

Современные отечественные разработки в области молекулярно-генетической диагностики растений

Я.И. Алексеев^{1,2}, А.А. Шварцев^{1*}, С.А. Савинова¹, М.Л. Конышева¹, Ю.А. Монахова¹, В.А. Володин²

¹ Научно-производственная фирма «ООО Синтол», Москва, Россия

² Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарах»

Российской академии наук, Ялта, Россия

* alexey.sva@yandex.ru

Цель: Одной из ключевых и активно развивающихся отраслей сельского хозяйства в настоящее время является виноградарство, где большое значение уделяется совершенствованию и созданию высокоадаптивных и конкурентоспособных сортов. Исследование происхождения и оценка сортов по комплексу хозяйственно ценных признаков составляют основу эффективного отбора доноров для селекции.

Материалы и методы: Применение технологии массового параллельного секвенирования – наиболее перспективный подход для расширения возможностей исследования. Метод позволяет проводить одновременный анализ большого массива данных, точную идентификацию ключевых хозяйственно ценных признаков и создавать базу данных для целенаправленного подбора родительских пар для эффективной селекции.

Для разработки набора на основе литературных данных были подобраны и протестированы 109 пар праймеров к фрагментам 20 генов, полиморфизмы в которых отвечают за проявление таких признаков как бессемянность, метаболизм терпеноидов, цвет ягод, время цветения, ширина грозди масса и текстура ягод. В качестве референсного генома использовали сборку Pinot Noir из базы NCBI GenBank (GCF_030704535.1). В качестве исследуемого материала использовали сорта винограда из коллекции ВНИВиВ «Магарах» РАН.

Выделение ДНК проводили с использованием станции автоматического выделения Колибри (ООО «Синтол», Россия) с набором реагентов «Сорб-ГМО-Б-Автомат» (ООО «Синтол», Россия). Все пары праймеров были разделены на девять мультиплексных реакций. Классическую ПЦР проводили с использованием набора «2,5× Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ» (ООО «Синтол», Россия), с дополнительным внесением по 1 mM Mg²⁺ и dNTP и единой для всех пар праймеров программой амплификации. Визуализацию продуктов амплификации проводили методом горизонтального гель-электрофореза.

Для последующего массового параллельного секвенирования девять мультиплексных реакций объединяли в одну. Концентрацию полученных пулов измеряли с использованием набора «СинКвант/HS/ДНК» (ООО «Синтол», Россия). Подготовку библиотеки осуществляли с использованием набора реагентов SyntEra-DNA (ООО «Синтол», Россия). Секвенирование ДНК проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора реагентов MiSeq Reagent kit v2 Nano на 500 циклов. Анализ проводили из расчета 50-кратного покрытия для каждого образца, что составляет всего 1% от производительности ячейки. Оценку качества полученных в результате секвенирования прочтений проводили с помощью программ FastQC и MultiQC. Обрезку технических последовательностей проводили, используя программу Trimmomatic.

Результаты: По результатам данного анализа получена информация о наличии полиморфизмов в исследуемых генах. Полиморфизмы отбирались по следующим критериям: покрытие не менее 10X, гомозигота по альтернативной аллели, не синонимичная замена, и особое внимание уделяли полиморфизмам, приводящим к нарушению трансляции или к замене аминокислоты в белке. Последующую статистическую обработку полученных результатов осуществляли в приложении RStudio. Финальным этапом разработки стало определение наличия взаимосвязи полиморфизмов с проявлением хозяйственно ценного признака. Система была апробирована на 21 сорте винограда. Предварительный анализ подтвердил связь между фенотипическим проявлением признака (цвет ягод) и наличием/количеством полиморфизмов в определенных позициях. Продолжается изучение корреляции полученных генетических данных с остальными фенотипическими признаками.