

Создание кДНК библиотек растений рода *Citrus* для разработки цитогенетических маркеров

М.Г. Монахос, О.С. Александров, В.А. Коробкова, О.В. Разумова, Ю.Н. Смотров, Д.В. Романов*

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия

* akabos1987@gmail.com

Цель: Использование для создания кДНК-библиотек большой коллекции цитрусов позволит получить большое количество цитогенетических маркеров для идентификации геномов, отдельных хромосом и участков хромосом, а также локализовать протеин-кодирующие гены на хромосомах изучаемых растений рода Цитрус. Эти знания помогут в понимании эволюции и уточнении систематики цитрусов, а также в проведении селекционной работы по созданию новых хозяйственно ценных гибридов цитрусов и по переносу генов хозяйственно ценных признаков: устойчивости к болезням и вредителям, химического состава, питательной ценности и других, от одних цитрусов к другим сельскохозяйственно важным представителям цитрусов.

Материалы и методы: Для выделения мРНК и последующего синтеза кДНК были использованы молодые листья изучаемых растений цитрусов. РНК выделяли с помощью набора «ExtractRNA» (Евроген, кат. BC032), в соответствии с прилагаемым протоколом. Концентрация и чистота РНК была проверена на спектрофотометре «NanoDrop One», Thermo Scientific. На мРНК с помощью набора «Mint kit» (Евроген, кат. SK005), в соответствии с прилагаемым протоколом, синтезировали 1 цепь кДНК, после чего синтезировали двуцепочечную кДНК, использовали амплификатор «T 100. Thermal Cycler», Bio-Rad. Подобранный ПЦР протокол для синтеза второй цепи состоял из предварительной денатурации (1 мин, 95 °C) и 18 циклов денатурации (15 с, 95 °C), отжига (20 с, 66 °C), и элонгации (3 мин, 72 °C). Очистку синтезированной кДНК от ПЦР продуктов проводили с помощью набора «Cleanup St PCR» (Евроген, кат. BC025S), в соответствии с прилагаемым протоколом. Очищенную кДНК встраивали в вектор «pAL2-T» с помощью набора «Quick-TA kit» (Евроген, кат. TAK02), после чего проводили химическую трансформацию векторов в клетки *E. coli* из «XL1-Blue» (Евроген, кат. CC001), в соответствии с прилагаемым протоколом. Трансформированные клетки высевали на питательную среду с антибиотиком ампициллином и реактивом для бело-голубой селекции ИПТГ. Отобранные белые колонии были использованы для ПЦР с праймерами M13 с последующим электрофорезом для определения размера вставки кДНК внутри колонии *E. coli*. Колонии *E. coli* со вставками кДНК размером 1000 bp и более были использованы для выделения плазмидной ДНК с использованием набора «TheGeneJET™ Plasmid Miniprep Kit» (Fermentas, USA), в соответствии с прилагаемым протоколом. Мечение плазмидной ДНК было проведено методом Nick-трансляции с использованием «DIG-Nick Translation Mix» (Roche, Germany) и Biotin PCR Mix (Евроген), в соответствии с прилагаемыми протоколами. С полученными мечеными пробами была проведена Tyramide-FISH на цитологических препаратах изучаемых растений рода Цитрус по Kuipers et al. (1997) с некоторыми модификациями. Микроскопия цитологических препаратов после Tyramide-FISH была проведена с помощью микроскопа Leica DM6 B с камерой DFC 9000 GTC (Leica Microsystems, Германия) на увеличении ×63 с иммерсионным объективом, и встроенной программы LasX. Анализ изображений проведен с помощью программ LasX, DRAWID v.1.2 и MicroMeasure v.6.

Результаты: Нами были выделены мРНК изучаемых растений и созданы кДНК-библиотеки, приготовлены меченые ДНК пробы, поставлена высокочувствительная модификация флюоресцентной *in situ* гибридизации (Tyramide-FISH) на цитологических препаратах изучаемых растений рода Цитрус. Мы получили и проанализировали изображения метафазных хромосом с гибридизационными метками. Хромосомы после Tyramide-FISH имеют четкую структуру, с различимыми центромерами и теломерными окончаниями. Метафазные пластинки имеют хороший разброс хромосом. Сигналы гибридизации достаточно контрастные, значительно ярче фонового «шума». Это позволяет проводить необходимые измерения для составления физических карт распределения кДНК на хромосомах изучаемых растений рода Цитрус.

Выводы: Используемые и оптимизированные нами методики получения кДНК библиотек растений рода Цитрус позволяют получить большое количество цитогенетических маркеров на отдельные участки хромосом. В работе обсуждаются оптимизация методик получения кДНК, увеличение числа длинных кДНК и зависимость частоты гибридизации маркеров на хромосомы от размера кДНК.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда, проект № 23-16-00234, <https://rscf.ru/project/23-16-00234/>.