

Минисателлиты в геномах цитрусовых культур и возможность их использования для молекулярного маркирования

О.С. Александров

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

olegsandrov@gmail.com

Цель: Минисателлиты – это широко распространенные tandemные повторы ДНК в геноме с длиной мономера от 10 до 100 п.н. Высокая изменчивость локусов минисателлитов делает их привлекательными для разработки молекулярных маркеров. Использование минисателлитов в качестве маркеров осуществляется в соответствии с тремя стратегиями: маркирование расщепленной геномной ДНК зондами на основе минисателлитов; амплификация с праймерами, основанными на последовательностях самих минисателлитов; амплификация с праймерами, разработанными для границ выше и ниже локуса минисателлитов. Цель данной работы заключалась в поиске минисателлитов в геномах цитрусовых культур и оценки их использования для молекулярного маркирования согласно третьей выше описанной стратегии.

Материалы и методы: Поиск минисателлитов производился с помощью программ Tandem Repeats Finder (TRF) и GMATA в геноме лимона (сорт Xiangshui) и с помощью TRF в геноме апельсина (сорт Valencia). Подбор праймеров и электронная ПЦР (е-PCR) осуществлялась с помощью GMATA.

Результаты: С помощью программы TRF в геноме лимона было найдено 8472 минисателлита со всеми длинами мономера от 10 до 100 п.о. Больше всего было выявлено минисателлитов с длиной мономера 10 п.о. (607 повторов), а меньше всего (по 3 повтора) с длиной мономера 89, 95 и 98 п.о. Для 4067 минисателлитов удалось подобрать праймеры для проведения ПЦР согласно третьей стратегии маркирования. С помощью программы GMATA в геноме лимона было найдено 135 минисателлитов. Длины мономера у этих минисателлитов варьировали от 10 до 36 п.о. с шагом в одну пару оснований, а также встречались единичные минисателлиты с длинами мономера 42, 52, 56 и 68 п.о. Для 56 повторов были разработанные праймеры.

Ввиду низкой эффективности программы GMATA для поиска минисателлитов далее для поиска в геноме апельсина использовалась только TRF. Было найдено 4270 минисателлитов с длинами мономера от 10 до 100 п.о. (за исключением 65-, 91- и 98-нуклеотидных мономеров). Наиболее распространенными были повторы с 10-нуклеотидными мономерами (287 повторов), как и в случае с лимоном. Реже всех встречались минисателлиты с длиной мономера 85, 88 и 89 п.о. (по 2 повтора). Для 2580 повторов удалось подобрать праймеры согласно третьей стратегии.

Изучение разработанных праймеров проводилось методом е-PCR с использованием в качестве матрицы как генома, в котором были найдены минисателлиты, так и геномов других видов цитрусовых. Проведение е-PCR с исходным геномом позволило отобрать из большого количества маркеров однолокусные, что очень важно, так как они являются наиболее перспективными. Результаты е-PCR на других геномах цитрусовых можно описать следующим образом: были минисателлитные маркеры, которые работают и на других геномах, оставаясь однолокусными, были и те, которые давали большее количества мест отжига или совсем не отжигались. Проведение обычной ПЦР *in vitro* с некоторыми маркерами (выборка составила около 30 маркеров) показало, что результаты е-PCR не всегда соответствуют результатам обычной ПЦР, хотя в целом тренд на отбор однолокусных маркеров является правильным и позволяет использовать большинство из отобранных с помощью е-PCR маркеров для генотипирования образцов изучаемого вида цитрусовых растений и их сородичей.

Выводы: Из двух использованных программ для поиска минисателлитов наиболее продуктивна TRF, хотя возможность поиска в GMATA существует, несмотря на то что данная программа разрабатывалась для поиска микро-, а не минисателлитов. Чаще в изученных геномах лимона и апельсина встречаются минисателлиты с длиной мономера от 10 до 36 п.о. Метод е-PCR является эффективным для отбора перспективных однолокусных маркеров. Полученный в ходе работы набор данных может быть использован для маркирования образцов цитрусовых растений, паспортизации сортов, их дальнейшей идентификации, верификации коллекций, картирования геномов цитрусовых, насыщения уже созданных карт и т. д.

Финансирование: Исследование поддержано Российским научным фондом, проект № 23-16-00234, <https://rscf.ru/project/23-16-00234/>.