

УДК 635.63:631.527.52

ПРИМЕНЕНИЕ S SR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ УРОВНЯ ГИБРИДНОСТИ СЕМЯН F₁ ОГУРЦА

А.Н. САХАРОВА, Г.Н. АНДРЕЕВА, И.А. ФЕСЕНКО, Л.И. ХРУСТАЛЕВА, Г.И. КАРЛОВ

(Центр молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

Предложена система оценки уровня гибридности семян F₁ огурца, включающая в себя оптимизированный метод экспресс-выделения ДНК для массовых анализов и SSR-ПЦР с визуализацией результатов методом гель-электрофореза в 3%-м агарозном геле.

Ключевые слова: гибриды огурца, полимеразная цепная реакция (ПЦР), ДНК-маркеры, SSR-маркеры.

Огурец посевной (*Cucumis sativus L.*) — один из самых древних и наиболее популярных видов овощных культур, а его мировое производство составляет более 23 млн т. в год [7]. В России огурец является самой распространенной овощной культурой защищенного грунта, занимая около 70% площадей. В открытом грунте огурец занимает третье место по площади после капусты и томата [3].

Рост производства этой ценной овощной культуры тесно связан с использованием гетерозисных гибридов. В настоящее время подавляющее большинство используемых в производстве семян огурца, выращиваемых как в открытом, так и защищенном грунте, — это гибриды F₁. Растения таких гибридов более однородны и выровнены по своим биологическим и морфологическим признакам, чем сорта. Учитывая потребности рынка семян, селекционеры ежегодно создают новые гибридные комбинации с различными качественными характеристиками. В 2011 г. в Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию, зарегистрировано 790 гибридов F₁ огурца и 53 сорта [2].

Поддержание генетической чистоты линий и высокого (близкого к 100%) уровня гибридности является необходимым условием для успешного производства коммерческих гибридных семян [8]. Существующий для определения генетической чистоты метод грунтового контроля семян энергозатратен, получаемая оценка — субъективна, а главное — требует длительного времени.

Наиболее удобными для характеристики генотипов являются маркеры, основанные на полиморфизме нуклеотидных последовательностей ДНК (ДНК-маркеры). С помощью данных маркеров можно проводить оценку гибридной чистоты партий семян, как части процесса их сертификации.

Современные технологии, основанные на применении систем на базе ДНК-маркеров (RAPD, SSR, ISSR), успешно применяются для молекулярно-генетической характеристики гибридов и их родительских форм. Все вышеуказанные маркеры успешно применялись для характеристики молекулярно-генетического полиморфизма селекционных линий огурца [1]. Наиболее надежными и воспроизводимыми

являются SSR-маркеры, основанные на полиморфизме длины коротких (2-6 нуклеотидов) повторов (микросателлитов), распределенных по всему геному [5]. Применение SSR-маркеров по сравнению с другими методами обеспечивает высокую надежность и воспроизводимость. Кодоминантный характер проявления этих маркеров позволяет отличать гомо- и гетерозиготные растения, что имеет большое значение для раннего выявления гибридов и существенно экономит время при создании новых селекционно-значимых исходных форм. Исследования генома огурца с использованием SSR-маркеров показали относительно высокий уровень их полиморфизма (около 30%) (более 2 аллелей/локус) [9].

Цель данной работы — создание эффективной системы оценки чистоты гибридности гетерозисных гибридов F₁ огурца на основе молекулярно-генетического полиморфизма микросателлитных локусов ДНК.

Материалы и методы

В работе был использован следующий растительный материал: семена огурца 36 инбредных линий и 9 гибридов между ними, обозначаемых в тексте гибридными комбинациями под соответствующими номерами ГК1 — ГК9, а также гибриды F_j под номерами 46, 47, 49, 50, 54, 57, 58, 59, 60, 61, 68, 98 и 99 селекционно-семеноводческой фирмы «Манул»; гибриды F_;: Кураж, Атлет, Аббат, Циник, Амир, Раис, Аль-Бируни, Карим и Айкас селекционно-семеноводческой фирмы «Гавриш». Семена проращивали в чашках Петри при температуре 24°C. ДНК выделяли из семян 4-5-дневных проростков огурца. Экстракцию ДНК для SSR-анализа проводили по следующим методам: 1 — [4] с модификациями; 2 — [10] с модификациями; 3 — [6]. Качество и количество выделенной ДНК определяли по выходу ПЦР-продукта с помощью спектрофотометра Nanodrop 1000.

Для микросателлитного анализа были использованы 19 пар SSR-праймеров [9], синтезированных в ЗАО «Синтол» (Москва). ПЦР осуществляли по следующей программе: предварительная денатурация — 94°C, 3 мин; 30 циклов при 94°C по 30 с, отжиг — 55-65°C (в зависимости от праймера), 30 с, элонгация — 72°C, 30 с, завершающая элонгация — 72°C, 7 мин на амплификаторе «DNA Engine Tetrad 2» («Bio-Rad», USA). Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 3%-м агарозном геле с бромистым этидием. Результаты документировали в системе Gel-Doc («Bio-Rad», USA). Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы «100 bp DNA-Ladder» (Fermentas).

Для проведения фрагментного анализа при постановке ПЦР вместо одного из праймеров добавляли аналог, меченный флуорофором 6-FAM. Разделение продуктов ГТЦП осуществляли на секвенаторе ABI 3130x1 («Applied Biosystems») согласно инструкции фирмы-производителя, используя маркер длины фрагментов GeneScan 500 LIZ. Анализ размера фрагментов проводили с помощью программного обеспечения Gene Mapper 3.0.

Результаты и их обсуждение

При проведении массовых анализов методика выделения ДНК должна обеспечивать надежность и воспроизводимость результатов, а также высокую пропускную способность. В таблице 1 приведены результаты выделения ДНК одних и тех же контрольных образцов огурца.

Как видно из таблицы 1, выделение наиболее очищенной ДНК обеспечивает использование метода 1. Исследуемые образцы, полученные по этому методу, имели

следующие близкие к оптимальным показатели: отношение $A\ 260/280 = 1,96$, отношение $A\ 260/230 = 2,21$.

Выделенную тремя разными методами ДНК использовали для проведения S SR-ПЦР. На электрофоре граммах была выявлена четкая амплификация микросателлитных фрагментов у образцов ДНК, выделенных по методам 1 и 2. Эти результаты указывают на то, что несмотря на наличие большого количества загрязняющих примесей в ДНК, выделенной по второму методу по сравнению с первым, их наличие не вызывает ингибирование ПЦР. Так как метод 2 [10] (с собственными модификациями) менее трудоемкий и менее затратный, а также позволяет за минимальное время получить качественную ДНК из большого числа образцов, в количестве, достаточном для проведения ПЦР-анализа, он был выбран для дальнейших исследований.

С целью снижения затрат для микросателлитного анализа использовали агарозный гель-электрофорез ДНК. В результате проведенного анализа с использованием 19 маркеров были получены четкие электрофоретические профили у всех 67 образцов огурца. Профили электрофоретического разделения продуктов амплификации ДНК гибридов сравнивали с родительскими. Число аллелей по локусам варьировало от 1 (маркеры 2AS, 7C, I2A, I2C, CT23, LK02, AGO1, ASO1, G06, AGT04, CT12Z, AG13C, CT33, TG10, ACC01) до 2 (маркеры F03, IS, FLK1, GA09). Наиболее полиморфные фрагменты (2 из 2) были получены с использованием праймеров трех маркеров IS, FLK1 и GA09. Данные маркеры выявляют полиморфизм у исходных родительских форм, амплифицируя по одному фрагменту разного размера, что позволяет идентифицировать их гибридное потомство по сумме выявленных фрагментов в агарозном геле. Так, с использованием SSR-маркера IS амплифицировалось по одному фрагменту размером около 180 и 220 п.н. у родительских форм гибридных комбинаций ГК1, ГК2 соответственно и оба этих фрагмента у гибридов между этими формами.

Праймеры SSR-маркера GA09 амплифицировали два фрагмента размером около 300 и 330 п.н. у гибридов под номерами 60 и 61, а также у гибридов F₁ Карим и Айкас. Праймеры SSR-маркера FLK амплифицировали два фрагмента размером около 310 и 340 п.н., у гибридов F₁ Кураж, Атлет, гибридов под номерами 47, 50, 57, 58,

59, 68, 98, а также у гибридов в комбинациях ГК1, ГК2, ГК3. У родительских форм гибридных комбинаций 1 и 2 (ГК1, ГК2) было получено по одному фрагменту (рис. 1).

Для подтверждения надежности полученных результатов использовали высокоразрешающий фрагментный анализ на основе капиллярного гель-электрофореза. Результаты высокоразрешающего фрагментного анализа полностью совпали с данными, полученными при использовании агарозного гель-электрофореза ДНК. Был выявлен полиморфизм между исходными родительскими формами и гибридная при-

Результаты выделения ДНК

Метод	Среднее количество ДНК, ng/ul	A 260/280	A 260/230
1	335,44	1,96	2,21
2	420,92	1,61	2,40
3	465,37	1,57	0,76

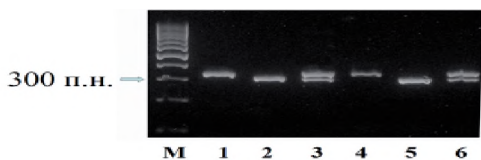


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации SSR-маркеров FLK: 1-3 — гибридная комбинация 1 (ГК1), где 1 — родительская форма (РФ)♀, 2 — РФ ♂, 3 — гибрид между ними, 4-6 — ГК2, 4 — РФ♀, 5 — РФ♂, 6 — гибрид между ними. М — маркер размеров «100 bp»

рода растений Fj (рис. 2). Как видно из рисунка 2 В, у гибрида Кураж амплифицировались 2 фрагмента размером 306 п.н. и 344 п.н., характерных для исходных родительских форм (см. рис. 2 А, В), что указывает на гибридную природу образца.

При проведении массовых анализов применение протестированных нами маркеров позволяет оценивать уровень гибридности семян Fj в течение семи дней (проращивание семян, выделение ДНК, ГЦР, гель-электрофорез, документирование результатов), что значительно быстрее, чем при проведении традиционного грунтового контроля (2-3 мес.). Пример проведения массового анализа семян Fj представлен на рисунке 3.

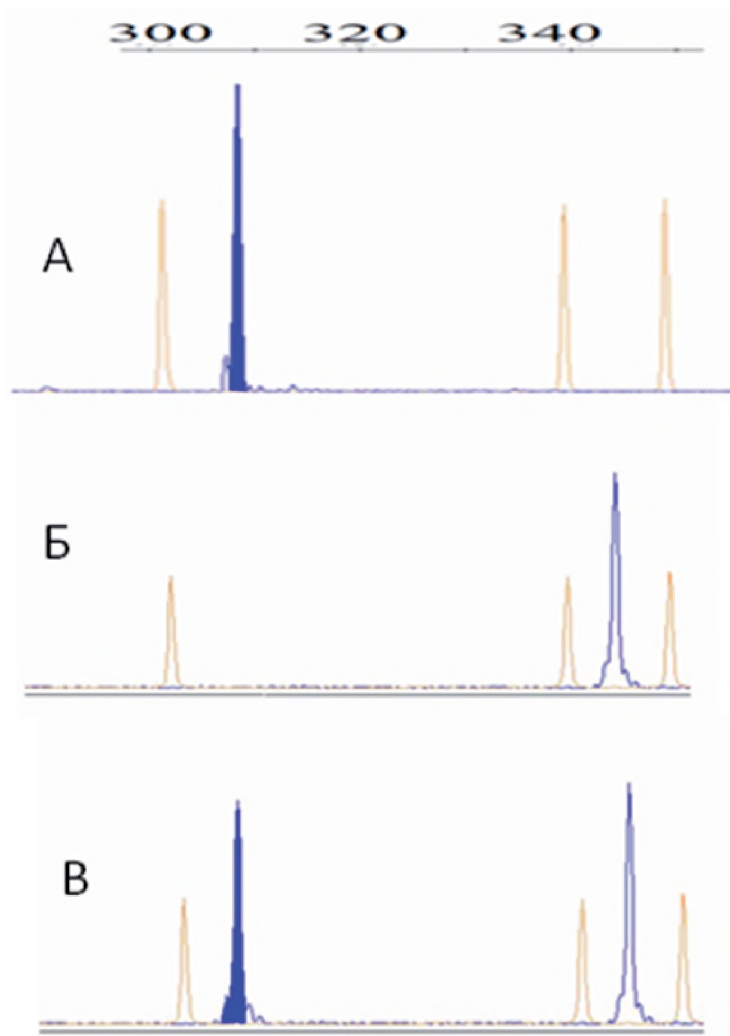


Рис. 2. Фрагментный анализ SSR-маркера FLK: А и Б — исходные родительские формы гибрида F., Кураж (В). Желтые пики — маркер размеров, синие пики — продукты амплификации SSR-маркера FLK

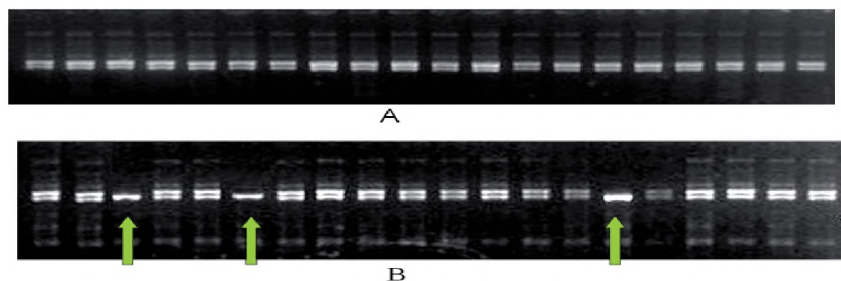


Рис. 3. Электрофореграммы продуктов амплификации маркера FLK: А — все образцы гибриды; В — стрелками указаны негибридные образцы

Таким образом, на основе полученных данных показана эффективность SSR-маркеров F03, FLK01, IS, GA09 для оценки уровня гибридности семян F_j при использовании агарозного гель-электрофореза.

Заключение

Создана надежная система оценки чистоты гибридов, включающая в себя оптимизированные методы: экспресс-выделение ДНК для массовых анализов и SSR-ПЦР с визуализацией результатов в 3%-м агарозном геле.

Предложенная система эффективна для мониторинга чистоты гибридных семян огурца, а также может быть использована для защиты авторских прав селекционеров при создании новых гибридных комбинаций.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках выполнения ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» ГК № 16.552.11.7032 от 29 апреля 2011 г. на оборудовании ЦКП «ВНИИСБ».

Библиографический список

1. Байназарова А.Н., Карлов Г.П. Хрусталева Л.И. Изучение полиморфизма генома огурца посевного (*Cucumis sativus* L.) с помощью ISSR-маркеров // Известия ТСХА, 2007. Вып. 1. С. 56-60.
2. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию на территории РФ на 2011 год.
3. Материалы сайта: <http://www.greenhouses.ru/cucumber>.
4. Bernatzky R., Tanks lev S.D. Genetics of actin-related sequences in tomato // Theor. Appl. Genet., 1986. 72:314-324.
5. Brown S.M., Szewc-McFadden A.K., Kresovich S. Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis // Methods of plant genome analysis of plants (Ed. JauharP.P.). New York. CRC, 1996. P. 147-162.
6. Chen Wen-vile, Cui Hai-ruì, Jin-song, Zhou Xiang-sheng, Shu Oing-yao. A simplified Rice DNA Extraction Protocol for PCR Analysis//Rice Science, 2006. 13 (0:67-70).
7. Cucumber (Book/Chapter) / J.E. Staub, M.D. Robbins, T.C. Welmer. Handbook of Plant

Breeding. New York:Springer Science and Business, 2008. P. 241-282.

8. *Duca M., Port A., Levitchi A.* Characteristics of RAPD markers inbreeding of *Cucumis sativus* L. // Roumanian Biotechnological Letters, 2008. Vol. 13. №. 4. P. 3843-3850.

9. *Fazio G., Chung S.M., Staub J.E.* Development and characterization of PCR markers in cucumber (*Cucumis sativus* L.) // Journal of the American Society of Horticultural Sciences, 2002. Vol. 127. P. 545-557.

10. *Hong Y.K., Courv DA., Polne-Fuller M., Gibor A.* Lithium chloride extraction of DNA from the seaweed *Porphyra perforata* (Rhodophyta) // J. Phycol., 1992. 28: 717-720.

Рецензент – к. с.-х. н. Г.Ф. Манахос

SUMMARY

A system for evaluation of genetic purity of FI hybrid seed of cucumber was developed. The system is based on simple sequence repeat (SSR) markers and includes an optimized method of rapid DNA extraction for mass analysis and SSR-PCR with visualization of the results by gel electrophoresis in 3% agarose gel.

Key words: FI cucumber hybrid, PCR, DNA-markers, SSR-markers.

Сахарова Анна Николаевна — к. б. н. Тел. (499) 977-70-01.

Андреева Галина Николаевна — к. б. н.

Фесенко Игорь Александрович — к. б. н.

Хрусталева Людмила Ивановна — д. б. н.

Карлов Геннадий Ильич — д. б. н. Тел. (499) 977-70-01.

Эл. почта: karlovg@gmail.com; karlov f/ timacad.ru.