

Российская академия сельскохозяйственных наук

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ОВОЩЕВОДСТВА

АГРОФИРМА «ПОИСК»

ОВОЩЕВОДСТВО БУДУЩЕГО: НОВЫЕ ЗНАНИЯ И ИДЕИ

Материалы Международной научно-практической
конференции молодых учёных,
посвящённой 125-летию со дня рождения Н.И. Вавилова

*Под редакцией академика Российской академии
сельскохозяйственных наук, доктора сельскохозяйственных наук,
профессора, лауреата Государственной премии в области науки и
техники 2003 г. С.С. Литвинова*

Москва 2012

УДК 635.1/8
ISBN 978-5-902946-19-9

Овощеводство будущего: новые знания и идеи. Материалы Международной научно-практической конференции молодых учёных «Овощеводство будущего: новые знания и идеи», посвящённой 125-летию со дня рождения Н.И. Вавилова. / ГНУ Всероссийский НИИ овощеводства Российской академии сельскохозяйственных наук. – М., 2012. – 378 с.

Издание включает материалы докладов и стендовых сообщений участников конференции молодых учёных о перспективах и результатах исследований по широкому кругу вопросов, связанных с решением проблем селекции, семеноводства, биотехнологии, технологии возделывания, земледелия и агрохимии в овощеводстве.

Сборник предназначен для учёных, специалистов-овощеводов, преподавателей и студентов ВУЗов.

Редактор: Р.А. Мещерякова, кандидат с/х наук
Набор: М.Н. Постоева, кандидат с/х наук
А.М. Меньших, кандидат с/х наук
Верстка: А.М. Меньших

© Россельхозакадемия, 2012
© ГНУ ВНИИ овощеводства Российской академии
сельскохозяйственных наук, 2012
© Агрофирма «Поиск», 2012

Проведение молекулярно-генетического анализа растений рода *trigonella* с использованием *rapd*- и *issr*-маркеров

Е.Д. Агабалаева, Е.В. Спиридович

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»

И.Я. Нам

ГОУ ВПО «Брянский государственный университет им. акад. И.Г. Петровского»

Одним из перспективных и малоизученных родов семейства Fabaceae является род *Trigonella* (пажитник греческий, голубой, пряморогий). Проростки пажитника греческого (*Trigonella foenum graecum* L.) широко используют для употребления в пищу во многих странах Европы. Благодаря широкому спектру биологически активных соединений, таких как флавоноиды, каротиноиды, витамины, масло, стероидные сапонины обладает противодиабетическим, антисклеротическим, гастропротекторным, антиоксидантным, антибактериальным действием [1]. Общеизвестно, что листья пажитника голубого (*T. caerulea*) используют при производстве зеленого сыра, а также имеются данные о его лекарственных свойствах при приеме как отхаркивающее и противовоспалительное средство [2]. Листья и семена пажитника греческого и верхняя часть пажитника голубого (листья с цветками) используются в составе овощных заправок, в пряных смесях («Хмели Сунели», «Уцхо Сунели», «Карри»), при изготовлении аджики и для добавления в хлебобулочные изделия. Пажитник пряморогий (*T. polycerata*) малоизучен, поэтому представляет научный.

Сегодня бесспорно актуальным является использования ДНК-технологий для целей дифференциации генетического материала. Особый интерес в этом отношении представляют ДНК маркеры, которые представлены многолокусными образцами-пробами (фингерпринтами). Именно они успешно используются для целей идентификации как индивидуумов, так и популяций [3].

На сегодняшний день в литературе существует незначительное количество данных по применению метода RAPD- и ISSR-маркирования с целью выявления степени родства между отдельными видами и сортами рода *Trigonella*. Поэтому, несомненно, проведение молекулярно-генетического анализа видов рода *Trigonella* является актуальным.

Целью данной работы было оптимизация методик выделения тотальной ДНК из листьев, подбор оптимальных условий для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и проведение молекулярно-

генетического анализа представителей рода *Trigonella* (пажитник греческий, голубой и пряморогий) с использованием RAPD- и ISSR-маркеров для их дальнейшей паспортизации.

Объектом исследования были сорта пажитника греческого различного географического происхождения Ovary Gold, Ovary 4 (Венгерская Республика), Chidoncha, Blidet, Obanos (Испания), Ghahkamon (Ливия), 19X, H-26, D19 (Сирия), Gers (Франция), Metha (Индия) и линия PSZ.G.SZ (Венгерская Республика), а также пажитник голубой и пажитник пряморогий.

В ходе проделанной работы была оптимизирована методика выделения тотальной ДНК из листового материала пажитника греческого, голубого и пряморогого. Выделение ДНК проводилось СТАВ-методом [4] с небольшими модификациями применительно к объекту исследования. ДНК изолировали из 100 мг листьев, дополнительно проводили очистку препаратов РНК-азой (10 мг/мл экстракта ДНК). Удаление белков осуществляли путем их двухкратной денатурации с помощью хлороформ-изоамиловой смеси (соотношение 24:1). Препарат ДНК растворяли в деионизованной воде.

Полученные препараты ДНК имели соотношение экстинций 260 нм/280 нм в среднем 1,76, что позволило судить о их хорошей очистке. Кроме того проводили дополнительное измерение препаратов при длине волн 320 нм. Значения D₃₂₀ стремились к нулю и колебались от 0,00062 до 0,0093. Для проведения ПЦР ДНК разбавляли до конечной концентрации 20 нг/мкл.

На следующем этапе была проведена работа по оптимизации методик проведения RAPD- и ISSR-анализа, а также подбор ДНК-праймеров. Всего было проанализировано 14 RAPD- и 12 ISSR-праймеров, из них были отобраны по 2 праймера каждого вида, которые давали наибольшее количество полиморфных фрагментов. Температура плавления ДНК-праймеров рассчитывали, используя программу OligoCalc.

В таблице приведен список праймеров, использованных для генотипирования коллекции рода *Trigonella*.

Произвольные и микросателлитные праймеры, использованные для генотипирования коллекции рода *Trigonella*

№	Праймер	Последовательность, 5'-3'	Tm	%GC content
1	OPJ-07	5'-CCTCTCGACA-3'	32	60
2	OPN-09	5'-TGCCGGCTTG-3'	34	70
7	UBC 807	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT-3'	50	47
8	UBC 840	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAYT-3'	51-54	44-50

Были установлены оптимальные условия для проведения полимиеразной цепной реакции (ПЦР). Так, RAPD-ПЦР проводили в 25 мкл смеси, содержащей 2,5 мкл 10×SE-буфера AS («СибЭнзим», Россия), содержащего MgCl₂, 2,0 мкл 0,2мМ каждого dNTP («СибЭнзим», Россия), 20

пикоМ праймера (производитель «Синтол», Россия), 1 ед. PrimeTaq ДНК-полимеразы E332 («СибЭнзим», Россия) и 20 нг ДНК-матрицы. Реакцию проводили в четырехканальном амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Устанавливали следующий режим, где T_a — температура отжига, при которой праймер комплиментарно связывается с ДНК-матрицей:

96°C	—	5 минут	}	начальная денатурация
T_a	—	30 секунд		
72°C	—	2 минуты		
96°C	—	30 секунд	}	45 циклов
T_a	—	30 секунд		
72°C	—	2 минуты		
96°C	—	30 секунд	}	финальная элонгация
T_a	—	30 секунд		
72°C	—	10 минут		
4°C	—	хранение		

T_a обычно совпадает с температурой плавления (T_m) праймера, которая в свою очередь зависит от его нуклеотидного состава.

ISSR амплификацию выполняли в 25 мкл смеси, содержащей 2,5 мкл 10× PCR-буфера (ОДО «Праймтех», Беларусь), 2,5 мкл 10× смеси dNTP (ОДО «Праймтех», Беларусь), 30 пикоМ праймера (ОДО «Праймтех», Беларусь), 0,5 ед. PrimeTaq ДНК-полимеразы (ОДО «Праймтех», Беларусь) и 20 нг ДНК-матрицы. Реакцию проводят в термоциклире Mastercycle Personal (Eppendorf).

Для проведения реакции устанавливали следующий режим:

96°C	—	5 минут	}	начальная денатурация
T_a	—	30 секунд		
72°C	—	2 минуты		
96°C	—	30 секунд	}	30 циклов
T_a	—	30 секунд		
72°C	—	2 минуты		
96°C	—	30 секунд	}	финальная элонгация
T_a	—	30 секунд		
72°C	—	10 минут		
4°C	—	хранение		

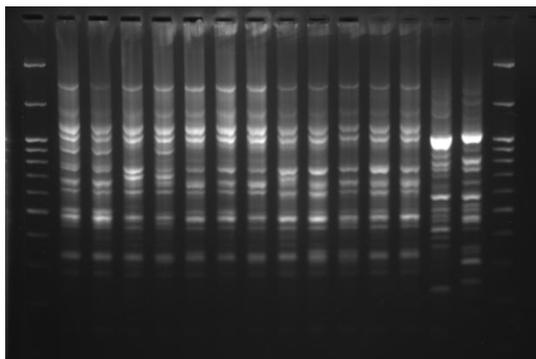
Продукты RAPD-ПЦР разделяли электрофорезом в 2% агарозном геле. Для электрофореза использовали буфер, содержащий трис-борат в концентрации 50 мМ и имеющий pH 7,5-7,8 в присутствии бромистого этидия и визуализировали с использованием системы GelDocXR («BioRad», США) и программы для обработки электрофореграмм Quantity One.

Электрофоретическое разделение и визуализацию ISSR амплификата проводят с использованием прибора Bioanalyzer 2100 (Agilent), который позволяет проводить разделение ПЦР-ампиконов с высоким разрешением и высокой точностью определения размера фрагмента. Кроме того, методическая простота выполнения и автоматизированная процедура

выполнения исследования заметно сокращают затрачиваемое время, а также повышают точность и надежность получаемых данных.

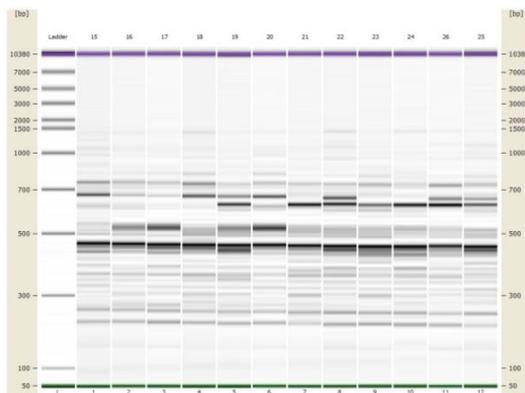
На основании полученных данных RAPD- и ISSR-ПЦР геномной ДНК из листьев пажитника греческого, голубого и пряморогого с использованием произвольных праймеров OPN-09, OPJ-07 и ISSR-праймеров UBC-807, UBC-840 и построенных дендрограмм (UPGMA) можно заключить, что виды и сорта различаются между собой. Представляется возможным в дальнейшем увеличение количества RAPD- и ISSR-праймеров для уточнения полученных UPGMA карт изученных видов и сортов. На рисунке 1 и 2 представлены электрофореграммы представителей рода *Trigonella* с использованием RAPD- и ISSR-праймеров.

Было установлено, что наиболее близким в генетическом плане к пажитнику греческому оказался пажитник голубой. А при изучении внутрисортного полиморфизма пажитника греческого было выявлено, что все сорта разделились на 2 кластера, в один из которых вошли сорта Ovary Gold, Ovary 4. В целом, полученные данные могут стать ценной базой для проведения дальнейших исследований генетического материала и проведения успешной селекционной работы ценных сортов. Представляется возможным в дальнейшем увеличение количества RAPD- и ISSR-праймеров для уточнения полученных UPGMA карт изученных видов и сортов.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
 А Б В

Рис.1 Электрофореграмма видов пажитников, полученная при использовании RAPD-праймера OPN 09: 1,16 – маркеры размеров ДНК, А – пажитник греческий (2- Ovary 4; 3 - Ovary Gold; 4- PSZ.G.SZ; 5 – Metha; 6 – H-26; 7 - 19X; 8 – Chiadoncha; 9 – Obanos; 10 - D19; 11 – Ghahkamon; 12 – Blidet; 13 - Gers), Б – пажитник голубой, В – пажитник пряморогий



1 2 3 4 5 6 8 9 10 11 12 13
 А

Рис.2 Электрофореграмма пажитника греческого, полученная при использовании ISSR-праймера UBC 807: 1 – маркеры размеров ДНК, А – пажитник греческий (2- Ovary 4; 3 - Ovary Gold; 4- PSZ.G.SZ; 5 – Metha; 6 – H-26; 7 - 19X; 8 – Chiadoncha; 9 – Obanos; 10 - D19; 11 – Ghahkamon; 12 – Blidet; 13 - Gers)