

Идентификация типа цитоплазмы линий *Beta vulgaris* L. с использованием ПЦР в реальном времени

Е.О. КОЛЕСНИКОВА, канд. биол. наук, руководитель отдела биотехнологии (e-mail: kolesnikovaeo@souzsemsvekla.ru)
Р.В. БЕРДНИКОВ, канд. с/х наук, генеральный директор
А.В. ЛИНОВ, специалист отдела биотехнологии
ООО «СоюзСемСвекла»

Введение

Современные селекционные программы по сахарной свёкле (*Beta vulgaris* L.) направлены на создание отечественных гибридов, обладающих целым рядом ценных признаков. В работе селекционеры сталкиваются с определёнными трудностями. Одна из них заключается в том, что данная культура является двулетней, соответственно, на фенотипическое подтверждение признака требуется больше времени и трудозатрат. В связи с этим для выявления различных свойств и отбора селекционного материала целесообразно применение биотехнологий, в том числе молекулярно-биологических методов, использование которых должно быть максимально производительным [1, 6].

Создание современных гибридов сахарной свёклы основано на использовании цитоплазматической мужской стерильности, описанной F.V. Owen ещё в 1945 г. [3]. На тот момент не были известны молекулярно-генетические аспекты проявления данного признака. Однако технологии развивались, и в 2000 г. группой учёных под руководством Satsuki Nishizawa было установлено, что проявление ЦМС обуславливает полиморфизм в митохондриальном геноме сахарной свёклы, в котором был обнаружен участок, содержащий минисателлитные повторы. Позже на их основе был создан молекулярный маркер, позволяющий идентифицировать тип цитоплазмы сахарной свёклы. Так, у образцов с нормальным типом цитоплазмы (N-тип) размер продукта маркера TR3 составляет 450 п. н., а у образцов со стерильным типом цитоплазмы (S-тип) – 350 п. н. [2]. Этот молекулярный маркер получил широкое распространение.

На данный момент его эффективность считается подтверждённой рядом исследований [4, 5].

При получении линий и создании гибридов в селекционно-генетическом центре ООО «СоюзСемСвекла» на постоянной основе ведутся работы по выявлению хозяйственно ценных признаков сахарной свёклы с использованием генотипирования. Такой подход позволяет определить тип цитоплазмы и другие показатели исследуемых образцов на начальной стадии развития и не требует получения взрослого растения. В селекционную программу предприятия внедрено применение в том числе маркера стерильности цитоплазмы. Анализ исследуемых образцов включает в себя проведение ПЦР с последующей визуализацией продукта в агарозном геле. Для повышения производительности данного метода было решено перевести молекулярный маркер TR3 на платформу ПЦР в реальном времени с последующей оценкой кривых плавления полученного продукта.

Материалы и методы

Объектом исследования служили образцы листьев микроклонов сахарной свёклы различных генотипов *in vitro*, полученные в селекционно-генетическом центре «СоюзСемСвекла». Для этого были отобраны пять линий по три образца в каждой: 1-МС (образцы 7403, 7405, 7406), 2-МС (7416, 7419, 7420), 3-МС (7451, 7452, 7453), 1-От (7395, 7397, 7398), 2-От (7441, 7444, 7446).

ДНК выделяли из листьев массой 50–100 мг колоночными наборами Qiagen DNeasy Plant Pro Kit по методике производителя. Оценку количества и каче-

ства выделенной ДНК осуществляли спектрофотометрически на Implen NP80.

В целях выявления типа цитоплазмы использовали маркер TR3. Синтез праймеров был осуществлён компанией НПК СИНТОЛ. Последовательности праймеров для маркера TR3:

5'-AGAACTTCGATAGGCGAGAGG-3'
5'-GCAATTTTCAGGGCATGAACC-3'.

ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе Bio-Rad CFX384 с наборами «Биолабмикс БиоМастер» HS-qPCR SYBR Blue (2×). Обработку полученных результатов и анализ кривых плавления осуществляли в программе Bio-Rad CFX Manager.

Разделение и визуализация продуктов ПЦР происходили в 1,5%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия при 70В в течение 1 ч. 30 мин. Детекцию результатов выполняли на геледокументирующей системе Bio-Rad GelDoc Go.

Результаты и обсуждение

В процессе работы ранее была проведена оценка эффективности молекулярного маркера TR3, при этом определён тип цитоплазмы с помощью ПЦР и выполнены цитологические исследования проанализированных образцов по признаку фертильности пыльцевых зёрен. Результаты, полученные с помощью микроскопии пыльцы, коррелировали с данными молекулярно-генетического анализа стерильности цитоплазмы.

Из листьев микроклонов исследуемых образцов была выделена суммарная ДНК. Спектрофотометрический анализ показал достаточную её концентрацию в интересах дальнейших исследований, а соотноше-

ние поглощения A260/A280 в пределах 1,8 свидетельствовало о низком уровне загрязнения полученных препаратов (см. табл.).

Для исполнения последующей работы ДНК была нормализована до концентрации 10 нг/мкл. При проведении ПЦР в реальном времени детекция флуоресценции осуществлялась на этапе отжига праймеров (рис. 1).

Далее проанализировали кривые плавления с шагом 0,5 °С (рис. 2). Были получены два пика – при 83,5 и 84,5 °С. Причём для образцов со стерильным типом цитоплазмы, которые представлены 1-МС, 2-МС, 3-МС, был характерен пик при 83,5 °С, а для образцов с нормальным типом цитоплазмы – линии 1-От, 2-От – соответствовал пик при 84,5 °С.

Чтобы оценить визуально полученные в ходе ПЦР продукты, провели электрофорез в агарозном геле

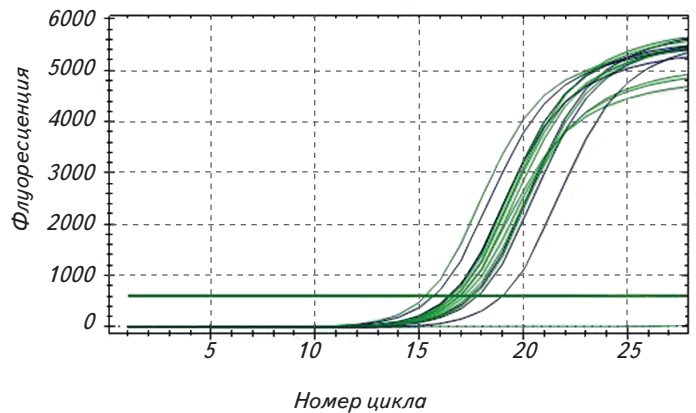


Рис. 1. Амплификация продукта ПЦР с маркером стерильности цитоплазмы TR3. Зелёным окрашены образцы линий со стерильной цитоплазмой – 1-МС, 2-МС, 3-МС; синим – линии с нормальным типом цитоплазмы – 1-От, 2-От

Результаты спектрофотометрического анализа ДНК микроклонов исследуемых образцов сахарной свёклы

Линия	Номер образца	Концентрация ДНК, нг/мкл	A260/A280
1-МС	7403	31,550	1,808
1-МС	7405	50,850	1,839
1-МС	7406	56,950	1,777
2-МС	7416	36,350	1,778
2-МС	7419	26,700	1,841
2-МС	7420	35,650	1,769
3-МС	7451	42,200	1,986
3-МС	7452	37,600	2,011
3-МС	7453	30,850	1,898
1-От	7395	29,200	1,805
1-От	7397	23,850	1,900
1-От	7398	54,950	1,814
2-От	7441	44,150	1,936
2-От	7444	26,750	1,924
2-От	7446	73,800	1,960

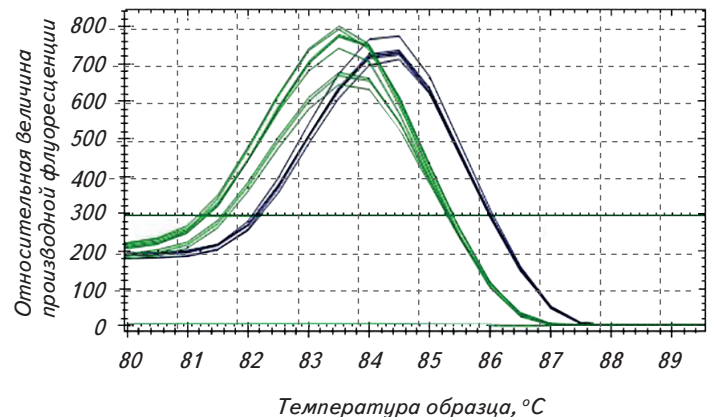


Рис. 2. Кривые плавления продукта ПЦР с маркером стерильности цитоплазмы TR3. Зелёным окрашены образцы линий со стерильной цитоплазмой – 1-МС, 2-МС, 3-МС; синим – линии с нормальным типом цитоплазмы – 1-От, 2-От

(рис. 3), с помощью которого выявили два типа продуктов – размером 370 и 450 п. н. Для образцов со стерильным типом цитоплазмы (линии 1-МС, 2-МС, 3-МС) был характерен продукт размером 370 п. н., а для линий с нормальным типом цитоплазмы (1-От, 2-От) – 450 п. н. Разница в размере продуктов и обуславливала различие в пиках плавления, которые были детектированы амплификатором.

Использование в исследовании интеркалирующего красителя SYBR Green I, входящего в состав буфера для ПЦР, даёт возможность детектировать ход реакции в реальном времени и исключить ошибки при раскапывании. Последующий анализ кривых плавления позволяет отказаться от разделения и визуализации продукта в агарозном геле, что сокращает время работы практически вдвое. При этом снижается канцерогенная нагрузка на персонал лаборатории ввиду исключения манипуляций с бромистым этидием. Также стоит отметить, что проведение ПЦР в реальном времени является более чувствительным и современным методом. Выявленные два пика плавления, характерные для МС-форм и для О-типов, хорошо визуализируются, что может быть использовано в целях выполнения высокопроизводительного анализа образцов.

Заключение

В ходе исследований было выявлено, что идентифицированный тип цитоплазмы образцов соответствовал ранее заявленной селекционной форме линий сахарной свёклы *in vitro* компании «СоюзСемСвекла».

Установлено, что для растений со стерильным типом цитоплазмы, размер продукта которых составлял 370 п. н., был характерен пик кривой плавления при 83,5 °С, для растений с нормальным типом цитоплазмы с размером продукта 450 п. н. пик кривой плавления наблюдался при 84,5 °С. Таким образом, была установлена возможность использования технологии ПЦР в реальном времени при выявлении типа цито-

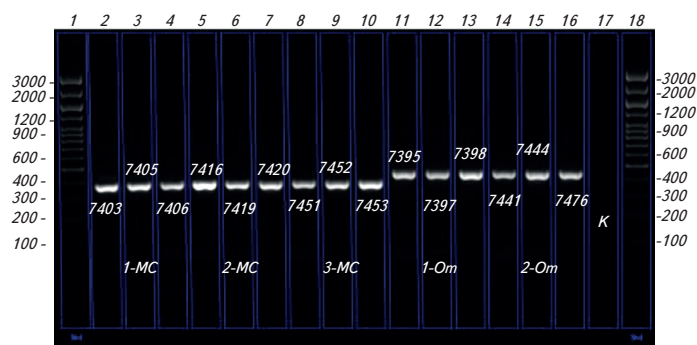


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР с маркером стерильности цитоплазмы TR3. 2–16 – исследуемые образцы; 1 и 18 – маркер длин ДНК Биолабмикс Step 100 Long; 17 – отрицательный контроль

плазмы у растений сахарной свёклы, что улучшает качество анализа и сокращает время исследования. Это позволяет применять автоматизированные системы пробоподготовки и амплификатора в реальном времени с поддержкой 384 луночных планшетов и тем самым в значительной степени повышает производительность и точность процесса.

Список литературы

1. Biotechnological methods as a tool for efficient sugar beet breeding / T.P. Zhuzhzhhalova, E.O. Kolesnikova, E.N. Vasilchenko, N.N. Cherkasova // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2020. – V. 24. – № 1. – P. 40–47.
2. Nishizawa, S. Variable number of tandem repeat loci in the mitochondrial genomes of beets / S. Nishizawa, T. Kubo, T. Mikami // Current Genetics. – 2000. – V. 37. – № 1. – P. 34–38.
3. Owen, F.V. Cytoplasmically inherited male-sterility / F.V. Owen // Journal of Agricultural Research. – 1945. – V. 71. – P. 423.
4. Ohgami, T. Identification of molecular variants of the nonrestoring restorer-of-fertility 1 allele in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) / T. Ohgami [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2016. – V. 129. – № 4. – P. 675–688.
5. Cheng, D. Mitochondrial genome diversity in *Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* (Leaf and Garden Beet Groups) and its implications concerning the dissemination of the crop / D. Cheng [et al.] // Genetic resources and crop evolution. – 2011. – V. 58. – № 4. – P. 553–560.
6. McGrath, J.M. Sugar beet breeding / J.M. McGrath, L. Panella // Plant breeding reviews. – 2018. – V. 42. – P. 167–218.

Аннотация. В статье рассмотрен новый подход к выявлению типа цитоплазмы у растений сахарной свёклы, заключающийся в выполнении молекулярно-генетического анализа с маркером TR3 на платформе ПЦР в реальном времени. В отличие от проведения ПЦР с последующей визуализацией продукта в агарозном геле рассматриваемый метод позволяет повысить производительность данного исследования. В результате проделанной работы была выявлена возможность идентификации типа цитоплазмы МС-форм и О-типов на основе ПЦР в реальном времени с последующей оценкой кривых плавления полученного продукта.

Ключевые слова: сахарная свёкла, МС-форма, О-тип, ПЦР, цитоплазматическая мужская стерильность, молекулярный маркер.

Summary. The article discusses a new approach to identifying the type of cytoplasm in sugar beet plants, which consists in conducting molecular genetic analysis with the TR3 marker on the real-time PCR platform. Unlike PCR with subsequent visualization of the product in agarose gel, the method under consideration allows to increase the productivity of this study. As a result of the work carried out, the possibility of identifying the type of cytoplasm of MC-forms and O-types based on real-time PCR was revealed, followed by an assessment of the melting curves of the resulting product.

Keywords: sugar beet, MS-form, O-type, PCR, cytoplasmic male sterility, molecular marker.