



Ключевые вопросы при разработке стандартных методик ДНК-паспортизации сортов плодовых культур

Супрун И. И. к.б.н., заведующий функциональным научным центром селекции и
питомниководства ФГБНУ СКФНЦСВВ

Основные этапы при ДНК-паспортизации

- ▶ Отбор проб/отбор и транспортировка проб
- ▶ Экстракция ДНК
- ▶ Генотипирование (ПЦР с праймерными парами к SSR-локусам и фрагментный анализ - генетический анализатор - Нанофор 05)
 - набор SSR-маркеров
 - эффективные мультиплексные наборы
 - условия мультиплексной ПЦР
 - параметры фрагментного анализа
- ▶ Обработка первичных данных из GeneMarker, «привязка» к сорту контролю - бинирование данных
- ▶ Формирование ДНК-паспорта

Экстракция ДНК

- ▶ Наличие молодых зеленых листьев - идеальный вариант
- ▶ Старая листва, черенок/саженец без листвы - особенно вероятно при необходимости идентификации сортового соответствия внесенных в Госреестр сортов

Актуализируется вопрос наличия оптимальных методик экстракции ДНК, позволяющих получить пробы ДНК с достаточным уровнем чистоты из разных типов тканей на разных этапах вегетации

Высокую эффективность и универсальность проявили некоторые коммерческие наборы для экстракции ДНК (стоимость 200-400 рублей на образец).

Сорта контроля

- ▶ Отечественные сорта - нет возможности сравнения получаемых данных с результатами, полученными на мировом генофонде
- ▶ Зарубежные «классические» сорта - при накоплении массива данных по ДНК-паспортизации сортов имеется возможность оценить генетические взаимосвязи отечественных сортов и мирового генофонда
- ▶ Два сорта контроля - размножены от двух апробированных деревьев. Саженцы/пробы ДНК/листья передаются в организации, выполняющие ДНК-паспортизацию

Микросателлитные маркеры как наиболее перспективный тип ДНК-маркеров

- ▶ Высокий уровень аллельного полиморфизма (до 20-25 аллелей на локус);
- ▶ Локусспецифичность: большинство маркеров имеет один сайт отжига (посадки) праймерной пары в геноме в процессе ПЦР;
- ▶ Воспроизводимость результатов;
- ▶ Возможность автоматизации;
- ▶ Наличие большого количества ДНК маркеров данного типа для плодовых культур

Формирование выборки микросателлитных ДНК-маркеров для генетической паспортизации

Анализ полученных ранее экспериментальных данных в мире



Fruit Breedomics
BRIDGING THE GAP BETWEEN GENOMICS
AND FRUIT BREEDING



Анализ уровня полиморфизма маркеров и частоты их использования при изучении мирового генофонда (литературные данные)



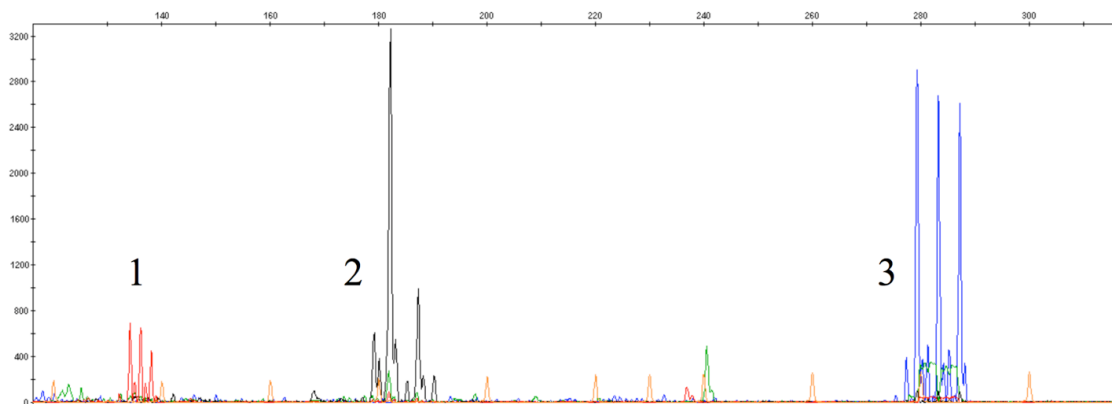
Изучение методических аспектов использования целевых маркеров: качество амплификации, возможные мультиплексные сочетания ранее апробированные



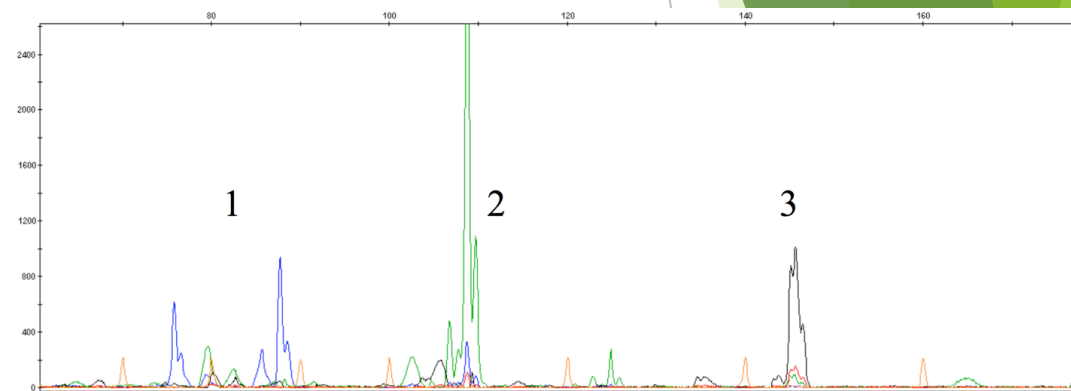
Формирование наборов маркеров

- ▶ Апробация маркеров
- ▶ Разработка мультиплексных наборов
- ▶ Анализ полиморфизма на гетерогенных выборках сортов из разных эколого-географических групп
- ▶ Корректировка набора для ДНК-паспортизации и корректировка мультиплексных наборов
- ▶ Разработка мультиплексов, включающих шесть, семь или более ДНК-маркеров - *одна-две ПЦР и ДНК-паспорт готов!*

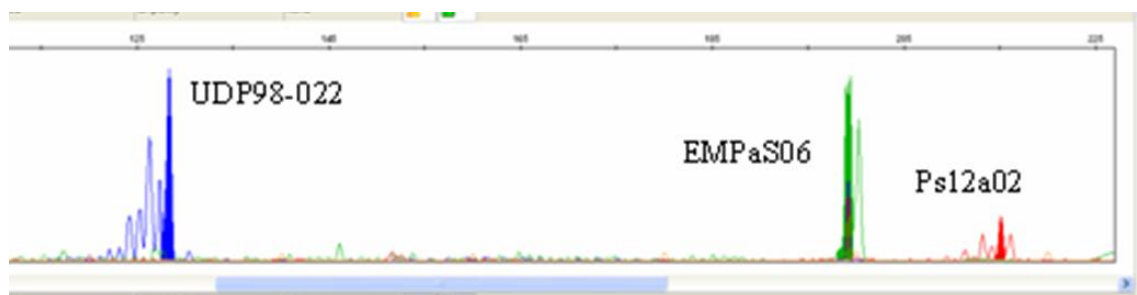
Фрагментный анализ на генетическом анализаторе Нанофор 05



Сорт груши Левен, маркеры CH01d09, CH01f07a и CH01d08

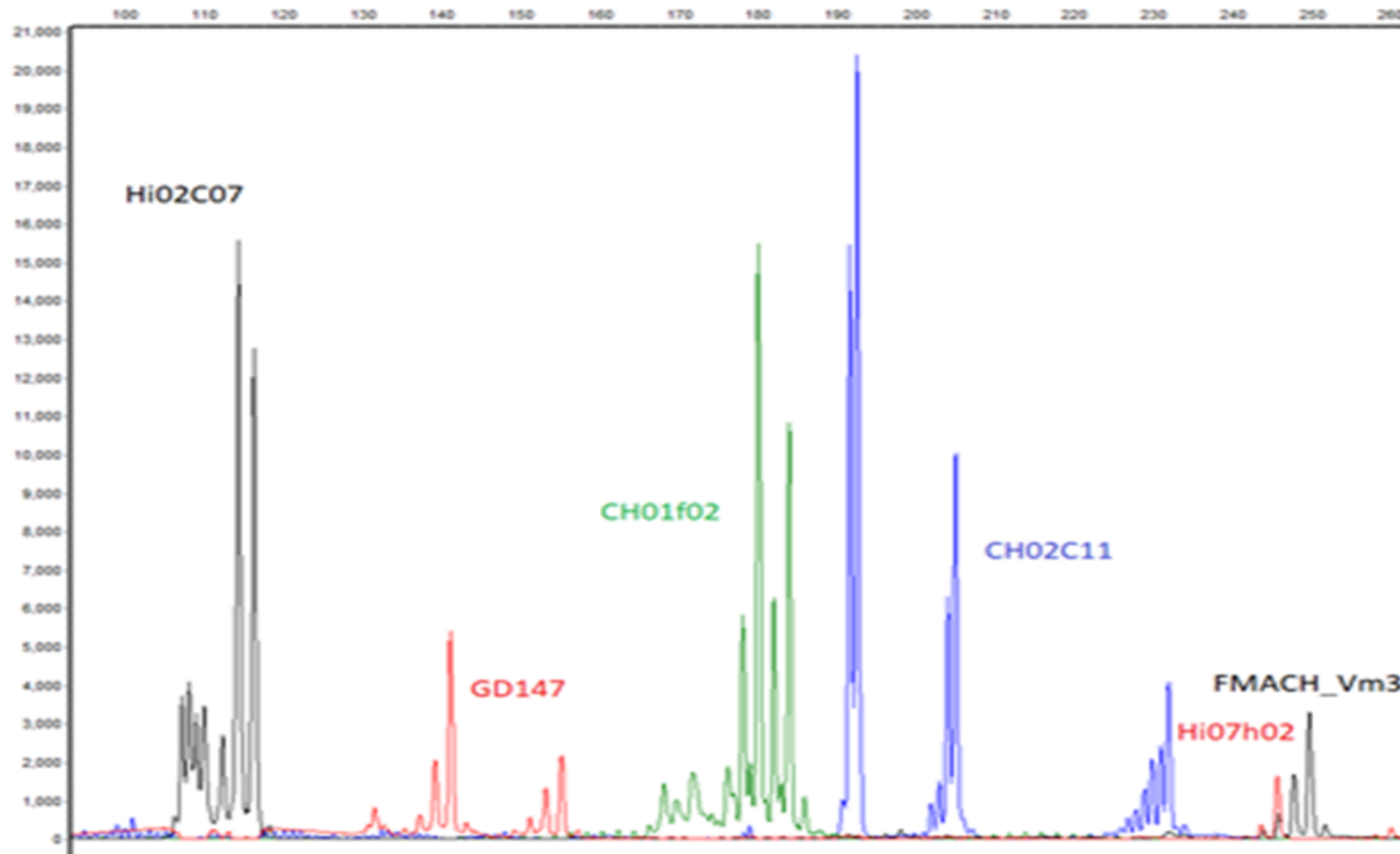


Сорт груши Вильямс, маркеры CH01d09, CH01f07a и CH01d08



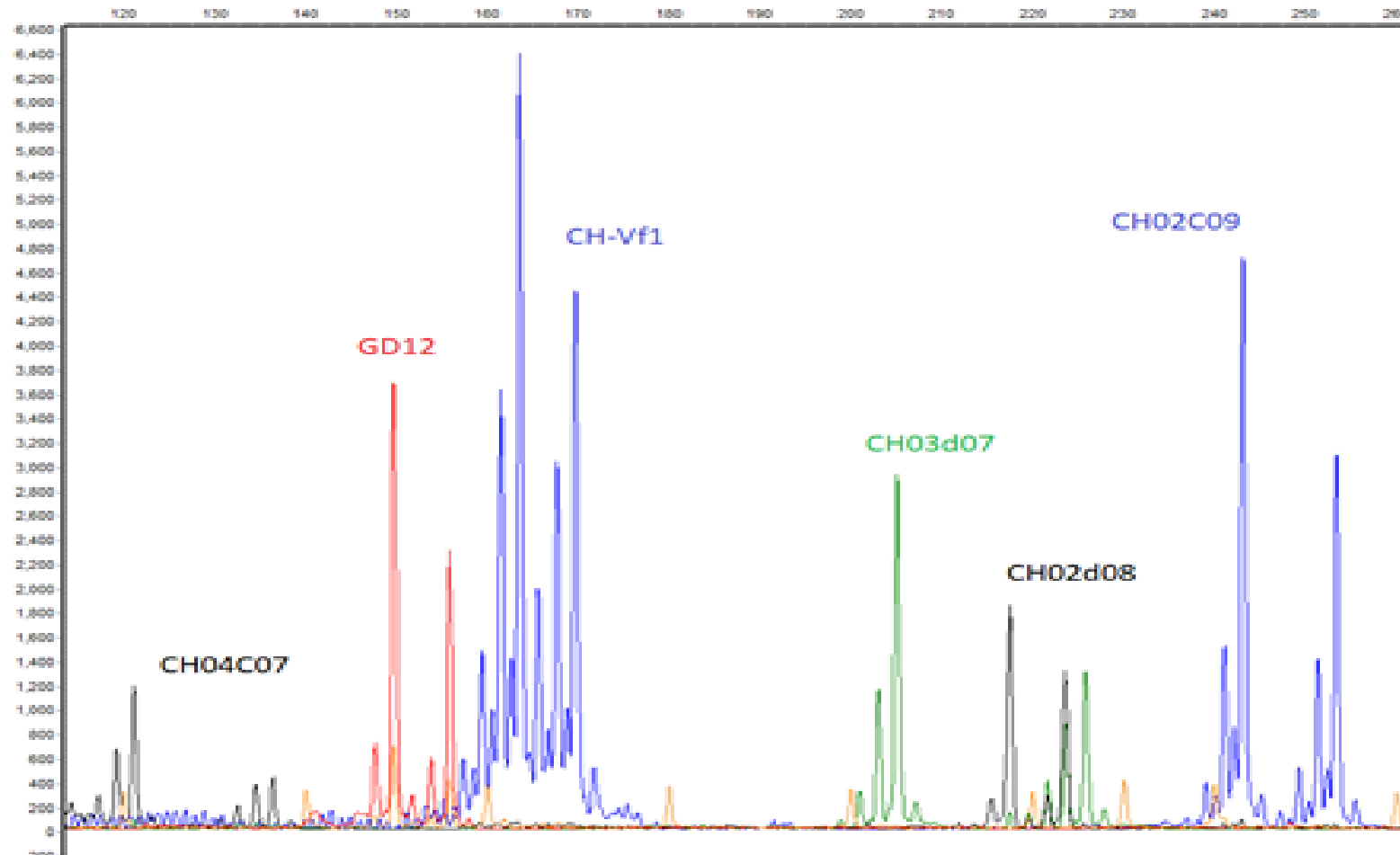
Сорт персика Дюймовочка, маркеры UDP98-022, EMPas-06, Ps12a02

Гексаплексные наборы SSR-маркеров



Сорт яблони Ренет Кубанский, SSR-маркеры Hi02C07, CH02c11, CH01f02, GD147, FMACH_Vm3-SSR, Hi07h02

Гексаплексные наборы SSR-маркеров



Сорт яблони Ред Делишес, SSR-маркеры CH03d07, CH04C07, CH02C09, CHVF1, CH02d08

Базы данных ДНК-фингеров яблони

C	D	E	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG
	Образец	Плоидность	CH05a03			CH03a04			CH581493			CH01f03b			H16a02						
			аллель 1	аллель 2	аллель 3	аллель 1	аллель 2	аллель 3	аллель 1	аллель 2	аллель 3	аллель 1	аллель 2	аллель 3	аллель 1	аллель 2					
28	СК-2		179	197					96	116							162	174		142	
29	СК-3		177	179					90	116							150	162		142	
30	СК-4		179						96	116							150	162		142	
31	ММ-106		167						102	118							144	174		142	
32	М-9		177	189					90	92							162	174		142	
33	M-9/MLA		177	189					90	92							162	174			
34	Щит		203						116								160	182		142	
35	Золотая корона		181						116	118							144	174		142	
36	Память есаулу		163	177					96	116							174			142	146
37	Зарево		167	187					112	118							144	162		142	
38	Апорт АСС		175	179					116								150	182		142	
39	Имрус								116								144	182		142	180
40	Строевское		167						110	116							174			142	180
41	Юбилей Москвы		167						110	118							174			142	
42	Старт								96	114							150	174		142	
43	Афродита		181						110	116							162	174		142	
44	Славянин		177	181					96												
45	Первинка		139	179					116												
46	Болотовское		175	187					96	102											
47	Свежесть		179	187																	
48	Орловское полесье		167	179		181			110												
49	Орловский пионер		139	179					116												
50	Солнышко		177	181					114												
51	Курнаковское		175	187					110	118											
52	Веньяминовское																				
53	Юбилей		167	177		181			96	114											

База данных

Образец

Плоидность

аллель 1

аллель 2

аллель 3

CH03g07

210.42

224.53

234.88

234.8

1 Черкесская 325

2 Барака

3 Бжелякокуж

База данных ДНК-фингеров груши

B	C	D	AO	AP	AQ	AR	AS	AT	AU	AV	AW	AX	AY	AZ	BA	BB	BC	BD	BE	BF	BG
Образец		Плоидность	17																		
			CH03g07			CH05C06			CH02B10			NH011b			NH004a						
			аллель 1	аллель 2	аллель 3	аллель 1	аллель 2	аллель 3	аллель 1	аллель 2	аллель 3	аллель 1	аллель 2	аллель 3	аллель 1	аллель 2					
1	Черкесская 325		210.42				103.4	116.01				135.6				168.21	171.33			87.72	
2	Барака		224.53	234.88			101.34	118.1				135.63				168.14	184.29			87.86	93.74
3	Бжелякокуж		234.8				89.32	111.76				127.5				168.28	171.33			87.62	
4	Скороспелка черкесская		234.95	237.03			99.3	101.32				135.64	139.86			168.24	171.28			93.46	
5	Черкесская урожайная		240.7	244.72			95.3	103.37				127.45	129.56			169.34	171.31			87.49	
6	Pyrus caucasica #1		210.39	247.06			90.42	113.89				117.28	135.59			171.37	173.36			87.49	
7	Краснодарская зимняя		228.72	234.77			89.39	93.33				125.43	137.77			173.33				89.45	93.35
8	Перлина		228.73	245.04			93.38	95.34				125.42				173.24	175.3			87.55	93.49
9	Зимняя млиевская		226.28	234.78			89.39					137.64				175.27				87.39	
10	Велега		245.06	258.93			93.4	111.72				135.6	143.58			173.36	182.26			85.6	87.66
11	Вербена		234.88	244.99			89.41	101.3				135.61	139.79			168.17	173.31			77.39	83.04
12	Самородок		234.78	245.03			89.33					131.7				169.32	175.29			87.66	
13	Джанкойская поздняя		228.72	230.78			89.4	95.3				137.66	145.44			169.24	173.31			87.49	
14	Шихан		228.74	245.07			109.67	113.85				137.64	141.51			169.23	175.18			87.6	90.31
15	Груша иволгинская		210.33/210.44/245.22				89.32/89.62/141.81/91.63					123.33/122.82/124.9				173.22/172.62				81.41/81.99/93.35/94.0	
16	Славянка		245.13	259.13			89.62					135.24				172.64				88.16	
17	Большая летняя		218.69	228.93			93.62	109.87				135.28	139.43			172.56	179.63			94.01	95.93
18	Вега		235.07				99.51					141.37				161.54	170.69			93.08	105.75
19	Скромница		245.19	163.2			93.58	112.02				124.88				172.63	174.67			77.97	94
20	Сочинская крупноплодная		235.05	245.17			89.62					131.35				172.7	178.64			91.04	105.74
21	Вильямс Ставропольский		245.16				93.61	111.98				124.93				172.65	174.69			88.18	94.01
22	Александрин Дульян		245.16	259.1			89.58	93.61				124.88	126.91			161.56	172.8			88.07/88.17	
23	Мальвина		229	245.25			93.63	95.61				124.96	145.33			168.77	172.73			88.2	94.01
24	Запорожская		245.2				89.58	93.63				124.89	137.43			172.68				90.05	105.78
25	Дево		235.06	245.31			89.64	93.64				141.67				168.87	172.75			86.08	93.9
26	Люберская		231.56	245.77			89.64	93.64				137.46				172.63	174.82			90.14/90.1	94.03/94.0
27	Космодемьянская		244.89				89.85	111.89				137.46				172.64					

Генетические паспорта сортов

Сорт яблони Прикубанское

<i>Учреждение, где создан сорт</i>		<i>ФГБНУ СКФНЦСВВ</i>
<i>Год внесения в Госреестр</i>		<i>2002</i>
<i>Код сорта в Госреестре</i>		<i>9604863</i>
<i>№ патента / дата выдачи</i>		<i>1652 / 23.10.2002</i>
<i>Авторы сорта</i>		<i>Л.М. Сергеев, Е.И. Костецкая, Л.С. Наумова, И.Л. Ефимова, В.Е. Харина, Т.Г. Причко</i>
<i>Происхождение</i>		<i>Ред Делишес × Опалесцент</i>
<i>Результаты SSR-генотипирования:</i>		
<i>Локус</i>		<i>Размеры аллельных фрагментов (п.н.):</i>
1	CH04e05	176:224
2	GD100	229:229
3	GD96	174:174
4	CH01h10	95:102
5	CH04c07	114:136
6	CH03d07	192:207
7	GD12	159:164
8	CH02C09	250:254

Необходимые мероприятия для завершения разработки методик ДНК-паспортизации

- ▶ Принятие единых наборов ДНК-маркеров
- ▶ Выбор единых сортов контролей для целевых культур и алгоритмами обеспечения пробами ДНК
- ▶ Решение методических задач генотипирования (при необходимости)
- ▶ Завершение разработки унифицированных протоколов анализа по всем этапам (включая сличительный тест методик в нескольких лабораториях)
- ▶ Разработка нормативной документации (ГОСТ)

Спасибо за внимание!