелей.

В результате проведенных исследований было выявлено, что 11 пар SSR-праймеров для ПЦР выявляют стабильный, воспроизводящийся полиморфизм фракций амплифицированной ДНК. Эти локусы пригодны для молекулярно-генетической паспортизации линий, гибридов подсолнечника и для оценки генетической чистоты партий семян. При отборе маркеров, оптимальных для данной цели, использовали критерий уровня полиморфизма. Для этого в пределах использованной группы линий вычисляли наблюдаемое число аллелей на полиморфный локус (n_a), индекс полиморфного содержания (PIC) и эффективное число аллелей (n_e). Характеристики ДНК-локусов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика ДНК-локусов, использованных для паспортизации линий подсолнечника АОС ВНИИМК

Локус	Молекулярный вес продукта (п.н)	Температура отжига (^{0}C)	PIC	n_a	n_e
Har 514	180-190	55	0,58	3	2,38
Har 1608	240-280	55	0,69	4	3,22
ORS 559	100-150	55	0,48	2	1,96
ORS 1287	200-210	55	0,48	2	1,96
Har 432	175-180	60	0,41	2	1,69
Har 1327	195-205	60	0,17	2	1,20
Har 1442	0-165	60	0,49	2	1,96
ORS5	320-350	60	0,46	2	1,85
ORS 815	180-200	60	0,48	2	1,96
ORS 1144	136-177	60	0,46	2	1,85
ORS 533	170-175	60	0,48	2	1,96

Примечание: PIC – индекс полиморфного содержания; n_a – наблюдаемое число аллелей; n_e – эффективное число аллелей.

Наиболее полиморфными локусами были Har 514 и Har 1608 (наибольшее PIC, n_a, и n_e). Остальные локусы, за исключением Har 1327 с низкими показателями полиморфизма, имели средний уровень полиморфизма (n_a равное 2, PIC от

0,41 до 0,49, n_e от 1,69 до 1,9 (таблица 1)). Поэтому в работе использовали как максимально полиморфные маркеры, так и маркеры со средним уровнем полиморфизма: Har 514, Har 1608, ORS 559, Har 432, ORS5, ORS 815, ORS 1144.

Лабораторный метод определения генетической чистоты сортов сельскохозяйственных культур включает анализ 50-100 семян по 4-16 биохимическим или молекулярным маркерам [2, 5-8]. Как было отмечено ранее, для снижения стоимости и времени проведения анализа, включая как этап ПЦР, так и электрофорез продуктов реакции, локусы возможно объединять в мультиплексы. Мультиплексная ПЦР является вариантом ПЦР технологии, где афмплифицируется два или больше локуса одновременно в той же самой реакции. Поэтому нами были проведено объединение ДНК-маркеров в мультиплексы, с учетом размеров амплифицируемых фрагментов и температуры отжига праймеров (таблица 1). Четко визуализированные продукты реакции с неперекрывающимися диапазонами размеров фрагментов ДНК удалось получить лишь для 2 пар праймеров - Har 432 и ORS5 (рисунок 1).

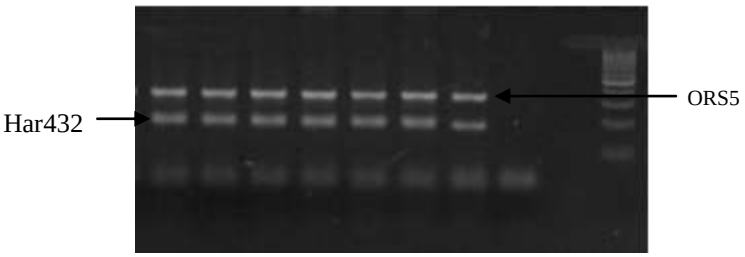
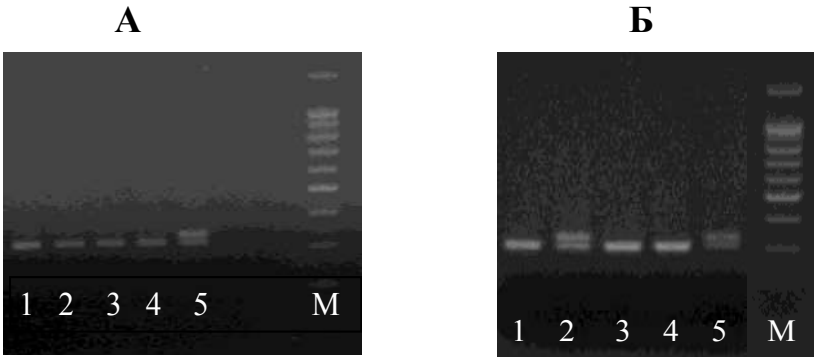


Рисунок 1. Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК мультиплексных локусов SSR ORS 5 и Har 432 у линии подсолнечника ВА 760

Поэтому эти две пары SSR-праймеров анализировались вместе, а не вошедшие в мультиплексы использовались для амплификации ДНК отдельно. Данный мультиплекс применим для анализа и линий, и гибридов. Кроме того, сократить количество анализов для линий позволило объединение аликвот ДНК отдельных проростков в одной пробирке. Смешивали по 5 аликвот ДНК проростков в одной пробирке, то есть получали 20 пробирок со смесями ДНК испытываемого образца, вместо 100 индивидуальных. После амплификации объединенный образец ДНК должен быть представлен фракцией, типичной для данной линии. В случае если на фореграмме обнаруживаются образцы с нехарактерным для линии генотипом, образцы ДНК, из которых собрана эта нетипичная смесь, амплифицируются отдельно (рисунок 2).

На рисунке 2А образец на 5-й дорожке не типичный, представлен двумя фракциями. На рисунке 2Б показаны ДНК-фрагменты отдельно амплифицированных проростков из этой нетипичной смеси. Образцы на дорожках 2 и 5 не характерны для данной линии. Для определения генетической чистоты линий, вычисляли процент типичных растений в анализированной выборке. Что касается гибридов, объединение аликвот ДНК отдельных проростков в одной пробирке возможно лишь для локусов, находящихся в гомозиготном состоянии.



А. Амплифицированные фрагменты объединенной ДНК:
дорожки 1-4 – типичные; дорожка 5 – нетипичные.
Б. ДНК-фрагменты отдельно амплифицированных пяти проростков
из нетипичной объединенной смеси ДНК

Рисунок 2. Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК локуса SSR ORS5

В таблице 2 представлены аллельные состояния микросателлитных локусов гибридов.

Таблица 2

Аллельные состояния микросателлитных локусов 7 гибридов подсолнечника

Генотипы	SSR локусы						
	Har 432	Har 514	ORS5	Har 1608	ORS 559	ORS 815	ORS 1144
Барс	175	180/190	260\270	320/350	150\100	180/200	136
Натали	175	180/190	260\270	320/350	150\100	180/200	136
Ирэн	175	180/190	260\270	320	150	180	136\ 177
Мэлин	180	180/185	260\270	320/350	150\100	180/200	136
Медас	175	180/190	270	350	150\100	180/200	136
Арис	175	180/190	240\260	320/350	150\100	180/200	136
Арнеб	180	190	260\270	320	150	180	136\ 177

Как видно из таблицы 2, в гомозиготном состоянии у гибридов Барс, Натали, Мэлин, Арис находятся 2 локуса (Har 432, ORS 1144), у Ирэн – 4 локуса (Har 432, Har 1608, ORS 559, ORS 815), у Медас – 4 локуса (Har 432, ORS5, Har 1608, ORS 1144), у Арнеб – 5 локусов (Har 432, Har 514, Har 1608, ORS 559, ORS 815). Следовательно, аликвоты ДНК проростков для анализа гибридов по данным локусам можно смешивать.

В сравнении с методами определения генетической чистоты, используемыми другими исследователями [5, 7, 8], предлагаемый оптимизированный способ является более экономичным. Он позволяет сократить количество анализов за счет использования мультиплексного набора и объединения ДНК, выделенную из отдельных проростков, в смеси.

Таким образом, для определения параметров генетической чистоты линий и гибридов подсолнечника с помощью микросателлитных локусов ДНК, с использованием критериев уровня полиморфизма были отобраны 7 пар праймеров. Для оптимизации метода две пары праймеров – ORS 5 и Har 432, были объединены в мультиплексный набор. Остальные 5 локусов амплифицировались отдельно. Сократить количество анализов для линий позволяет объединение аликвот ДНК отдельных проростков в смеси в одной пробирке. Для гибридов – объединение аликвот ДНК отдельных проростков для локусов, находящихся в гомозиготном состоянии.

Литература

1. Зайцев Н.И., Деревенец В.Н., Фролов С.С. Эффективные приемы гибридного семеноводства подсолнечника // Земледелие. 2009. № 8. С. 9-10.
2. Гучетль С.З., Челюстникова Т.А., Антонова Т.С. Некоторые особенности определения генетической чистоты линий и гибридов подсолнечника методом изоферментного анализа // Масличные культуры. Научно- технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. 2015. № 4 (164). С. 14-19.
3. Zhuang S. Application of esterase isozyme for identifying the purity of hybrid rice cultivars // Fujian Journal of Agricultural Sciences. 2004. V. 1, Is. 4. P. 247-249.
4. Nikolic Z., Vujakovic M., Jevtic A. Genetic purity of sunflower hybrids determined on the basis of isozymes and seed storage proteins // Helia. 2008. V. 31. N. 48. P. 47-54.
5. Сахарова А.Н., Андреева Г.Н., Фесенко И.А., Хрусталева Л.И., Карлов Г.И. Применение SSR-маркеров для оценки уровня гибридности семян F_1 огурца // Известия ТСХА. 2011. Выпуск 6. С. 150-155.
6. Дубина Е.В., Королёва С.В., Гаркуша С.В., Юрченко С.А, Есаулова Л.В. Разработка методической схемы оценки гибридности семян F_1 Brassica oleracea L., основанной на полиморфизме микросателитных ДНК-маркеров // Достижения науки и техники АПК. 2016. Т. 30, № 8. С. 49-51.
7. Акинина Г.Е., Тереняк Ю.Н., Шарыпина Я.Ю., Попов В.Н. Генетическая чистота семян – актуальный вопрос современной генетики и селекции растений // Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016. Т. 18. С. 56-60.
8. Антонова Т.С., Челюстникова Т.А., Гучетль С.З., Рамазанова С.А. Способ оценки типичности инбредных линий и уровня гибридности семян F_1 подсолнечника // Патент на изобретение RUS 229496504.07.2005.
9. Molecular biomarker analysis – SSR analysis of sunflower. ISO/TR 17622:2015. International standard. 2015. 11 p.
10. Токмаков С.В., Супрун И.И., Насонов А.И. Разработка мультиплексной SSR-маркерной системы для идентификации штаммов парши яблони // Микология и фитопатология. 2017. Т. 51, № 6. С. 394-403.

11. Saghai-Maroof M.A. Soliman K.M., Jorgensen R A., Allard R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics // PNAS USA. 1984. V. 81. P. 8014-8018.
12. Гучетль С.З., Фролов С.С., Зайцев Р.Н., Кузнецова Е.С. Паспортизация линий и гибридов подсолнечника селекции Армавирской опытной станции ВНИИМК: подбор оптимальных ДНК локусов и условий ПЦР // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. 2017. № 3(171). С. 23-28.
13. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях // Научно-методическое руководство / под ред. Ю.М. Сиволапа. Киев: Аграрна наука, 1998. 156 с.
14. Айала Ф., Кайгер Д. Современная генетика. Т. 3. М.: «МИР», 1988. 332 с.