

УДК 575: 633.18.03

**АПРОБАЦИЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО SSR-АНАЛИЗА ДЛЯ ДНК-ПАСПОРТИЗАЦИИ СОРТОВ РИСА**

Супрун Иван Иванович  
вед. научн. сотр., к.б.н.  
SPIN-код (РИНЦ):7124-5304

Ковалев Виктор Савельевич  
д.с.-х.н  
зам. директора по научной работе  
*Всероссийский научно-исследовательский институт риса, п. Белозерный, г. Краснодар, Россия. E-mail: [supruni@mail.ru](mailto:supruni@mail.ru)*

В настоящей статье приведены результаты апробации мультиплексных наборов SSR-маркеров для генотипирования сортов риса. Были сформированы два набора SSR-маркеров, включающие в сумме 7 маркеров:  
1: RM1+ RM11+ RM70+RM122;  
2: RM164+RM167+RM168. Оптимальные сочетания ДНК-маркеров в наборах и условия ПЦР позволили получать точные, легко интерпретируемые результаты при выполнении фрагментного анализа на автоматическом генетическом анализаторе ABIprism3130. С использованием мультиплексных наборов было выполнено генотипирование ряда отечественных сортов риса и сорта ИР-36 селекции Международного научно-исследовательского института риса. Для всех изученных сортов были получены специфичные SSR-фингерпринты. Маркер RM168 у отечественных сортов проявил низкий уровень полиморфизма - один аллель 97 п.н. Однако, при этом, у сорта ИР-36, селекции Международного научно-исследовательского института риса по данному локусу идентифицировался второй тип аллеля 107 п.н.. Кроме того, по локусам RM1, RM11, RM167 и RM164 данный сорт имеет уникальные аллели, Это согласуется со значительными генетическими различиями данного сорта и остальных сортов из изученной выборки. Предложенные мультиплексы перспективны для использования в ДНК-паспортизации сортов и оценке генетического разнообразия

Ключевые слова: РИС, ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ, SSR-МАРКЕРЫ, ДНК - ПАСПОРТИЗАЦИЯ, АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ, МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ПЦР

UDC 575: 633.18.03

**APPROBATION OF MULTIPLEX SSR-ANALYSIS FOR DNA-FINGERPRINTS OF RICE VARIETIES**

Suprun Ivan Ivanovich  
Cand.Biol.Sci., Leader researcher  
RSCI SPIN:7124-5304

Kovalev Viktor Savelievich  
Dr.Sci.Agr.  
Deputy director on science  
*All Russian Rice Research Institute, p. Belozerny, Krasnodar, Russia. E-mail: [supruni@mail.ru](mailto:supruni@mail.ru)*

Results of testing of multiplex sets SSR-markers for genotyping of rice varieties are presented in the article. Two sets of SSR-markers were formed:  
1: RM1+ RM11+ RM70+RM122;  
2: RM164+RM167+RM168.  
The optimal combination of DNA markers in the multiplex sets and PCR conditions allowed obtaining accurate, easily interpretable results when performing fragment analysis on automated genetic analyzer ABIprism3130. Using multiplex sets, genotyping was performed for several varieties of rice: domestic breeding and one variety – IR36 from the breeding of IRRI (Manila, Philippines). For all the studied varieties specific SSR-fingerprints were obtained. RM 168 marker showed in domestic varieties a low level of polymorphism - one allele of 97 bp. However, at the same time, the variety IR-36, showed a second type of allele 107 bp. In addition, the loci of RM1, RM11, RM167 and RM164 have unique alleles in this variety. It is consistent with significant genetic differences of these varieties and the rest of the varieties in studied sample. The proposed SSR multiplexes are promising for use in DNA certification of rice varieties and assessment of genetic diversity

Keywords: RICE, SSR, DNA-FINGERPRINTS, ALLELIC POLYMORPHISM, MULTIPLEX PCR

Использование молекулярных ДНК-маркеров открывает большие перспективы для детального картирования хромосом, идентификации

генов, их клонирования и конструирования новых сортов растений. С введением молекулярных маркеров в практику биологических исследований появились новые возможности изучения генетического разнообразия, определения родства на внутри- и межвидовом уровне. Многочисленными исследованиями было показано, что одна из наиболее информативных ДНК-систем молекулярного маркирования сельскохозяйственных культур – так называемые микросателлитные последовательности ДНК (SSR). В геномы эукариот сплошь встроены простые последовательности, которые могут состоять из 4, 3, 2 и даже одного нуклеотида. Позже эти регионы были названы «микросателлитами» [1, 2].

Источник полиморфизма этих последовательностей – в сайт-специфическом варьировании длины повтора, что в свою очередь обусловлено различием в числе единиц повтора. Эксперименты по изучению генетического разнообразия культурного риса обнаружили до 25 аллелей на один микросателлитный локус. У риса наиболее часто встречаются динуклеотидные повторы типа (AT) $n$ , (GA) $n$ , (GT) $n$ , причем AT-повторы являются наиболее полиморфными и могут быть использованы для определения степени генетического родства между близкими по происхождению сортами [3], среди тринуклеотидных повторов преобладают (GGT) $n$  [4], из тетрануклеотидных повторов следует отметить (GATA) $n$  - как наиболее распространенный в геноме риса [5].

В результате работ Akagi et al (1996) и McCouch et al (1997) при скрининге геномной библиотеки риса общее количество микросателлитов было оценено в 5700-10000, причем относительная частота встречаемости различных повторов уменьшается с увеличением размера повтора [6, 7].

Последующее секвенирование генома риса позволило предположить, что общее количество микросателлитных последовательностей, составляет порядка 100000 [5].

С использованием микросателлитных ДНК-маркеров в мире выполнен широкий перечень исследований по оценке генетического разнообразия и ДНК-паспортизации сортов. Так, в работе авторского коллектива из Индии была выполнена оценка уровня полиморфизма 50 SSR-маркеров на выборке из 24 сортов риса подвида Индика. При этом, на основе полученных данных, не только отобрали наиболее полиморфные ДНК-маркеры для дальнейшего изучения индийского генофонда, но и оценили степень генетического родства изученных сортов и составили их ДНК-паспорта [8].

В другом исследовании, выполненном международным научным коллективом из Южной Кореи и Китая, было выполнено генотипирование 150 сортов риса, представляющих генетические ресурсы Южной Кореи, Китая и Японии, использовали выборку из 28 SSR-маркеров для оценки генетических дистанций изученных групп генотипов и сравнительного анализа уровня генетического разнообразия внутри групп. Было выявлено, что наибольшим уровнем аллельного полиморфизма по изученным локусам обладает генплазма риса из Южной Кореи. Наименьшим уровнем аллельного разнообразия обладала выборка генотипов из Японии. Общий уровень генетического разнообразия внутри групп южнокорейских и китайских сортов риса был выше, чем в выборке сортов из Японии [9]. Наряду с анализом генетической структуры коллекций сортов риса, SSR-маркеры также успешно применяются и для изучения генетического разнообразия природных популяций дикорастущих предковых видов риса [10], а также для анализа генетических взаимосвязей между современными сортами, стародавними сортами народной селекции и дикорастущими формами [11, 12].

Очевидно, что SSR-маркеры являются эффективной ДНК - маркерной системой для выполнения широкого спектра исследований, направленных на анализ генетического разнообразия коллекций генофонда риса, изучение филогенетических взаимосвязей на уровнях подвид/вид/род. В связи с этим в задачу работы входило формирование и апробация мультиплексных наборов SSR-маркеров, позволяющих эффективно проводить генотипирование сортов риса. Разработанные наборы были успешно использованы для SSR-паспортизации ряда сортов риса из коллекции генетических ресурсов ВНИИриса.

### **Материал и методы исследований**

Образцы ДНК выделяли из свежесрезанной части листовой пластинки гибридных растений на различных стадиях вегетационного развития. Экстракцию ДНК проводили буфером следующего состава: 20мл 1М Tris-HCl (pH 7.5), 5 мл 5MNaCl, 5 мл 0.5MEDTA (pH 8.0), 5 мл 10% SDS в общем объеме 100 мл. Часть листа (2-3см) растирали в 500 мкл экстрагирующего буфера в пластиковой пробирке объемом 1,5мл. Инкубировали образцы при 600С в течение 3 часов. Отделяли супернатант центрифугированием при 12000 об/мин. К перенесенной в чистую пробирку верхней фазе добавляли 500 мкл изопропанола, оставляли для преципитации на 10-20 минут при комнатной температуре, предварительно перемешав. После этого образец центрифугировали 5 минут при 12000 об/мин, полученный осадок промывали 300мкл 70% этанола, высушивали и растворяли в 200мкл 0,1\*TE. В ПЦР смесь добавляли по 2,5 мкл раствора ДНК, выделенного данным методом.

ПЦР проводили по стандартным методикам, но с выполнением предварительной оптимизации ряда параметров реакции [13]. Предварительную оценку продуктов ПЦР проводили электрофорезом в 2%

агарозном 30-50 минут при напряжении 150V. В качестве красителя использовали бромистый этидий; гелевые пластины визуализировали в ультрафиолете.

Анализ размеров амплифицированных фрагментов SSR - маркеров проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABIprism 3130. Обработку данных осуществляли в программе GeneMapper 4.1. Фрагментный анализ SSR-маркеров был выполнен на оборудовании ЦКП «Геномные и постгеномные технологии» ФГБНУ СКЗНИИСиВ.

При объединении ДНК-маркеров в мультиплексные учитывали размеры амплифицируемых фрагментов, температуру отжига праймеров, степень самокомплементарности праймеров, вносимых в одну смесь.

## **Результаты**

В ходе выполнения исследований, на основании анализа литературных данных были отобраны 14 SSR-маркеров, из которых на данный момент апробированы 7 маркеров: RM1, RM11, RM70, RM122, RM164, RM167, RM168. Маркеры объединены в два мультиплексных набора, позволяющих проводить генетический анализ одновременно по 3 и 4 микросателлитным локусам одновременно. При этом SSR-маркеры, входящие в один мультиплексный набор, имеют неперекрывающиеся диапазоны размеров амплифицированных фрагментов. Это обеспечивает избегать ошибочной идентификации при детекции размеров ампликонов на автоматическом генетическом анализаторе ABIprism 3130. Для каждого из маркеров в мультиплексном наборе был использован специфичный для него флуоресцентный краситель: карбоксифлуоресцеин (FAM), 6-карбоксиродамин (R6G), карбокси-X-родамин (ROX), тетраметилкарбоксиродамин (TAMRA). Каждый из приведенных красителей имеет разные оптические спектры флуоресценции, что позволяет проводить в одной реакции одновременную идентификацию

нескольких фрагментов, синтезированных с использованием праймеров, меченых разными красителями. В таблице 1 представлены разработанные мультиплексные наборы.

Таблица 1 Мультиплексные наборы SSR-маркеров

MLPX1	MLPX2
RM1 (TAMRA)	RM164 (TAMRA)
RM11 (ROX)	RM167 (ROX)
RM70 (R6G)	RM168 (R6G)
RM122 (FAM)	

При формировании комбинаций SSR-маркеров и последующей апробации мультиплексных наборов проводили оптимизацию следующих экспериментальных параметров:

- соотношение концентраций праймеров ДНК-маркеров, входящих в один мультиплексный набор;
- количество циклов реакции, температура отжига праймеров при постановке ПЦР: 30, 35, 40 циклов реакции; температура отжига праймеров: 52, 56, 58, 62°C;

Главной задачей при оптимизации параметров ПЦР было получение максимального синтеза целевых фрагментов при минимальном синтезе неспецифических амплификатов. Кроме того, с целью сокращения затрат времени при выполнении генотипирования больших объемов образцов и упрощения алгоритма работы, задачей также являлась разработка одного – унифицированного протокола ПЦР для всех мультиплексных наборов. В результате, для использованных в работе SSR-маркеров была принята наиболее оптимальная программа ПЦР:

1-й цикл: начальная денатурация - 5 минут при 94°C;

2-этап: 35 циклов:

30 секунд денатурация при 94°C;  
 30 секунд отжиг праймеров при 56°C;  
 30 секунд синтез при 72°C;  
 последний цикл синтеза 5 минут при 72°C.

Оптимальной концентраций для всех используемых праймеров в ПЦР - смеси была определена концентрация 0,3мМ. Концентрация дезоксинуклеотидтрифосфатов составила 0,05мМ. Оптимальные условия ПЦР позволили получить в ходе фрагментного анализа на автоматическом генетическом анализаторе ABI prism 3130 достоверно идентифицируемые целевые фрагменты (Рисунок 1).

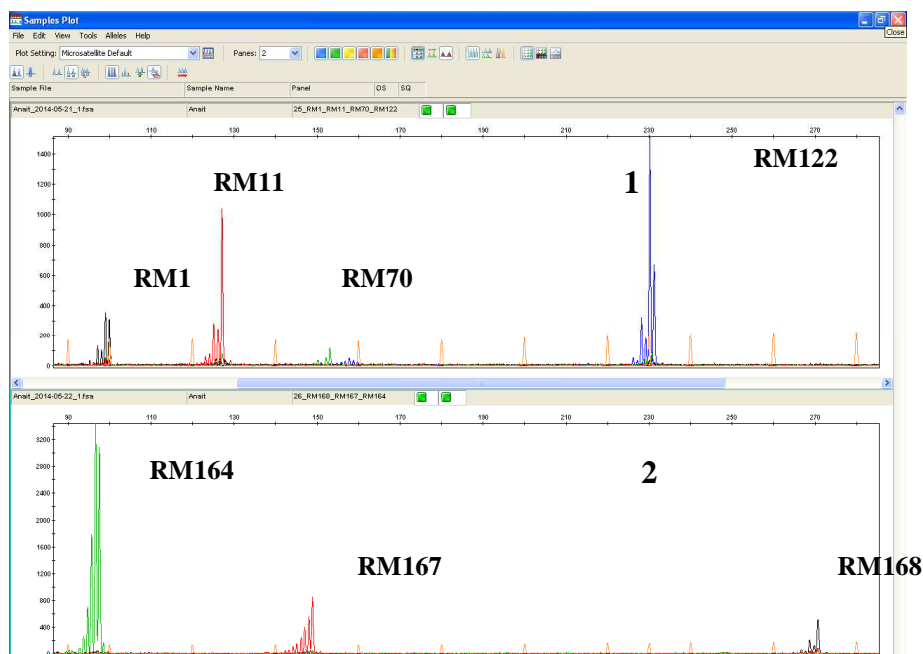


Рисунок – Результаты фрагментного анализа сорта риса Анаит по мультиплексным наборам SSR-маркеров.

1- MLPX1, 2 - MLPX2.

Как видно из результатов фрагментного анализа с использованием автоматического генетического анализатора ABIprism 3130 (Результаты представлены в рабочем окне программы Gene Mapper 4.1), оптимальные экспериментальные параметры и сочетания SSR-маркеров в

мультиплексных наборов позволяют безошибочно идентифицировать целевые пики электрофореграмм. Для каждого SSR-маркера в мультиплексном наборе характерен пик со специфичным цветом на электрофореграмме. Это позволяет проводить достоверную идентификацию целевых фрагментов.

С использованием разработанных мультиплексных наборов было выполнено генотипирование некоторых отечественных и зарубежных сортов риса из коллекции генетических ресурсов ВНИИриса. Для всех изученных сортов были составлены SSR-фингерпринты, которые

	RM1	RM11	RM70	RM122	RM168	RM167	RM164
Олимп	100*	128	157	230	97	145	271
Визит	96	134	166	232	97	149	299
Дружный	92	128	166	232	97	145	299
Павловский	100	134	154	230	97	149	299
Приморский 1	92	128	169	232	97	149	299
Приморский 29	100	128	157	226	97	145	299
Южанин	96	128	157	228	99	145	259
Полевик	92	128	157	232	97	149	303
Боярин	96	134	169	230	97	149	259
ИР - 36	114	144	175	228	107	129	249
ВНИИР 9751	96	128	175	232	97	149	271
ВНИИР 9556	100	128	175	232	97	149	259

включают информацию об идентифицированных аллелях у каждого конкретного сорта (таблица 2).

Таблица 2 SSR- фингерпринты сортов риса



Диамант	92	128	175	230	97	149	291
Каприз	92	128	169	232	97	97	305

\*Примечание: размер аллелей указан в парах нуклеотидов.

Как видно, все изученные сорта риса, представленные в таблице, имеют специфичный ДНК-профиль. Один из маркеров (RM168) у отечественных сортов имеет низкий уровень полиморфизма - один аллель 97 п.н. Однако, при этом, у сорта ИР-36, селекции Международного научно-исследовательского института риса (Филиппины) по данному локусу идентифицируется второй тип аллеля 107 п.н.. Кроме того, по локусам RM1, RM11, RM167 и RM164 данный сорт имеет уникальные аллели, не представленные ни у одного из отечественных сортов. Это согласуется со значительными генетическими различиями данного сорта и остальных сортов из изученной выборки.

Апробированные в ходе работы SSR маркеры и сформированные из них мультиплексные наборы могут быть эффективно использованы для выполнения дальнейших исследований по ДНК-паспортизации и изучению генетического разнообразия отечественных коллекций генетических ресурсов данной культуры.

### Литература

1. Конарев А.В. Использование молекулярных маркеров в работе с генетическими ресурсами растений / А.В Конарев // Сельскохозяйственная биология, 1998.- №5.- С.3-25.
2. Хавкин Э.Е. Молекулярные маркеры в растениеводстве / Э.Е Хавкин // Сельскохозяйственная биология, 1997.- №5.- С.3-19.
3. Akagi H. Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and classification of closely related cultivars with these microsatellite loci / H. Akagi, Y. Yokozeki, A.Inagaki, T. Fujimura // Theor. Appl. Genet., 1997.- V. 94.- P.61-67.
4. Wu K.S. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice/ K.S. Wu, S.D. Tanksley // Mol. Gen. Genet., 1993.-V.241.- P. 225-235.
5. McCouch S.R. Microsatellite markers in rice: abundance, diversity, and applications/ S.R. McCouch, S. Temnykh, A. Lukashova, et al. // Rice genetic 4. Proceeding of the fourth international rice genetic symposium.- Los Banos., 2001.- P. 117-135.

6. Akagi H. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes / H. Akagi, Y. Yokozeki, A. Inagaki, T. Fujimura // *Theor. Appl. Genet.*, 1996.- V. 93.- P. 1071-1077.
7. McCouch S.R. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding / S.R. McCouch, X. Chen, O. Panaud., et al. // *Plant Mol. Biol.*, 1997. - V.35.- P. 89-99.
8. Priyanka S. Allelic Diversity Among Basmati and Non-Basmati Long-grain Indica Rice Varieties using Microsatellite Markers / S. Priyanka, J. Sunita, S. Navinder, et al. // *Plant Biochemistry & Biotechnology*, 2004.- V. 13.- P. 25-32.
9. Weiguo Z., Jong-Wook C., Kyung-Ho Ma et al. Analysis of Genetic Diversity and Population Structure of Rice Cultivars from Korea, China and Japan using SSR Markers/ Z. Weiguo, C. Jong-Wook, Kyung-Ho Ma. et al // *Genes and Genomics*, 2009.- V. 31.- № 4.- P. 283-292.
10. L.-Z.Gao. Comparisons of microsatellite variability and population genetic structure of two endangered wild rice species, *Oryza rufipogon* and *O. officinalis*, and their conservation implications/ L.-Z.Gao, C.-H. Zhang // *Biodiversity and Conservation*, 2005.- V. 14. – P. 1663–1679.
11. Michael J. Thomson. Genetic diversity analysis of traditional and improved Indonesian rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using microsatellite markers/ Michael J. Thomson, Endang M. Septiningsih, Fatimah Suwardjo. et al. // *Theor Appl Genet*, 2007.- V. 114. P. 559–568.
12. Basabdatta Das. Genetic diversity and population structure of rice landraces from Eastern and North Eastern States of India/ Basabdatta Das, Samik Sengupta, Swarup K. Parida // *BMC Genetics*, 2013. V. 14. P. 71.
13. Шибата Д.К. Полимеразная цепная реакция и молекулярно-генетический анализ биоптатов // *Молекулярная клиническая диагностика*.- М.: Мир, 1999.- С. 395-427.

### References

1. Konarev A.V. Ispol'zovanie molekulyarnych markerov v rabote s geneticheskimi resursami rasteniy / A. V. Konarev // *sel'skochozyaistvennaya biologiya*, 1988.- №5.- S.3-25.
2. Khavkin E.E. Molekularnye marker v rastenievodstve / E.E. Havkin // *sel'skochozyaistvennaya biologiya*, 1997.- №5.- S.3-19.
3. Akagi H. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes / H. Akagi, Y. Yokozeki, A. Inagaki, T. Fujimura // *Theor. Appl. Genet.*, 1996.- V. 93.- P. 1071-1077.
4. Akagi H. Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and classification of closely related cultivars with these microsatellite loci / H. Akagi, Y. Yokozeki, A. Inagaki, T. Fujimura // *Theor. Appl. Genet.*, 1997.- V. 94.- P.61-67.
5. McCouch S.R. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding / S.R. McCouch, X. Chen, O. Panaud., et al. // *Plant Mol. Biol.*, 1997. - V.35.- P. 89-99.
6. McCouch S.R. Microsatellite markers in rice: abundance, diversity, and applications/ S.R. McCouch, S. Temnykh, A. Lukashova, et al. // *Rice genetic 4. Proceeding of the fourth international rice genetic symposium*.- Los Banos., 2001.- P. 117-135.
7. Wu K.S. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice/ K.S. Wu, S.D. Tanksley // *Mol. Gen. Genet.*, 1993.-V.241.- P. 225-235.
8. Priyanka S. Allelic Diversity Among Basmati and Non-Basmati Long-grain Indica Rice Varieties using Microsatellite Markers / S. Priyanka, J. Sunita, S. Navinder, et al. // *Plant Biochemistry & Biotechnology*, 2004.- V. 13.- P. 25-32.

9. Weiguo Z., Jong-Wook C., Kyung-Ho Ma et al. Analysis of Genetic Diversity and Population Structure of Rice Cultivars from Korea, China and Japan using SSR Markers/ Z .Weiguo, C. Jong-Wook, Kyung-Ho Ma. et al // Genes and Genomics, 2009.- V. 31.- № 4.- P. 283-292.

10. L.-Z.Gao. Comparisons of microsatellite variability and population genetic structure of two endangered wild rice species, *Oryza rufipogon* and *O. officinalis*, and their conservation implications/ L.-Z.Gao, C.-H. Zhang // Biodiversity and Conservation, 2005.- V. 14. – P. 1663–1679.

11. Michael J. Thomson. Genetic diversity analysis of traditional and improved Indonesian rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using microsatellite markers/ Michael J. Thomson, Endang M. Septiningsih, Fatimah Suwardjo. et al. // Theor Appl Genet, 2007.- V. 114. P. 559–568

12. Basabdatta Das. Genetic diversity and population structure of rice landraces from Eastern and North Eastern States of India/ Basabdatta Das, Samik Sengupta, Swarup K. Parida //BMC Genetics, 2013. V. 14. P. 71.

13. Shibata D.K. Polimeraznaya tsepnaya reaktsiya i molekularno-geneticheskiy analiz bioptatov // molekularnaya klinicheskaya diagnostika.-M.: Mir, 1999.- P. 395-427.