

КОНКУРЕНТНАЯ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧНАЯ ПЦР (KASP): ОСОБЕННОСТИ, ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Е.А. НИКИТИНА¹, А.В. АРХИПОВ¹, Я.В. МИНЬКОВА¹,
А.С. ЯНОВСКИЙ², В.А. КОРОБКОВА¹, М.А. САМАРИНА^{1,3},
А.Г. ЧЕРНООК¹, П.Ю. КРУПИН¹, Г.И. КАРЛОВ¹, М.Г. ДИВАШУК^{1,3}

(¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии»

² ФГБНУ «Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко»

³ Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева)

Использование конкурентной аллель-специфичной ПЦР становится популярным методом для массового генотипирования сельскохозяйственных культур. Разработка маркеров на SNP в полиплоидных организмах требует дополнительной проверки и тестирования при разработке праймеров для дальнейшего использования. Предлагается алгоритм проверки и интерпретации работоспособности KASP-маркеров на пшенице с помощью существующих геномных сборок мягкой пшеницы. С помощью описанного алгоритма было проанализировано 6 KASP-маркеров на гены VIVIPAROUS-1, MOTHER OF FT AND TFL1, TGW6-A1, PSY-A1, Dreb-B1 и локус устойчивости к листовой ржавчине Lr14a. Наиболее перспективными KASP-маркерами по результатам биоинформатического анализа и ПЦР оказались маркеры на гены VIVIPAROUS-1, MOTHER OF FT AND TFL1.

Ключевые слова: KASP, твердая пшеница, мягкая пшеница, выравнивание последовательностей, конкурентная аллель-специфичная ПЦР, молекулярный маркер.

Введение

По данным FAO, твердая и мягкая пшеница является одной из ключевых культур, возделываемых на территории Российской Федерации. Современные темпы роста населения и требования к качеству продукции, в частности, зерна, приводят к поиску новых стратегий селекции, в том числе высокопроизводительного генотипирования сортов, селекционных форм, линий, популяций по аллелям генов, влияющих на проявление хозяйственно-ценных признаков [2, 17, 12, 22].

Существует большое количество методов и разработанных маркеров, позволяющих различить аллели генов, представляющих интерес для селекционеров. У многих типов маркеров есть ряд недостатков для массового анализа: например, кодоминантные маркеры, различающие аллели по размеру ампликона, требуют проведения гель-электрофореза, CAPS-маркеры требуют проведения рестрикционного анализа и гель-электрофореза [4, 10, 16].

Конкурентная аллель-специфичная ПЦР (Kompetitive allele specific PCR -KASP) позволяет проводить быстрое и массовое генотипирование большого количества сортов или линий. Суть метода заключается в конкурентировании двух праймеров, подобранных таким образом, чтобы на 3'-конце каждого праймера содержался SNP, с помощью которого можно различить анализируемые аллели гена. KASP-маркер состоит из двух прямых праймеров, с помощью которых происходит различение аллелей, и одного общего обратного праймера, и двух соответствующих прямым праймерам FRET-кассет (Fluorescence resonance energy transfer) с флуорофорами разной длины волны.

Таким образом, если анализируемый объект гомозиготен, то амплификация происходит только с одним из прямых праймеров, что приводит к детекции сигнала той длины волны,

которая соответствует этому прямому праймеру. В случае гетерозиготного по анализируемому гену объекта детектироваться будут сигналы обеих волн. KASP-генотипирование требует наличия амплификатора с несколькими каналами детекции сигнала в реальном времени и не требует дальнейшего проведения гель-электрофореза [1, 9].

Для разработки KASP-маркера используются данные SNPseq (типирование однонуклеотидных полиморфизмов) и GWAS (genome-wide association studies, полногеномный поиск ассоциаций) для поиска SNP, ассоциированных с фенотипическим проявлением хозяйственно-ценного признака. В настоящее время были разработаны KASP-маркеры на множество хозяйственно-ценных генов у различных культур включая пшеницу [18].

Разработка маркеров – сложный процесс, требующий валидации и верификации различными способами на всех этапах процесса. Один из способов – проверка специфичности последовательности праймеров непосредственно в последовательности генома твердой или мягкой пшеницы.

В настоящее время доступны данные собранных геномов мягкой пшеницы с разным географическим происхождением, на основе которых можно проводить первичную проверку праймеров для дальнейшей работы с ними и интерпретации фактически получаемых данных.

Материал и методика исследований

Биоинформатический анализ. Были использованы KASP-маркеры, разработанные на различные признаки устойчивости к болезням и неблагоприятным факторам среды, маркеры на гены, влияющие на другие хозяйственно-ценные признаки (табл. 1). Последовательности праймеров получены из источников литературы. Последовательности геномов мягкой пшеницы, на которые выравнивались праймеры, доступны в NCBI (National Center for Biotechnology Information) (табл. 2).

Выравнивание последовательностей праймеров в геномах проводилось на локальном сервере с помощью BLAST 2.5.0. Полученные результаты конвертировались в BED-файл, содержащий координаты участка с сайтом посадки праймера, длина участка составляла 2000 пн. Перекрывающиеся участки сливались в один и приобретали длину более 2000 пн. Экстракция последовательностей геномов, содержащих места посадки праймеров, проводилась с помощью bedtools v2.26.0. Фильтрация полученных последовательностей проводилась с помощью seqkit v2.2.0 по целевой хромосоме и по длине последовательности. Последовательности, полученные с целевой хромосомы, использовались для дальнейшего анализа без учета длины последовательности. Последовательности, полученные не с целевой хромосомы, использовались для дальнейшего анализа только в случае длины более 2000 пн, так как это означало, что на нецелевой хромосоме выравниваются один из прямых праймеров и обратный праймер, что может привести к амплификации неспецифического продукта. Визуализация результатов проводилась в GeneDoc software.

Растительный материал. Выделение ДНК. KASP-анализ. Для апробации работоспособности праймеров была использована коллекция твердой пшеницы НЦЗ им. П.П. Лукьяненко (96 образцов). ДНК выделялась СТАВ-методом с модификациями [15].

Рабочая смесь ПЦР объемом 10 мкл содержала 5 мкл мастер-микс (LCG Bioscience Technologies, KASP 2X Mmix KBS-1050–102 с присутствием красителей FAM, HEX, ROX); 0,14 мкл праймеров и 5 мкл ДНК-матрицы. Смесь инкубировалась на следующем термальном цикле: первичная денатурация – 94°C, 15 мин, 1 цикл; 94°C, 20 с, 60 С, 1 мин с понижением температуры на 0,6°C каждый цикл – 9 циклов; 94°C, 20 с, 55°C, 1 мин – 35 циклов; 37°C, 1 мин – считывание сигнала. Для проведения ПЦР, считывания сигнала и обработки данных использовались амплификатор BIO-RAD CFX96 и программное обеспечение CFX Manager.

Маркеры и последовательности праймеров, использованные в работе

Признак	Ген	Локализация	Вариант аллели	Последовательности KASP праймеров	Источники
Предуборочное прорастание	<i>MFT-A1 (MOTHER OF FT AND TFL1)</i>	3AS	Jagger type	GTCCTTCCAGAGGC-CATGTGC	Lei et al. (2013); Rasheed et al. (2016)
			Others	GTCCTTCCAGAGGC-CATGTGC	
				ACAGGTCAAGCGACAC-GTAGCC	
Предуборочное прорастание	<i>VP-1B (Viviparous-1)</i>	3BL	<i>Vp-1Ba, b</i>	CGCTCTTATATTAGTTTACG-GAGGGAG	Yang et al. (2007); Rasheed et al. (2016)
			<i>Vp-1Bc</i>	CTCATTTTGATAGCTC-TAGCTAA	
				CTTCTTCCGAAGTGAT-CATATG	
Засухоустойчивость	<i>Dreb-B1 (Dehydration responsive element binding)</i>	3BS	<i>Dreb-B1a</i>	CCTGCG-CACTTTCTTCTTCCTGT	Wei et al. (2009); Rasheed et al. (2016)
			<i>Dreb-B1b</i>	CTGCG-CACTTTCTTCTTCCTGG	
				TTTCACCTTGATATG-GATTGCCTTGAT	
Устойчивость к листовой ржавчине	Lr14a	7BL	<i>Lr14+</i>	CTACACTAGTACTACTTT-GAGACAATTTTTT	Terracciano et al. (2013); Rasheed et al. (2016)
			<i>Lr14-</i>	ACACTAGTACTACTTT-GAGACAATTTTAA	
				AACAAACTCCAGTGTAAC-CACCACAGTTT	
Масса зерновки	TGW6 (Thousand grain weight)	3AL	<i>TGW6-A1a</i>	CTGCGCTTCACCAACGGT-GTTGACGTCG	Hanif et al. (2016); Rasheed et al. (2016)
			<i>TGW6-A1b</i>	CTGCGCTTCACCAACGGT-GTTGACGTCA	
				GTGAAGTAGACTTGACCC-GTAACTTGAT	
Цвет зерновки	<i>Psy-A1 (Phytoene synthase)</i>	7AL	Psy-A1a	GCCATCTACGGTAATCT-GAAAATTCA	He et al. (2008); Rasheed et al. (2016)
			Psy-A1b	GCCATCTACGGTAATCT-GAAAATTCG	
				GTGAAGTAGACTTGACCC-GTAACTTGAT	

Использованные в исследовании сборки геномов мягкой пшеницы

Genbank accession	Название сорта
ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_903993985.1	ArinaLrFor
ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_903994185.1	SY Mattis
ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_903993975.1	LongReach Lancer
ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_903994175.1	Mace
ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_904066035.1	Norin 61
ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_903994155.1	CDC Stanley
ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_903994195.1	Julius
ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_903995565.1	CDC Landmark
ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_903993795.1	Jagger
ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_018294505.1	Chinese Spring

Результаты и их обсуждение

С помощью биоинформатических методов и непосредственной апробации с помощью ПЦР нами проанализированы 5 различных молекулярных KASP-маркеров, разработанных на гены мягкой и твердой пшеницы.

VIVIPAROUS-1 (VP-1B). Классический молекулярный маркер на ген *VP-1B* был разработан Yang et al. (2007), апробацию KASP-маркера осуществили Rasheed et al. (2016). Ген *VIVIPAROUS-1* (*VP-1B*), локализованный на хромосоме 3B, оказывает влияние на развитие зародыша и переход в фазу покоя [23]. Праймеры для KASP-маркера подобраны на инсерцию-делецию 83 пн, которая отличает аллель *VP-1Bc*, ассоциированный с устойчивостью к прорастанию на корню, от аллелей *VP-1Ba* и *VP-1Bb*, ассоциированных с неустойчивостью. Выравнивание последовательностей показало отсутствие неспецифических выравниваний на другие хромосомы, отсутствие неточностей в последовательностях праймеров, выравнивания единообразны во всех проанализированных 10 геномах мягкой пшеницы (рис. 1А).

На рисунке 1Б представлена картина анализа флуоресценции по конечной точке ПЦР-продукта, полученного с помощью анализируемых маркеров. Как можно увидеть, аллельная дискриминация ПЦР четко разделяет образцы по генотипу. Черная точка на картинке – отрицательный контроль (вода); облако синих точек – образцы пшеницы, несущие аллель *VP-1Bc*; облако оранжевых точек – образцы пшеницы, несущие аллель *VP-1Ba* или *VP-1Bb*; зеленая точка – гетерозиготный образец. При этом разница интенсивности флуоресценции по обоим каналам детекции по сравнению с отрицательным контролем достаточно существенная и составляет 500–1000 ед. (рис. 1Б). Оба облака точек четко разделяются и отстоят друг от друга на существенном расстоянии. Таким образом, по всем параметрам это эталонно-работающий маркер.

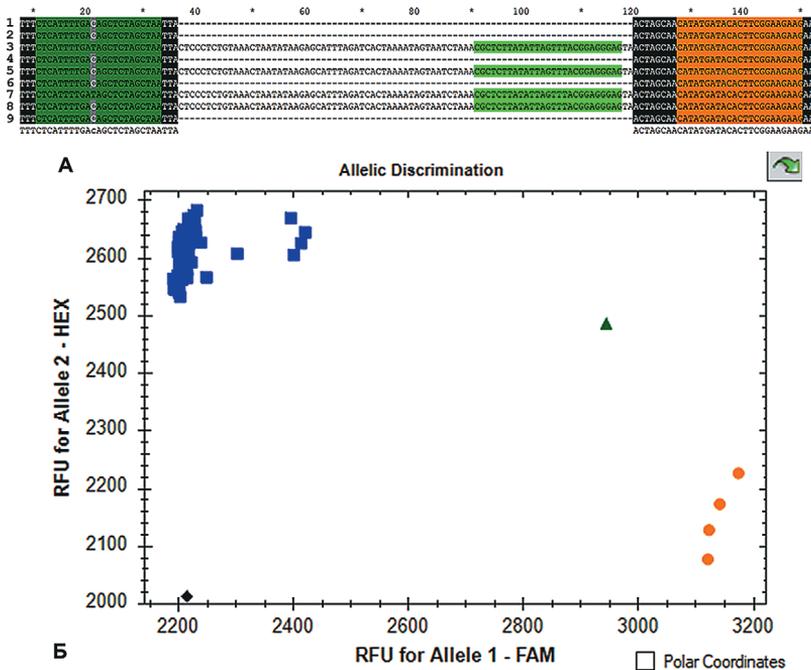


Рис. 1А. Визуализация расположения последовательностей праймеров KASP-маркера на аллельные варианты гена *VP-1B* на сборках геномов мягкой пшеницы: 1 – CDC Landmark 3B; 2 – LongReach Lancer 3B; 3 – Julius 3B; 4 – Jagger 3B; 5 – ArinaLrFor 3B; 6 – CDC Stanley 3B; 7 – Norin 61 3B; 8 – SY Mattis 3B; 9 – Mace 3B. Салатовым цветом выделены последовательности праймера на аллели *VP-1Ba/VP-1Bb* (FAM, неустойчивый к прорастанию на корню), темно-зеленым – праймеры на аллель *VP-1Bc* (HEX, устойчивый к прорастанию на корню), оранжевым – обратный общий праймер.

Б. Результат детекции по конечной точке флуоресценции ПЦР (оранжевый цвет – образцы, гомозиготные по аллелю *VP-1Ba* или *VP-1Bb*, синий – образцы, гомозиготные по аллелю *VP-1Bc*, зеленый – гетерозиготные образцы, черный – отрицательный контроль)

MOTHER OF FT AND TFL1. Молекулярный маркер на ген *MFT-A1* был разработан Lei et al. (2013), апробацию KASP-маркера осуществили Rasheed et al. (2016). Ген *MOTHER OF FT AND TFL1* (*MFT-A1*) локализован на хромосоме 3A и оказывает влияние на устойчивость к предуборочному прорастанию [11]. Выделяют аллельное состояние гена Jagger type, ассоциированное с устойчивостью к прорастанию на корню, и Others – другие варианты гена, влияние на устойчивость которых не подтверждено достоверно. Выравнивание последовательностей праймеров в геномах показало, что 3'-конец праймера приходится на динуклеотидный полиморфизм. Праймеры выравниваются только на целевые хромосомы, выравнивание является единообразным.

На рисунке 2Б представлен один из типичных результатов анализа с помощью KASP-маркеров, когда в выборке проанализированных образцов не встречается аллельное разнообразие. Зачастую автоматическая программа анализа аллельной дискриминации по конечной точке флуоресценции пытается разнести их на разные типы аллелей (рис. 2В). Однако следует обращать внимание на изменение уровня флуоресценции по каждому из каналов: изменение по каналу флуоресценции FAM составило всего около 140 ед., а по каналу HEX – 300–700 ед. С учетом предварительной биоинформатической проверки праймеров, которая показала, что праймеры высокоспецифичны, мы должны отнести все проанализированные образцы к типу HEX и аллельному варианту Others.

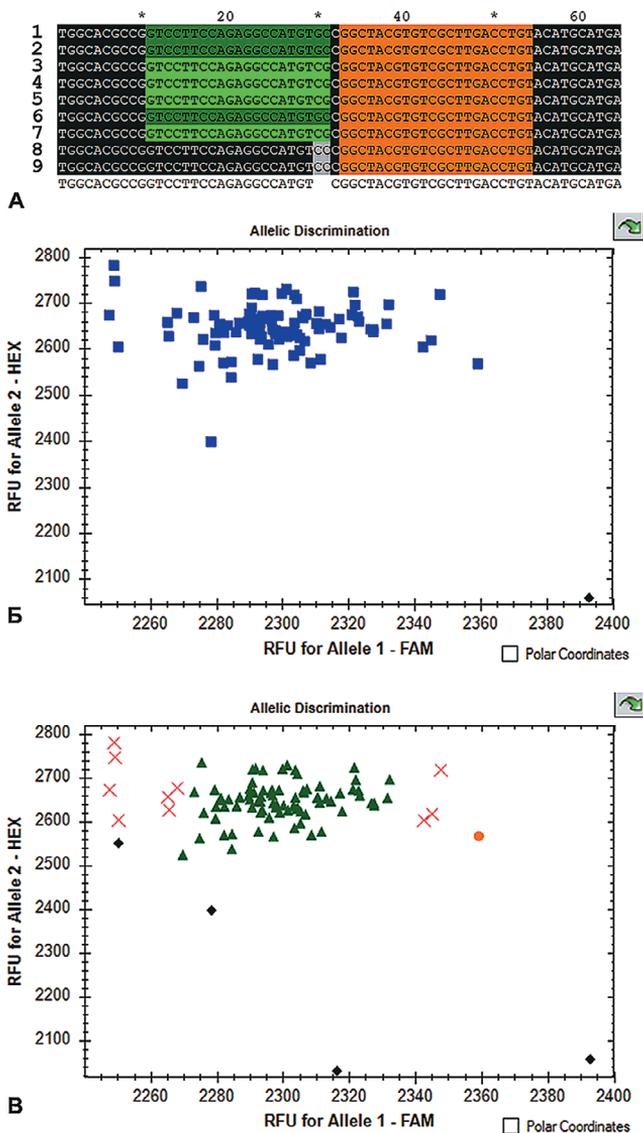


Рис. 2А. Визуализация расположения последовательности праймеров KASP-маркера MFT-1A на геномах мягкой пшеницы: 1 – LongReach Lancer 3A; 2 – ArinaLrFor 3A; 3 – CDC Landmark 3A; 4 – Julius 3A; 5 – Jagger Un; 6 – Norin 61 3°; 7 – SY Mattis 3°; 8 – CDC Stanley 3°; 9 – Mace 3A. Салатовым цветом выделены последовательности праймера на аллели гена *MFT-1A* Jagger type (FAM, устойчивый к предуборочному прорастанию), темно-зеленым – аллель гена *MFT-1A* Others (HEX, неустойчивый к предуборочному прорастанию), оранжевым – обратный общий праймер.

Б. Результат детекции по конечной точке флуоресценции ПЦР (оранжевый цвет – образцы, гомозиготные по аллелю Jagger type, синий – образцы, гомозиготные по аллелю Others, зеленый – гетерозиготные образцы, черный – отрицательный контроль).

В. Результат детекции по конечной точке флуоресценции ПЦР, определенный автоматически программным обеспечением

Dehydration responsive element binding. Молекулярный маркер на ген *DREB-1B* был разработан Wei et al. (2009), разработку KASP-маркера и апробацию осуществили Ra-sheed et al. (2016). Ген *Dehydration responsive element binding (DREB-1B)* локализован

на хромосоме 3В, его аллель *DREB-1a* ассоциирована с засухоустойчивостью [21]. При биоинформатическом анализе было показано, что в геноме Chinese Spring праймеры выравниваются на гомеологичные хромосомы всех трех субгеномов пшеницы (рис. 3А, 3Б). Данные праймеры могут привести к образованию неспецифичного продукта в ходе реакции и к сложностям интерпретации результатов.

На рисунке 3В представлен результат анализа с помощью KASP-маркеров. Как и в случае с предыдущими праймерами, автоматическая программа анализа аллельной дискриминации по конечной точке флуоресценции пытается разнести образцы на разные типы аллелей. По уровню флуоресценции по каждому из каналов флуоресценции видим, что изменение по каналу флуоресценции FAM составило всего 200–800 ед., а по каналу HEX – всего 40 ед.

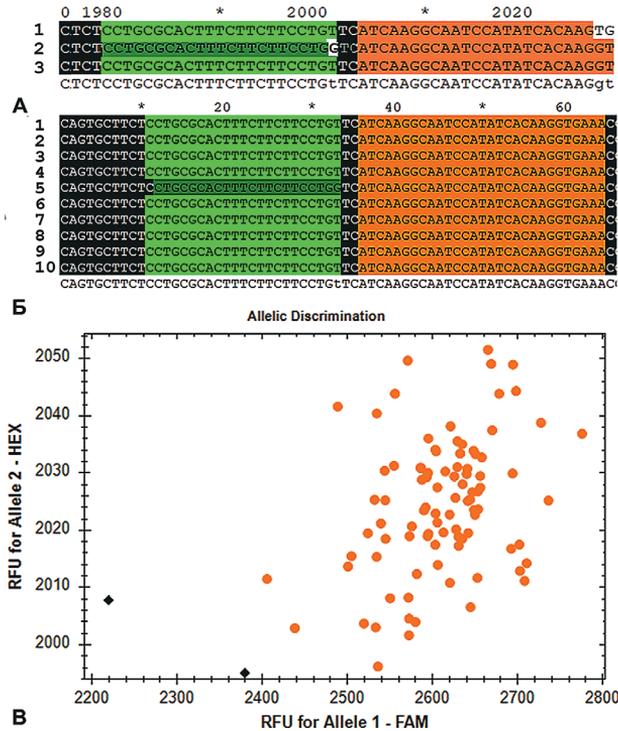


Рис. 3А. Визуализация расположения последовательностей праймеров KASP-маркера DREB-B1 на геноме мягкой пшеницы:

1 – Chinese Spring 3A; 2 – Chinese Spring 3B; 3 – Chinese Spring 3D.

Салатовым цветом выделены последовательности праймера на аллели *Dreb-B1a* (FAM повышает засухоустойчивость), темно-зеленым – аллель *Dreb-B1b* (HEX понижает засухоустойчивость), оранжевым – обратный общий праймер.

Б. Визуализация расположения последовательностей

праймеров KASP-маркера MFT-1A на геномах мягкой пшеницы:

1 – CDC Stanley 3B; 2 – SY Mattis 3B; 3 – Mace 3B; 4 – Norin 61 3B; 5 – CDC Landmark 3B; 6 – LongReach Lancer 3B; 7 – Julius 3B; 8 – Jagger 3B; 9 – ArinaLrFor 3B.

В. Результат детекции по конечной точке флуоресценции ПЦР (оранжевый цвет – образцы, гомозиготные по аллелю *DREB-B1a*, синий – образцы, гомозиготные по аллелю *DREB-B1b*, зеленый – гетерозиготные образцы, черный – отрицательный контроль)

Таким образом, все проанализированные образцы должны быть отнесены к типу FAM и аллельному варианту *DREB-B1a*. Большая «вытянутость» облака точек по каналу детекции FAM (200–800) может быть объяснена некоторым

неспецифическим срабатыванием праймеров на других сайтах локализации. Однако при наличии предварительного биоинформатического анализа это не мешает правильному определению аллельных вариантов у изучаемых образцов. По результатам ПЦР все проанализированные образцы относятся к генотипу *DREB-B1a*.

Ген устойчивости к листовой ржавчине Lr14a. Молекулярный маркер на локус *Lr14a* был разработан Terracciano et al. (2013), апробацию KASP-маркера осуществили Rasheed et al. (2016). Ген устойчивости к листовой ржавчине *Lr14* локализован на хромосоме 7В [19]. Выравнивание в геномах показало, что место посадки праймеров является полиморфным участком. Праймеры при возможности нужно подбирать на консервативные участки последовательности, в противном случае ожидается отсутствие реакции с участием этих праймеров (рис. 4А).

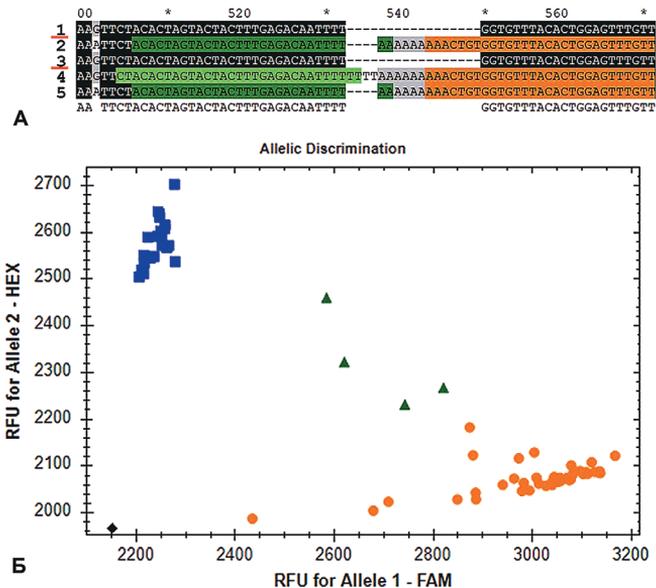


Рис. 4А. Визуализация расположения последовательностей праймеров KASP-маркера *Lr14a* на геномах мягкой пшеницы: 1 – Mace 7В; 2 – Norin 61 7В; 3 – Jagger 7В; 4 – LongReach Lancer 7В; 5 – ArinaLrFor 7В.

Салатовым цветом выделены последовательности праймера на аллели *Lr14+* (FAM, устойчивый к листовой ржавчине), темно-зеленым – аллель *Lr14-* (HEX, неустойчивый к листовой ржавчине), оранжевым – обратный общий праймер.

Линиями красного цвета подчеркнуты выравнивания на целевой хромосоме, которые сильно отличаются в местах посадки праймеров.

Б. Результат детекции по конечной точке флуоресценции ПЦР (оранжевый цвет – образцы, гомозиготные по аллелю *Lr14+*, синий – образцы, гомозиготные по аллелю *Lr14-*, зеленый – гетерозиготные образцы, черный – отрицательный контроль)

На рисунке 4Б представлена картина анализа флуоресценции по конечной точке ПЦР продукта, полученного с помощью анализируемых маркеров. Аллельная дискриминация ПЦР подразделяет образцы по генотипу, но нет четкого разделения между группами гетерозигот и группой образцов с флуоресценцией по каналу FAM. Наиболее вероятно, что это вызвано полиморфизмом в местах посадки праймеров, выявленным при биоинформатическом анализе.

Таким образом, при интерпретации полученных результатов образцы могут быть достоверно подразделены только на две группы: 1) отсутствие *Lr14* (аллель *Lr14-*, HEX); 2) наличие *Lr14* в гомозиготном (аллель *Lr14+*, FAM) или гетерозиготном состоянии.

Thousand grain weight. Молекулярный маркер на ген *TGW6* был разработан Hanif et al. (2016), апробацию KASP-маркера осуществили Rasheed et al. (2016). Ген *Thousand grain weight (TGW6)*, локализованный на хромосоме 3A, оказывает влияние на массу зерновки, аллель *TGW6-A1a* повышает массу зерновки [6]. Праймеры выравниваются на хромосому 3A в нескольких местах, а также на хромосому 3B. Использование данных праймеров может привести к амплификации нецелевого участка и невозможности правильно интерпретировать результаты (рис. 5А).

На рисунке 5Б представлена картина анализа флуоресценции по конечной точке ПЦР продукта, полученного с помощью анализируемых маркеров. Разделение образцов выглядит в виде двух вытянутых вдоль оси абсцисс облаков. Это вызвано неспецифической амплификацией по каналу FAM с нецелевых участков хромосом, показанных с помощью биоинформатического анализа. В данном случае при интерпретации результатов можно говорить только о наличии аллеля *TGW6-A1b* (HEX) без определения его состояния (гомо- или гетерозигота).

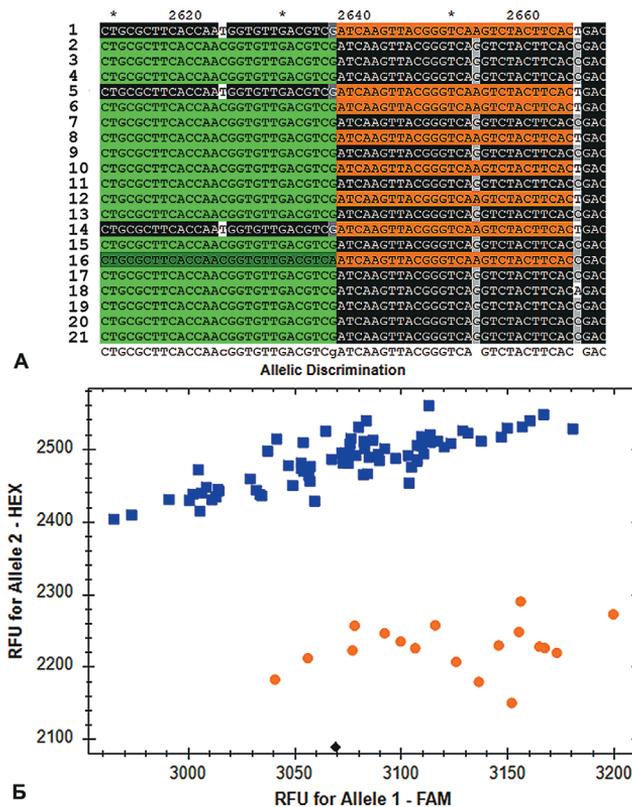


Рис. 5А. Визуализация расположения последовательностей праймеров KASP-маркера *TGW6* на геномах мягкой пшеницы:

- 1, 2, 3 – Jagger 3A; 4, 5 – LongReach Lancer 3A; 6, 7 – ArinaLrFor 3A; 8, 9 – Mace 3A; 10, 11 – Julius 3A; 12; 13 – CDC Stanley 3A; 14, 15 – CDC Landmark 3A; 16, 17 – Norin61 3A; 18 – LongReach Lancer 3B; 19 – LongReach Lancer 3D; 20 – Mace 3D; 21 – Norin61 3D).

Салатовым цветом выделены последовательности праймера на аллели *TGW6-A1a* (FAM повышает массу зерновки), темно-зеленым – аллель *TGW6-A1b* (HEX), оранжевым – обратный общий праймер. Праймеры имеют несколько сайтов выравнивания в каждом геноме на целевых и нецелевых хромосомах.

Б. Результат детекции по конечной точке флуоресценции ПЦР (оранжевый цвет – образцы, гомозиготные по аллелю *TGW6-A1a*, синий – образцы, гомозиготные по аллелю *TGW6-A1b*, черный – отрицательный контроль)

PSY-A1. Молекулярный маркер на ген *PSY-A1* был разработан He et al. (2008), апробацию KASP-маркера осуществили Rasheed et al. (2016). Ген *PSY-A1*, локализованный на хромосоме 7A, кодирует фермент фитоенсинтазу, который оказывает влияние на цветочные характеристики конечной продукции. Аллель *PSY-A1a* связывают с повышением содержания желтого пигмента, аллель *PSY-A1b* – со сниженным содержанием, нуклеотидная последовательность последнего отличается от *PSY-A1a* вставкой [8]. Выравнивание праймеров показало, что прямой *PSY-A1a*-специфичный праймер выравнивается на общий для обоих аллелей регион, а прямой *PSY-A1b*-специфичный праймер выравнивается на вставку, отличающую *PSY-A1b* от *PSY-A1a* (рис. 6А). Это приводит к тому, что при наличии аллеля *PSY-A1b* оба прямых праймера имеют равную вероятность отжига, и это может затруднить кластеризацию образцов в зависимости от длины волны испускаемого сигнала.

На рисунке 6Б представлены результаты работы данных праймеров. Несмотря на то, что картина похожа на варианты, описанные нами в некоторых предыдущих вариантах апробации праймеров, с учетом данных, полученных с помощью биоинформатического анализа, интерпретация данной картины невозможна. Данный молекулярный KASP-маркер работает некорректно и не может быть использован для массовых анализов.

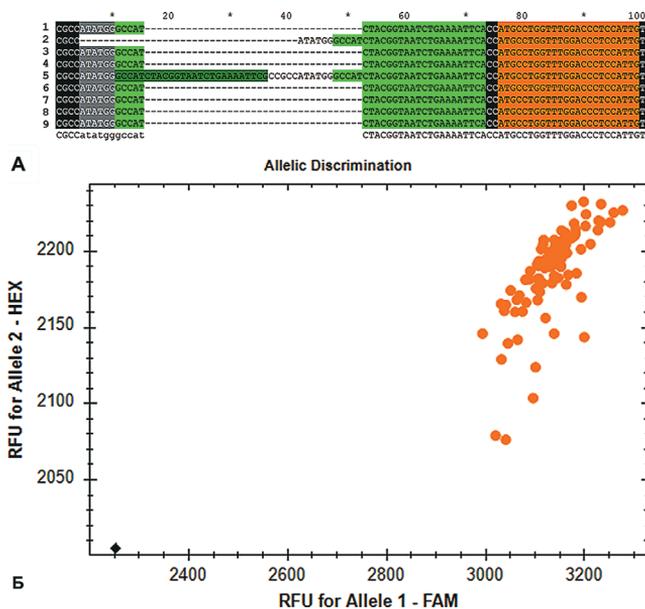


Рис. 6А. Визуализация расположения последовательностей праймеров KASP-маркера *PSY-A1* на геномах мягкой пшеницы:

- 1 – Norin 61 7A; 2 – Mace 7A; 3 – CDC Stanley 7A; 4 – SY Mattis 7A; 5 – LongReach Lancer 7A; 6 – Julius 7A; 7 – Jagger 7A; 8 – ArinaLrFor 7A; 9 – CDC Landmark Un.

Салатовым цветом выделены последовательности праймера на аллели *PSY-A1a* (FAM, повышение содержания желтого пигмента), темно-зеленым – аллель *PSY-A1b* (HEX, понижение содержания желтого пигмента), оранжевым – обратный общий праймер.

Б. Результат детекции по конечной точке флуоресценции ПЦР (оранжевый цвет – образцы, гомозиготные по аллелю *PSY-A1a*, черный – отрицательный контроль)

В результате исследований установлено, что ряд маркеров нуждается в доработке и дополнительных тестах и исследованиях, а один из них можно признать неработающим. Подбор последовательностей праймеров для полиплоидных организмов (таких, как пшеница) часто становится непростой задачей. Существует множество инструментов для облегчения дизайна праймеров с учетом особенностей полиплоидных геномов [13]. Предложенный нами метод позволяет быстро проверить, насколько уже

существующие маркеры отвечают требованиям работоспособности и эффективности. Ранее в исследованиях Brinton et. al (2020), Darrier et. al (2022) использовались геномные сборки мягкой пшеницы для картирования генов и идентификации новых гаплотипов.

В результате проведенных исследований были продемонстрированы различные варианты амплификации KASP-маркеров и их интерпретации с учетом биоинформатического анализа.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 21–16–00121 и государственного задания № 0431–2022–0009.

Библиографический список

1. Ayalew H., Tsang P.W., Chu C., Wang J., Liu S., Chen C., Ma X.F. Comparison of TaqMan, KASP and rhAmp SNP genotyping platforms in hexaploid wheat // PLOS ONE. – 2019. – Vol. 14. – № 5. – P. e0217222.
2. Brinton J., Ramirez-Gonzalez R.H., Simmonds J., Wingen L., Orford S., Griffiths S. & 10 Wheat Genome Project, Haberer G., Spannagl M., Walkowiak S., Pozniak C. & Uauy C. A haplotype-led approach to increase the precision of wheat breeding // Communications Biology. – 2020. – Vol. 3. – № 1. – P. 712.
3. Darrier B., Colas I., Rimbert H., Choulet F., Bazile J., Sortais A., Jenczewski E., Sourdille P. Location and Identification on Chromosome 3B of Bread Wheat of Genes Affecting Chiasma Number // Plants. – 2022. – Vol. 11. – № 17. – P. 2281.
4. Duan X., Yu H., Ma J., Sun W., Zhao Y., Yang R., Ning T., Li Q., Q. Liu, Guo T., Yan M., Tian J., Chen J. A major and stable QTL controlling wheat thousand grain weight: identification, characterization, and CAPS marker development // Molecular Breeding. – 2020. – Vol. 40. – № 7. – P. 68.
5. Food and Agriculture Organization of the United Nations Selected indicators in Russian Federation // Сайт FAOSTAT. – 2020. – URL: <https://www.fao.org/faostat/en/#country/185>.
6. Hanig M., Gao F., Liu J., Wen W., Zhang Y., Rasheed A., Xia X., He Z. & Cao S. TaTGW6-A1, an ortholog of rice TGW6, is associated with grain weight and yield in bread wheat // Molecular Breeding. – 2016. – Vol. 36. – № 1. – P. 1.
7. He X.Y., He Z.H., Zhang L.P., Sun D.J., Morris C.F., Fuerst E.P. & Xia X.C. Allelic variation of polyphenol oxidase (PPO) genes located on chromosomes 2A and 2D and development of functional markers for the PPO genes in common wheat // Theoretical and Applied Genetics. – 2007. – Vol. 115. – № 1. – Pp. 47–58.
8. He X.Y., Zhang Y.L., He Z.H., Wu Y.P., Xiao Y.G., Ma C.X. & Xia X.C. Characterization of phytoene synthase 1 gene (Psy1) located on common wheat chromosome 7A and development of a functional marker // Theoretical and Applied Genetics. – 2008. – Vol. 116. – № 2. – Pp. 213–221.
9. Kaur B., Mavi G.S., Gill M.S., Saini D.K. Utilization of KASP technology for wheat improvement // Cereal Research Communications. – 2020. – Vol. 48. – № 4. – Pp. 409–421.
10. Kumar S., Kumar M., Mir R.R., Kumar R. & Kumar S. Advances in Molecular Markers and Their Use in Genetic Improvement of Wheat // Physiological, Molecular, and Genetic Perspectives of Wheat Improvement. – Cham: Springer International Publishing, 2021. – Pp. 139–174.
11. Lei L., Zhu X., Wang S., Zhu M., Carver B.F., Yan L. TaMFT-A1 Is Associated with Seed Germination Sensitive to Temperature in Winter Wheat // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8. – № 9. – P. e73330.
12. Poland J.A., Brown P.J., Sorrells M.E., Jannink J. – L. Development of High-Density Genetic Maps for Barley and Wheat Using a Novel Two-Enzyme Genotyping-by-Sequencing Approach // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – № 2. – P. e32253.

13. Ramirez-Gonzalez R.H., Uauy C., Caccamo M. PolyMarker: A fast polyploid primer design pipeline: Fig. 1 // *Bioinformatics*. – 2015. – Vol. 31. – № 12. – Pp. 2038–2039.
14. Rasheed A., Wen W., Gao F., Zhai S., Jin H., Liu J., Guo Q., Zhang Y., Dreisigacker S., Xia X. & He Z. Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2016. – Vol. 129. – № 10. – Pp. 1843–1860.
15. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi // *Plant Molecular Biology Manual*. – Dordrecht: Springer Netherlands, 1994. – Pp. 183–190.
16. Shavrukov Y. Comparison of SNP and CAPS markers application in genetic research in wheat and barley // *BMC Plant Biology*. – 2016. – Vol. 16. – № S1. – P. 11.
17. Tan C., Assanga S., Zhang G., Rudd J.C., Haley S.D., Xue Q., Ibrahim A., Bai G., Zhang X., Byrne P., Fuentealba M.P., Liu S.. Development and Validation of KASP Markers for Wheat Streak Mosaic Virus Resistance Gene Wsm2 // *Crop Science*. – 2017. – Vol. 57. – № 1. – Pp. 340–349.
18. Tariq H. A novel and high throughput wheat (*Triticum aestivum* L.) genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR assay for genes underpinning major economic attributes // *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. – 2021. – Vol. 58. – № 06. – Pp. 1799–1807.
19. Terracciano I., Maccaferri M., Bassi F., Mantovani P., Sanguineti M.C., Salvi S., Šimková H., Doležel J., Massi A., Ammar K., Kolmer J. & Tuberosa R. Development of COS-SNP and HRM markers for high-throughput and reliable haplotype-based detection of Lr14a in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2013. – Vol. 126. – № 4. – Pp. 1077–1101.
20. Walkowiak S., Gao L., Monat C. et al. Multiple wheat genomes reveal global variation in modern breeding // *Nature*. – 2020. – Vol. 588. – № 7837. – Pp. 277–283.
21. Wei B., Jing R., Wang C., Chen J., Mao X., Chang X. & Jia J. Dreb1 genes in wheat (*Triticum aestivum* L.): development of functional markers and gene mapping based on SNPs // *Molecular Breeding*. – 2009. – Vol. 23. – № 1. – Pp. 13–22.
22. Winfield M.O., Allen A.M., Burr ridge A.J. et al. High-density SNP genotyping array for hexaploid wheat and its secondary and tertiary gene pool // *Plant Biotechnology Journal*. – 2016. – Vol. 14. – № 5. – Pp. 1195–1206.
23. Yang Y., Zhao X.L., Xia L.Q., Chen X.M., Xia X.C., Yu Z., Z.H. He & Röder M. Development and validation of a Viviparous-1 STS marker for pre-harvest sprouting tolerance in Chinese wheats // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2007. – Vol. 115. – № 7. – Pp. 971–980.

COMPETITIVE ALLELE SPECIFIC PCR (KASP): FEATURES, THE INTERPRETATION OF THE RESULTS

E.A. NIKITINA¹, A.V. ARKHIPOV¹, YA.V. MIN'KOVA¹,
A.S. YANOVSKIY², V.A. KOROBKOVA¹, M.A. SAMARINA^{1,3},
A.G. CHERNOOK¹, P.YU. KRUPIN¹, G.I. KARLOV¹, M.G. DIVASHUK^{1,3}

(¹ All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology,

² National Center of Grain Named after P.P. Lukyanenko,

³ Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy)

The use of competitive allele-specific PCR is becoming a popular method for mass crop genotyping. The development of markers for SNPs in polyploid organisms requires additional validation and testing when developing primers for further use. In this work, we propose an algorithm for testing and interpreting the performance of KASP markers on wheat using existing common wheat genomic assemblies. Using the described algorithm, six KASP-markers on VIVIPAROUS-1,

MOTHER OF FT AND TFL1, TGW6-A1, PSY-A1, Dreb-B1 and leaf rust resistance locus Lr14a were analyzed. The most promising KASP markers by bioinformatic analysis and PCR were the markers for VIVIPAROUS-1, MOTHER OF FT AND TFL1 genes.

Key words: KASP, durum wheat, common wheat, sequence alignment, competitive allele-specific PCR, molecular marker.

References

1. Ayalew H., Tsang P.W., Chu C., Wang J., Liu S., Chen C., Ma X.F. Comparison of TaqMan, KASP and rhAmp SNP genotyping platforms in hexaploid wheat. PLOS ONE. 2019; 14 (5): e0217222.
2. Brinton J., Ramirez-Gonzalez R.H., Simmonds J., Wingen L., Orford S., S. Griffiths, 10 Wheat Genome Project, Haberer G., Spannagl M., Walkowiak S., Pozniak C., Uauy C. A haplotype-led approach to increase the precision of wheat breeding. Communications Biology. 2020; 3 (1): 712.
3. Darrier B., Colas I., Rimbert H., Choulet F., Bazile J., Sortais A., Jenczewski E., Sourdille P. Location and Identification on Chromosome 3B of Bread Wheat of Genes Affecting Chiasma Number. Plants. 2022; 11 (17): 2281.
4. Duan X., Yu H., W. Sun Ma J., Zhao Y., Yang R., Ning T., Li Q., Liu Q., Guo T., Yan M., Tian J., Chen J. A major and stable QTL controlling wheat thousand grain weight: identification, characterization, and CAPS marker development. Molecular Breeding. 2020; 40 (7): 68.
5. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Selected indicators in Russian Federation, 2020. [Electronic source]. URL: <https://www.fao.org/faostat/en/#country/185>
6. Hanig M., Gao F., Liu J., Wen W., Zhang Y., A Rasheed., Xia X., He Z., Cao S. TaTGW6-A1, an ortholog of rice TGW6, is associated with grain weight and yield in bread wheat. Molecular Breeding. 2016; 36 (1): 1.
7. He X.Y., He Z.H., Zhang L.P., Sun D.J., Morris C.F., Fuerst E.P., Xia X.C. Allelic variation of polyphenol oxidase (PPO) genes located on chromosomes 2A and 2D and development of functional markers for the PPO genes in common wheat. Theoretical and Applied Genetics. 2007; 115 (1): 47–58.
8. He. X.Y., Zhang Y.L., He Z.H., Wu Y.P., Xiao Y.G., Ma C.X., Xia X.C. Characterization of phytoene synthase 1 gene (Psy1) located on common wheat chromosome 7A and development of a functional marker. Theoretical and Applied Genetics. 2008; 116 (2): 213–221.
9. Kaur B., Mavi G.S., Gill M.S., Saini D.K. Utilization of KASP technology for wheat improvement. Cereal Research Communications. 2020; 48 (4): 409–421.
10. Kumar S., Kumar M., Mir R.R., Kumar R. Advances in Molecular Markers and Their Use in Genetic Improvement of Wheat. Physiological, Molecular, and Genetic Perspectives of Wheat Improvement. Cham: Springer International Publishing, 2021: 139–174.
11. Lei L., Zhu X., Wang S., Zhu M., Carver B.F., Yan L. TaMFT-A1 Is Associated with Seed Germination Sensitive to Temperature in Winter Wheat. PLoS ONE. 2013; 8 (9): e73330.
12. Poland J.A., Brown P.J., Sorrells M.E., Jannink J. – L. Development of High-Density Genetic Maps for Barley and Wheat Using a Novel Two-Enzyme Genotyping-by-Sequencing Approach. PLoS ONE. 2012; 7 (2): e32253
13. Ramirez-Gonzalez R.H., Uauy C., Caccamo M. PolyMarker: A fast polyploid primer design pipeline: Fig. 1. Bioinformatics. 2015; 31 (12): 2038–2039.
14. Rasheed A., Wen W., Gao F., Zhai S., Jin H., Liu J., Guo Q., Zhang Y., Dreisigacker S., Xia X., He Z. Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat. Theoretical and Applied Genetics. 2016; 129 (10): 1843–1860.

15. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. Plant Molecular Biology Manual. Dordrecht: Springer Netherlands, 1994: 183–190.
16. Shavrukov Y. Comparison of SNP and CAPS markers application in genetic research in wheat and barley. BMC Plant Biology. 2016; 16 (S1): 11.
17. Tan C., Assanga S., Zhang G., Rudd J.C., Haley S.D., Xue Q., Ibrahim A., Bai G., Zhang X., Byrne P., Fuentealba M.P., Liu S. Development and Validation of KASP Markers for Wheat Streak Mosaic Virus Resistance Gene Wsm2. Crop Science. 2017; 57 (1): 340–349.
18. Tariq H. A novel and high throughput wheat (*Triticum aestivum* L.) genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR assay for genes underpinning major economic attributes. Pakistan Journal of Agricultural Sciences. 2021; 58 (06): 1799–1807.
19. Terracciano I., Maccaferri M., Bassi F., Mantovani P., Sanguineti M.C., Salvi S., Šimková H., Doležel J., Massi A., Ammar K., Kolmer J., Tuberosa R. Development of COS-SNP and HRM markers for high-throughput and reliable haplotype-based detection of Lr14a in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). Theoretical and Applied Genetics. 2013; 126 (4): 1077–1101.
20. Walkowiak S., Gao L., Monat C. et al. Multiple wheat genomes reveal global variation in modern breeding. Nature. 2020; 588 (7837): 277–283.
21. Wei B., Jing R., Wang C., Chen J., Mao X., Chang X., Jia J. Dreb1 genes in wheat (*Triticum aestivum* L.): development of functional markers and gene mapping based on SNPs. Molecular Breeding. 2009; 23 (1): 13–22.
22. Winfield M.O., Allen A.M., Burr ridge A.J. et al. High-density SNP genotyping array for hexaploid wheat and its secondary and tertiary gene pool. Plant Biotechnology Journal. 2016; 14 (5): 1195–1206.
23. Yang Y., Zhao X.L., Xia L.Q., Chen X.M., Xia X.C., Yu Z., He Z.H., Röder M. Development and validation of a Viviparous-1 STS marker for pre-harvest sprouting tolerance in Chinese wheats. Theoretical and Applied Genetics. 2007; 115 (7): 971–980.

Никитина Екатерина Александровна, младший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; e-mail: shhket@gmail.com

Архипов Андрей Владимирович, младший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; email: batler51@yandex.ru

Минькова Яна Вадимовна, младший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; e-mail: fleurs@mail.ru

Яновский Алексей Сергеевич, канд. с.-х. наук, в.н.с., Отдел селекции и семеноводства пшеницы и тритикале, Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко; 350012, Российская Федерация, г. Краснодар, Центральная усадьба КНИИСХ; e-mail: yanovskij81@list.ru

Коробкова Варвара Александровна, младший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; e-mail: bowlingistka@gmail.com

Самарина Мария Алексеевна, младший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; e-mail: Samarina.homa@yandex.ru

Черноок Анастасия Геннадьевна, младший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; e-mail: irbis-sibri@yandex.ru

Крупин Павел Юрьевич, канд. биол. наук, в.н.с., Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; e-mail: pavelkroupin1985@gmail.com

Карлов Геннадий Ильич, д-р биол. наук, академик РАН, директор ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; e-mail: karlov@iab.ac.ru

Дивашук Михаил Георгиевич, канд. биол. наук, в.н.с., Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; e-mail: divashuk@gmail.com

Ekaterina A. Nikitina, Junior Research Associate, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (42 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; E-mail: shhket@gmail.com)

Andrey V. Arkhipov, Junior Research Associate, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (42 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; E-mail: batler51@yandex.ru)

Yana V. Min'kova, Junior Research Associate, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (42 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; E-mail: fleurs@mail.ru)

Aleksey S. Yanovskiy, PhD (Ag), Senior Research Associate, National Center of Grain Named after P.P. Lukyanenko (Krasnodar, Tsentral'naya usad'ba KNIISKH, Krasnodar, 350012, Russian Federation; E-mail: yanovskij81@list.ru)

Varvara A. Korobkova, Junior Research Associate, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (42 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; E-mail: bowlingistka@gmail.com)

Mariya A. Samarina, Junior Research Associate, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (42 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; E-mail: Samarina.homa@yandex.ru)

Anastasiya G. Chernook, Junior Research Associate, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (42 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; E-mail: irbis-sibri@yandex.ru)

Pavel Yu. Krupin, PhD (Bio), Senior Research Associate, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (42 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; E-mail: pavelkroupin1985@gmail.com)

Gennadiy I. Karlov, DSc (Bio), RAS Academician (Full Member), Director of All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (42 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; E-mail: karlov@iab.ac.ru)

Mikhail G. Divashuk, PhD (Bio), Senior Research Associate, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (42 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; E-mail: divashuk@gmail.com)