

ЭФФЕКТИВНОСТЬ SCOT МАРКЕРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *ACTINIDIA* В КОЛЛЕКЦИИ ФИЦ СЦ РАН

Мацькив А. О. , Тутберидзе Ц. В. , Кондратенко Е. И. , Симонян Т. А. , Шуркина Е. С. ,
Цатурян Г. А. , Конинская Н. Г. , Шхалахова Р. М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр Российской академии наук»
matskiv_a@mail.ru

Актинидия – род деревянистых лиан семейства Актинидиевые (*Actinidiaceae*), это ценная плодово-ягодная культура. Адаптивные сорта позволяют производить высокий урожай, способствуя продовольственной безопасности в условиях изменяющегося климата. В настоящее время для анализа генетического разнообразия применяют различные типы молекулярных маркеров (AFLP, ISSR, RAPD, SRAP). Однако, одной из эффективных технологий является маркерная система SCoT (start codon targeted polymorphism). Для данных маркеров характерны высокая воспроизводимость результатов, нацеленность на амплификацию функциональных участков генома и относительно небольшие затраты на проведение анализа.

Объектом исследования являлись 19 образцов актинидии коллекции ФИЦ СЦ РАН (*A. kolomikta* - 2; *A. arguta* - 8; *A. deliciosa* - 9). Выделение ДНК из молодых листьев растений производили согласно протоколу СТАВ (Doyle, 1990). Проверку качества полученной ДНК выполняли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, концентрацию ДНК определяли спектрофотометрическим методом. Финальная концентрация ДНК - пробы в смеси ПЦР составляла 150 нг/мкл. Для исследования применяли набор из 35 SCoT маркеров. Реакционная смесь для ПЦР состояла из 10 мкл 2х реакционного буфера HS – TaqPCR, содержащего Hot Start Taq – полимеразу; 0,4 мкл праймера; 3,3 мкл 6х буфера для нанесения; 1 мкл ДНК (150 нг/мкл) и обработанной DEPC воды в общем объеме ПЦР 20 мкл. С применением термоциклера MiniAmp (Thermo Fisher Scientific, США) провели амплификацию фрагментов ДНК при следующих условиях: первичная денатурация 5 мин при 95 °С, отжиг 35 циклов денатурация при 95 °С в течение 1 мин, отжиг при 50 °С в течение 1 мин, элонгация при 72 °С в течение 2 мин и финальная элонгация при 72 °С в течение 5 мин. Полученные ПЦР-продукты разделяли в 2% агарозном геле в течение 2 ч при напряжении 90 В в 1х TAE буфере. Обработку данных проводили в виде бинарной матрицы 1/0. Параметры генетического разнообразия были рассчитаны с использованием программы IMEC (Marker Efficiency Calculator. URL: <https://irscope.shinyapps.io/iMEC/>) и программного обеспечения GeneAlex ver. 6.5 (Peakall, Smouse, 2006; Peakall, Smouse, 2012).

По результатам анализа коллекции актинидии ФИЦ СЦ РАН из 35 испытанных SCoT-маркеров выбрали 17 информативных маркеров. С указанными маркерами удалось получить 199 ПЦР-фрагментов, из них 182 фрагмента (92%) оказались полиморфными. Наибольшее число ампликонов (15) получено с использованием праймера SCoT-35, наименьшее (8) – с использованием праймера SCoT-28. Десять SCoT - маркеров (SCoT 12, SCoT 13, SCoT 14, SCoT 15, SCoT 20, SCoT 26, SCoT 28, SCoT 31, SCoT 33, SCoT 34) показали максимальный уровень ДНК-полиморфизма (100 %).

Семь других маркеров (SCoT 11, SCoT 24, SCoT 29, SCoT 30, SCoT 32, SCoT 35, SCoT 36) также показали высокий уровень полиморфизма (73,33–90,91 %). Индекс гетерозиготности SCoT маркеров составил 0,46, PIC - 0,38, различительная способность (D) - 0,63, дискриминационная способность (R) - 5,90. Эти маркеры можно использовать в селекции и семеноводстве разных сортов актинидии. В частности, для ДНК-идентификации сортов и генотипов, разработки генетических паспортов, контроля стабильности сорта в процессе использования. В дальнейшем планируется более глубокий анализ этой коллекции.

Работа подготовлена в рамках реализации ГЗ ФИЦ СЦ РАН FGRW-2024–0005, регистрационный номер 124022000092-4.

EFFICIENCY OF SCOT MARKERS FOR ASSESSING THE GENETIC DIVERSITY OF ACTINIDIA REPRESENTATIVES IN THE COLLECTION OF THE FRC SRC RAS

Matskiv A. O., Tutberidse T. V., Kondratenko E. I., Simonyan T. A., Shurkina E. S.,
Tsaturyan G. A., Koninskaya N. G., Shkhalakhova R. M.

Federal Research Centre the Subtropical Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences
matskiv_a@mail.ru

Actinidia is a genus of woody vines of the *Actinidiaceae* family, a valuable fruit and berry crop. High adaptability allows producing high-quality fruits, contributing to food security in a changing climate. Currently, various types of molecular markers (AFLP, ISSR, RAPD, SRAP) are used to analyze genetic diversity. However, one of the effective technologies is the SCoT marker system (start codon targeted polymorphism). These markers are characterized by high reproducibility of results, focus on the amplification of functional regions of the genome and relatively low costs of analysis. The object of the study were 19 actinidia samples from the collection of the FRC SRC RAS (*A. kolomikta* - 2; *A. arguta* - 8; *A. deliciosa* - 9). DNA was isolated from young plant leaves according to the CTAB protocol (Doyle, 1990). The quality of the obtained DNA was checked by electrophoresis in 1% agarose gel, and the DNA concentration was determined spectrophotometrically. The final concentration of the DNA sample in the PCR mixture was 150 ng/μl. A set of 35 SCoT markers was used for the study. The PCR reaction mixture consisted of 10 μl of 2x HS-TaqPCR reaction buffer containing Hot Start Taq polymerase; 0.4 μl of primer; 3.3 μl of 6x loading buffer; 1 μl of DNA (150 ng/μl) and DEPC-treated water in a total PCR volume of 20 μl. Using a MiniAmp thermal cycler (Thermo Fisher Scientific, USA), DNA fragments were amplified under the following conditions: primary denaturation for 5 min at 95 °C, annealing for 35 cycles of denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 50 °C for 1 min, elongation at 72 °C for 2 min and final elongation at 72 °C for 5 min. The resulting PCR products were separated in a 2% agarose gel for 2 h at a voltage of 90 V in 1x TAE buffer. Data were processed as a binary 1/0 matrix. Genetic diversity parameters were calculated using the IMEC program (Marker Efficiency Calculator. URL: <https://irscope.shin-yapps.io/iMEC/>) and GeneAlex ver. 6.5 (Peakall, Smouse, 2006; Peakall, Smouse, 2012).

Based on the results of the analysis of the actinidia collection of the Federal Research Center SSC RAS, 17 informative markers were selected from 35 tested SCoT markers. Using the indicated markers, it was possible to obtain 199 PCR fragments, of which 182 fragments (92%) turned out to be polymorphic. The largest number of amplicons (15) was obtained using primer SCoT-35, the smallest (8) – using primer SCoT-28. Ten SCoT markers (SCoT 12, SCoT 13, SCoT 14, SCoT 15, SCoT 20, SCoT 26, SCoT 28, SCoT 31, SCoT 33, SCoT 34) showed the maximum level of DNA polymorphism (100%). Seven other markers (SCoT 11, SCoT 24, SCoT 29, SCoT 30, SCoT 32, SCoT 35, SCoT 36) also showed a high level of polymorphism (73.33 - 90.91%). The heterozygosity index of SCoT markers was 0.46, PIC - 0.38, discriminative ability (D) - 0.63, discriminatory ability (R) - 5.90. These markers can be used in the selection and seed production of different Actinidia varieties. In particular, for DNA identification of varieties and genotypes, development of genetic passports, control of variety stability during use. A more in- depth analysis of this collection is planned in the future.

The work was prepared within the framework of the implementation of the State Order of the Federal Research Center SSC RAS FGRW-2024-0005, registration number 124022000092-4.