

УДК 663.854.78:575

DOI: 10.31367/2079-8725-2020-67-1-69-71

ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ДНК-СОДЕРЖАЩИХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ, ХРАНИВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ УСКОРЕННОЙ ДЕГРАДАЦИИ ДНК

В. А. Хачумов, аспирант, ORCID ID: 0000-0002-0144-8822;

И. В. Корниенко, доктор биологических наук, ORCID ID: 0000-0003-0274-3302;

А. В. Усатов, доктор биологических наук, профессор, ORCID ID: 0000-0003-0600-7927

Академия биологии и биотехнологии, Южный федеральный университет,
344090, Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1; e-mail: VladimirKhachumov@yandex.ru

Проведена оценка стабильности ДНК-содержащих растительных образцов, хранившихся в условиях, моделирующих ускоренную деградацию ДНК. Материалом исследования служили культурные линии *H. annuus* (ВИР 114, ВИР 116) и дикорастущие формы подсолнечника *H. decapetalus*, *H. petiolaris*, *H. rigidus* из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова. В среднем уровень стабильности длинных фрагментов ДНК для ядерного, митохондриального и хлоропластного геномов относительно контроля составил 76,9; 87,5 и 98,3% соответственно. При оценке стабильности коротких фрагментов ДНК было показано, что количество ядерной, митохондриальной и хлоропластной ДНК относительно контроля в среднем составило 89,5; 96,0 и 97,7% соответственно.

Ключевые слова: длительное хранение ДНК, ДНК растений, ДНК банки, генетические коллекции.

Для цитирования: Хачумов В. А., Корниенко И. В., Усатов А. В. Оценка стабильности ДНК-содержащих растительных образцов, хранившихся в условиях ускоренной деградации ДНК // Зерновое хозяйство России. 2020. № 1(67). С. 69–71. DOI: 10.31367/2079-8725-2020-67-1-69-71



ESTIMATION OF STABILITY OF DNA-CONTAINING VEGETABLE SAMPLES STORED UNDER THE ACCELERATED DNA DEGRADATION

V. A. Khachumov, post graduate, ORCID ID: 0000-0002-0144-8822;

I. V. Kornienko, Doctor of Biological Sciences, ORCID ID: 0000-0003-0274-3302;

A. V. Usatov, Doctor of Biological Sciences, professor, ORCID ID: 0000-0003-0600-7927

Academy of biology and biotechnology, the Southern Federal University,
344090 Rostov-on-Don, Stachki Av., 194/1; e-mail: VladimirKhachumov@yandex.ru

There has been carried out an estimation of stability of DNA-containing plant samples stored under the conditions that model accelerated DNA degradation. The research material were the lines *H. annuus* ("VIR 114", "VIR 116") and wild-growing forms of sunflower *H. decapetalus*, *H. petiolaris*, *H. rigidus* taken from the collection of the N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources. On average, the stability level of long DNA fragments for the nuclear, mitochondrial, and chloroplast genomes was 76.9%, 87.5%, and 98.3% respectively compared with the control. When assessing the stability of short DNA fragments, it was shown that on average, the number of nuclear, mitochondrial, and chloroplast DNA was 89.5%, 96.0%, and 97.7% respectively compared with the control.

Keywords: long-term DNA storage, DNA of plants, DNA banks, genetic collections.

Введение. На сегодняшний день актуально повышение эффективности и продуктивности сельскохозяйственных культур в целом. Одним из решений данной проблемы является применение маркер-опосредованной селекции, позволяющей вести отбор по генетическим маркерам селекционно ценных признаков, устойчивости к заболеваниям и абиотическим факторам среды. Для максимально эффективного селекционного процесса необходимо наличие коллекции линий и образцов, хранящихся в генетических банках. При ведении селекционного процесса необходимо не только сохранять генетический материал на протяжении длительного времени, но и иметь возможность непрерывно работать с образцами (Dormontt et al., 2018; Usatov et al., 2016).

Создание ДНК-банков, интегрируемых с уже существующими гербарными коллекциями, банками семян и коллекциями растений в ботанических садах, ведется по всему миру и насчитывает более 1750 организаций (Hay et al., 2013; Liu et al., 2018; Yu et al., 2016).

Как правило, ДНК хранится при ультразаморозке. Это обеспечивает хорошую сохранность молекулы ДНК, поэтому данный способ широко применяется в лабораториях по всему миру. Хранение ДНК при ультранизких температурах имеет ряд недостатков:

высокая стоимость морозильного оборудования и его обслуживания; необходимость большой площади для размещения оборудования; наличие ряда ограничений при транспортировке образцов; неизбежное ухудшение качества образцов вследствие цикла разморозки-заморозки при проведении исследований; высокий риск потери образцов при нарушении электрообеспечения.

Альтернативой ультразаморозке служит хранение ДНК на бумажном носителе. Этот способ заключается в нанесении гомогената растительной ткани на хроматографическую бумагу, пропитанную специализированным буферным раствором, который обеспечивает стабильность молекулы ДНК и не требует особых условий хранения (пат. 2703058).

Цель работы – оценка стабильности ДНК в растительных гомогенатах при длительном хранении на бумажном носителе.

Материалы и методы исследований. Материалом исследования служили культурные линии *H. annuus* (ВИР 114, ВИР 116) и дикорастущие формы подсолнечника *H. decapetalus*, *H. petiolaris*, *H. rigidus* из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова.

Проростки растений были гомогенизированы в специализированном буферном растворе из рас-

чета 75 мкл на каждые 10 мг ткани. Полученный гомогенат наносили на хроматографическую бумагу (FN100), высушивали полученную композицию при комнатной температуре в течение 2 часов. После чего производили выделение ДНК (контрольный образец) сорбентным методом из фрагмента карточки. Повторное выделение ДНК проводили после моделирования ускоренной деградации путем воздействия на образцы температурой +45 °С в течение 24 месяцев, что эквивалентно хранению образцов в течение 10 лет при 20 °С (пат. 2703058).

Постановку полимеразной цепной реакции осуществляли с использованием коммерческого набора для проведения ПЦР РВ в присутствии красителя EVAgreen согласно инструкции производителя (Синтол, Россия). Режим амплификации включал начальную денатурацию при 95 °С в течение 5 минут, затем

35 циклов при соблюдении температурно-временного режима: отжиг праймеров при 58 °С в течение 20 с; элонгация – 15 с при 70 °С; денатурация при 95 °С – 20 с; финальная элонгация – 2 мин при 70 °С.

Количественную оценку ДНК проводили с помощью метода $2^{-\Delta Ct}$, где Ct – пороговое значение цикла, во время которого флуоресценция впервые фиксируется достоверно выше порогового уровня; 2 – максимальный коэффициент эффективности ПЦР (Livak and Schmittgen, 2001). Для получения более детальной картины сохранности ДНК использовали праймеры, фланкирующие длинные (около 5000 bp) и короткие (около 200 bp) участки ДНК в ядерном, хлоропластном и митохондриальном геномах соответственно (табл. 1). Эффективность амплификации для каждой пары праймеров составила 85–98%.

1. Нуклеотидная последовательность праймеров

1. The nucleotide sequence of the primers

Геном	Ген	Последовательность праймеров (5' – 3')	Длина ПЦР продукта, п. н.
Ядерный	Actin	F: GGTTCGTGGTGCTCATTCGT R: CTTCTGCCCCATACCAACCA	194
		F: GGTTCGTGGTGCTCATTCGT R: TGAGGACAAAGTGTGGAGGG	5194
Митохондриальный	atp6	F: AAAGTGACCGAGATGCGAGG R: GCGGTAACGTGCTTTTGG	186
		F: AAAGTGACCGAGATGCGAGG R: CAAATGGGCGAGGTAGGAGG	5181
Хлоропластный	rbcL	F: CATTGCGTATGTCTGGGGGA R: GAATACCCCTGAAGCCACC	198
		F: CATTGCGTATGTCTGGGGGA R: ATCTGTCCCCTTCCTCGGTT	5138

Результаты и их обсуждение. Оценку стабильности ДНК в гомогенатах растений, хранившихся 24 месяцев при +45 °С на бумажном носителе, осуществляли по амплификации длинных и коротких фрагментов ДНК.

В результате оценки стабильности ДНК по длинным фрагментам было показано, что количество ядерной, митохондриальной и хлоропластной ДНК от-

носительно контроля в среднем составило 76,9; 87,5 и 98,3% соответственно (табл. 2).

При оценке стабильности ДНК по коротким фрагментам было показано, что количество ядерной, митохондриальной и хлоропластной ДНК относительно контроля в среднем составило 89,5; 96,0 и 97,7% соответственно (табл. 3).

2. Количество ДНК в гомогенатах на твердом носителе через 24 месяца хранения при +45 °С при оценке стабильности по длинным фрагментам

2. The amount of DNA in homogenates on a solid carrier after 24 months of storage at +45 °С when assessing stability by long fragments

Образец	Яд ДНК 5194 п. н.		Мт ДНК 5181 п. н.		Хл ДНК 5138 п. н.	
	контроль	+45 °С	контроль	+45 °С	контроль	+45 °С
	%	% отн. контроля	%	% отн. контроля	%	% отн. контроля
<i>H. annuus</i> (ВИР 114)	100±2,5	85,4±3,9	100±3,3	88,9±4,3	100±4,6	102,1±6,2
<i>H. annuus</i> (ВИР 116)	100±4,3	78,6±4,1	100±4,2	89,5±4,7	100±4,0	100,3±5,1
<i>H. decapetalus</i>	100±4,5	56,9±4,5	100±3,7	80,4±5,3	100±4,3	91,7±6,3
<i>H. petiolaris</i>	100±4,8	84,7±5,4	100±4,1	91,3±4,8	100±4,2	98,5±6,4
<i>H. rigidus</i>	100±4,2	79,3±5,1	100±4,0	87,6±3,9	100±4,5	98,9±5,6
Ср. знач.	100	76,9	100	87,5	100	98,3

3. Количество ДНК в гомогенатах на картах через 24 мес хранения при +45 °С при оценке стабильности по коротким фрагментам

3. The amount of DNA in the homogenates on the cards after 24 months of storage at +45 °C when assessing stability by short fragments

Образец	Яд ДНК 194 п. н.		Мт ДНК 186 п. н.		Хл ДНК 198 п. н.	
	контроль	+45 °С	контроль	+45 °С	контроль	+45 °С
		% отн. контроля		% отн. контроля		% отн. контроля
<i>H. annuus</i> (ВИР 114)	100±2,6	94,8±2,4	100±0,8	99,0±0,9	100±2,3	101,1±2,2
<i>H. annuus</i> (ВИР 116)	100±2,4	91,8±2,3	100±1,4	98,1±1,7	100±1,7	100,2±1,8
<i>H. decapetalus</i>	100±2,5	79,3±2,5	100±1,1	91,9±1,3	100±2,2	87,2±1,9
<i>H. petiolaris</i>	100±1,7	89,4±2,0	100±1,3	96,3±1,8	100±1,9	99,7±1,6
<i>H. rigidus</i>	100±2,0	92,0±1,5	100±1,6	95,0±2,9	100±2,0	100,3±2,3
Ср. знач.	100	89,5	100	96,0	100	97,7

Полученные данные указывают на то, что наибольшей деградации подверглись длинные участки ДНК. Кроме того, стоит отметить наибольшее снижение количества ядерной ДНК относительно контрольных образцов, тогда как пластидная ДНК деградировала в меньшей степени. Это может быть связано с многократностью хлоропластных и митохондриальных геномов в клетках растений.

Выводы. В результате исследования показана высокая стабильность ДНК при хранении растительных гомогенатов на бумажном носителе. Данный способ хранения ДНК имеет большой потенциал при создании ДНК-коллекций или интеграции с уже существующими.

Работа выполнена при поддержке фонда содействия инновациям (проект № 8795ГУ/2015).

Библиографические ссылки

1. Способ хранения ДНК-содержащего растительного материала в широком диапазоне температур: пат. 2703058 Российская Федерация. № 2017143012/10; заявл. 08.12.2017; опубл. 15.10.2019; бюл. № 29.
2. Dormontt E. et al. Advancing DNA barcoding and metabarcoding applications for plants requires systematic analysis of herbarium collections-an Australian perspective. 2018. Vol. 6. DOI: 10.3389/fevo.2018.00134.
3. Fiona R. Hay et al. Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research // Conservation Physiology. 2013 Vol. 1(1). cot030. DOI: 10.1093/conphys/cot030.
4. Liu U. et al. The conservation value of germplasm stored at the millennium seed bank, royal botanic gardens, Kew, UK // Biodiversity and conservation. 2018. Vol. 27(6). Pp. 1347–1386. DOI: 10.1007/s10531-018-1497-y.
5. Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method // Methods. 2001. Vol. 25(4). Pp. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
6. Usatov A. V., Kostylev K. V., Azarin N. V. et al. Introgression of the rice blast resistance genes Pi1, Pi2 and Pi33 into Russian rice varieties by marker-assisted selection // Indian Journal of Genetics and Plant Breeding. 2016. Vol. 76(1). Pp. 18–23. DOI: 10.5958/0975-6906.2016.00003.1.
7. Yu X. et al. Genomic prediction contributing to a promising global strategy to turbocharge gene banks // Nature Plants. 2016. Vol. 2(10). 16150. DOI: 10.1038/NPLANTS.2016.150.

References

1. Sposob hraneniya DNK-soderzhashchego rastitel'nogo materiala v shirokom diapazone temperature [A method of storing DNA-containing plant material in a wide temperature range]: pat. 2703058 Rossijskaya Federaciya. № 2017143012/10; yayavl. 08.12.2017; opubl. 15.10.2019; byul. № 29.
2. Dormontt E. et al. Advancing DNA barcoding and metabarcoding applications for plants requires systematic analysis of herbarium collections-an Australian perspective. 2018. Vol. 6. DOI: 10.3389/fevo.2018.00134.
3. Fiona R. Hay et al. Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research // Conservation Physiology. 2013 Vol. 1(1). cot030. DOI: 10.1093/conphys/cot030.
4. Liu U. et al. The conservation value of germplasm stored at the millennium seed bank, royal botanic gardens, Kew, UK // Biodiversity and conservation. 2018. Vol. 27(6). Pp. 1347–1386. DOI: 10.1007/s10531-018-1497-y.
5. Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method // Methods. 2001. Vol. 25(4). Pp. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
6. Usatov A. V., Kostylev K. V., Azarin N. V. et al. Introgression of the rice blast resistance genes Pi1, Pi2 and Pi33 into Russian rice varieties by marker-assisted selection // Indian Journal of Genetics and Plant Breeding. 2016. Vol. 76(1). Pp. 18–23. DOI: 10.5958/0975-6906.2016.00003.1.
7. Yu X. et al. Genomic prediction contributing to a promising global strategy to turbocharge gene banks // Nature Plants. 2016. Vol. 2(10). 16150. DOI: 10.1038/NPLANTS.2016.150.

Поступила: 5.12.19; принята к публикации: 14.10.20.

Критерии авторства. Авторы статьи подтверждают, что имеют на статью равные права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторский вклад. Хачумов В. А. – концептуализация исследования, подготовка опыта, выполнение полевых/лабораторных опытов и сбор данных, анализ данных и их интерпретация, подготовка рукописи; Корниенко И. В., Усатов А. В. – концептуализация исследования.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.