



Разработка молекулярных маркеров для селекции скороспелых форм гуара (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.)

Шадрина В.В.^{1*}, Сафроничева Е.Д.¹, Каржаев Д.С.^{1,2}, Волков В.А.^{1,2}, Григорьева Е.А.^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

² Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия

* e-mail: shadrina.lab@gmail.com



Мотивация и цель

Гуар используется в качестве кормового растения, источника белка и благодаря содержанию полисахарида галактоманна в эндосперме семени, гуар является востребованной технической культурой.

Для селекции скороспелых форм *C.tetragonoloba* выборка растений была генотипирована методом RADseq. В результате полногеномного анализа ассоциаций *in silico* предсказаны SNP-маркеры, сцепленные с изменчивостью скороспелости гуара. Выявлено 6 SNP, соответствующих 6 различным контигам в референсной сборке генома. Для валидации SNP-маркеров было необходимо разработать локус-специфичные праймеры для получения продуктов ПЦР разных генотипов и подтвердить предсказанный полиморфизм методом секвенирования по Сэнгеру.

Методы и алгоритмы

Смесь ПЦР состояла из 2,5мкл 10xTaq буфера с MgCl₂, 1мкл dNTP (10мМ), 0,5мкл прямого и обратного праймера (10мМ), 0,5мкл Taq-полимеразы (5U/мкл) и 2мкл ДНК (10-30нг/мкл). Объем был доведен до 25мкл деионизированной водой. Для праймеров gu37, gu59, gu182, gu188, gu229 программа амплификации, следующая: один цикл (3м-95°C), 35 циклов (30с-95°C, 30с-57°C, 1м-72°C) и один цикл (5м-72°C). Для праймера gu88 температура отжига составила 59°C. Очистка продуктов магнитными частицами проводилась по протоколу Agencourt AMPure XP, подготовка к секвенированию осуществлялась BigDye Terminator v3.1., программа ПЦР и очистка с использованием ЭДТА 125мМ проводились по рекомендациям производителя.

Последовательности праймеров

ПЦР-маркеры, позволяющие амплифицировать фрагменты, содержащие SNP, ассоциированные с изменчивостью по продолжительности вегетационного периода, спроектированы с использованием PrimerQuest. Последовательности праймеров были выровнены на референсную сборку генома с применением Bwa V.0.7.3, чтобы исключить отжиг за пределами целевого контига и проверены с помощью UGENE v.39.0.

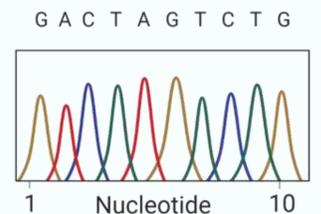
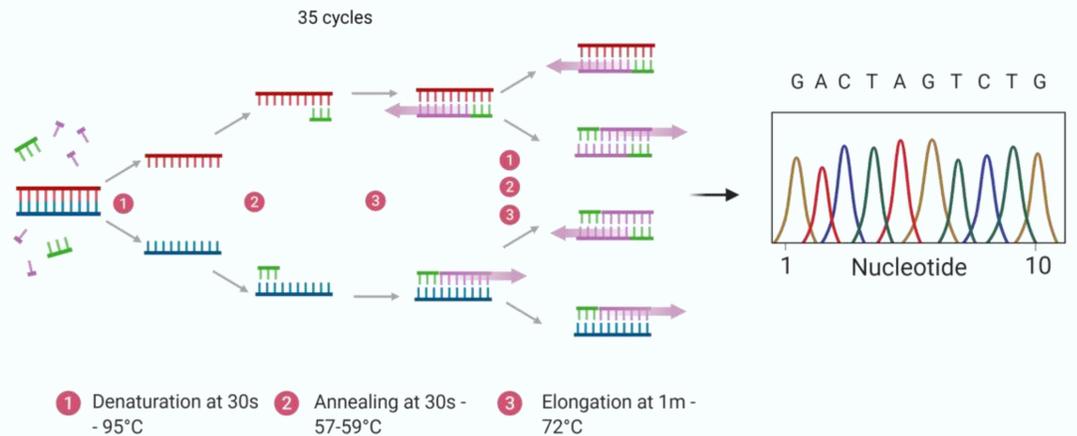
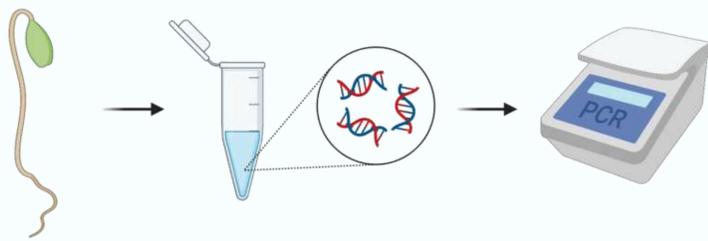
LOCUS	FORWARD	REVERS	EXPECTED SIZE
contig_37:351180 (gu37)	CGAACAAACGGTCAGCAAATAA	AAATGAAGCACGTGAAGCTAATC	553
contig_59:14389378 (gu59)	AGAACCACACATTCTTGACACTA	TGGTGGACATCCCTCTCTAA	418
contig_88:4931265 (gu88)	GCGTGGAGTTAGTGGACTATG	GTGCTCTCTAAGGCTGAAAC	347
contig_182:841660 (gu182)	GACTCTCCATCATAGGGTTACTT	AGTCCTGTCTCTCTGGTAAT	550
contig_188:3026232 (gu188)	GCCAGTCCAATAGGCTAACA	CCTGCCTGACTCAGATAAGAAC	638
contig_229:330388 (gu229)	CCAAGTGTCACTCTCCGTTAGT	GGTCTGATCTGTCTGCATATAG	500

Проращивание семян

Выделение ДНК СТАВ-методом

Проведение ПЦР

Секвенирование по Сэнгеру



Валидация SNP

