



DOI 10.21178/2079-6080.2020.1.16
УДК 630.165+575.17

Использование кривых плавления ампликонов при оценке пригодности nSSR-локусов ели европейской для мультиплексирования

© Г.В. Калько, Р.Р. Мусина

Using of amplicon melting curves to assess the suitability of Norway spruce nSSR loci for multiplexing

G.V. Kalko, R.R. Musina (Saint Petersburg Forestry Research Institute)

Microsatellite, or SSR markers (Simple Sequence Repeats) are one of the most powerful tools for assessing genetic variation. They are widely used to study the genetic diversity and population genetic structure of coniferous species. The most promising is the multiplexing of SSR loci. It allows to automate microsatellite analysis, significantly increase the accuracy of studies and reduce their cost. At the moment, there are no universally accepted multiplexes of Norway spruce nuclear microsatellites and their creation is very important. The aim of the study is the selection from number of published nSSR the loci suitable for multiplexing and compilation from them the original multiplexes convenient for analyzing the genetic diversity and identification of valuable genotypes of *Picea abies* (L.) Karst. For the screening the loci with specific amplification in a wide range of annealing temperature, Real-Time PCR in a temperature gradient with the analysis of melting curves of amplicons for each locus separately was used. Initially, multiplexes were created using the Multiplex Manager 1.0 program. After their modification, 7 multiplex panels were proposed (3 of two, and 1 of three, and 3 of four loci). Multiplexes were tested on 30 trees, originating from four geographically different populations of the southern taiga region of the European part of the Russian Federation. Multiplex PCR was performed with direct primers labeled FAM, HEX, ROX fluorescent dyes and reverse unlabeled primers. PCR results were detected using the Applied Biosystems 3500 genetic analyzer. To determine the length of DNA fragments, the GeneScan 600 LIZ v2.0 size standard was used.

Key words: microsatellites, multiplex, Norway spruce, genetic diversity, real-time PCR, melting curves

Использование кривых плавления ампликонов при оценке пригодности nSSR-локусов ели европейской для мультиплексирования

Г.В. Калько, Р.Р. Мусина

Для изучения генетического разнообразия и популяционно-генетической структуры видов хвойных растений широко применяются микросателлитные, или SSR-маркеры (Simple Sequence Repeats), которые являются одними из самых мощных инструментов оценки генетической изменчивости. Наиболее перспективным считают мультиплексирование SSR-локусов, которое позволяет автоматизировать микросателлитный анализ, существенно повысить точность исследований и сократить их стоимость. В настоящее время не существует общепринятых мультиплексов ядерных микросателлитов ели европейской и их создание весьма актуально. Целью исследования является отбор удобных для мультиплексирования опубликованных nSSR-локусов и составление из них оригинальных мультиплексов, пригодных для анализа генетического разнообразия *Picea abies* (L.) Karst. и идентификации ценных генотипов. Для отбора локусов со специфичной амплификацией в широком интервале температур отжига использовали ПЦР в реальном времени в градиенте температур с анализом кривых плавления амплификатов для каждого локуса по отдельности. Первоначально мультиплексы составляли с помощью программы Multiplex Manager 1.0. После их модификации было предложено 7 мультиплексов (три мультиплекса состояли из 4 локусов, один – из 3, остальные из 2 локусов). Мультиплексные панели были тестированы на 30 деревьях из четырех географически различающихся популяций южно-таёжного региона европейской части Российской Федерации. Мультиплексные ПЦР проводили с прямыми мечеными флуоресцентными красками FAM, HEX, ROX и обратными немечеными праймерами. Детекцию мультиплексных ПЦР выполняли с помощью генетического анализатора Applied Biosystems 3500. Для определения длин фрагментов ДНК использовали размерный стандарт GeneScan 600 LIZ v2.0.

Ключевые слова: микросателлиты, мультиплексы, ель европейская, генетическое разнообразие, ПЦР в реальном времени, кривые плавления

Калько Галина Валентиновна – заведующий исследовательской лабораторией

E-mail: gkalko@spb-niilh.ru; kagava0720@gmail.com

Мусина Рузанна Ринатовна – лаборант-исследователь исследовательской лаборатории

ФБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт лесного хозяйства»

194021, Санкт-Петербург, Институтский пр., 21

Телефон: (812) 552-80-21, факс: (812) 552-80-42