

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР «БИОРЕСУРСЫ»
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
Отдел биохимии и биотехнологии растений

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ
АСПЕКТЫ БИОХИМИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ
РАСТЕНИЙ**

Сборник научных трудов
III Международной научной конференции
14–16 мая 2008 г., Минск

*К 50-летию Отдела биохимии
и биотехнологии растений*

Минск
«Издательский центр БГУ»
2008

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55
Т33

Научные рецензенты:

д-р биол. наук, проф., акад. НАН Беларуси *В. Н. Решетников*;
д-р биол. наук, проф. *В. М. Юрин*;
д-р биол. наук, проф. *В. Л. Калер*

Редакционная коллегия:

*В. Н. Решетников, О. П. Булко, И. И. Паромчик, Т. И. Фоменко,
Е. В. Спиридович, Т. В. Антипова*

Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений : сб. науч. тр. 3-й Междунар. науч. конф., 14–16 мая 2008 г., Минск : к 50-летию Отд. биохимии и биотехнологии растений / НАН Беларуси, Центр. ботан. сад [и др.] ; редкол. : В. Н. Решетников [и др.] . — Минск : Изд. центр БГУ, 2008. — 562 с.
ISBN 978-985-476-604-1.

В сборнике изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер и пластид высших растений, путей регулярного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгеноза. Представлены отдельные проблемы регуляции морфогенеза растительных клеток и микрклонального размножения некоторых культур, использования молекулярных маркеров в документировании ботанических коллекций. Рассмотрены биохимические основы практического использования растительных ресурсов.

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55

ISBN 978-985-476-604-1

© Центральный ботанический сад
НАН Беларуси, 2008

УДК: 634.739.3:577.2

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПРОИЗВОЛЬНО АМПЛИФИЦИРОВАННОЙ ПОЛИМОРФНОЙ ДНК ДЛЯ СОРТОВОЙ ПАСПОРТИЗАЦИИ (НА ПРИМЕРЕ КЛЮКВЫ КРУПНОПЛОДНОЙ)

¹Баранов О.Ю., ¹Каган Д.И., ²Гончарова Л.В., ²Спиридович Е.В.,
³Пантелеев С.В.

¹Институт леса НАН Беларуси, г. Гомель, 246001, ул. Пролетарская 71,
e-mail betula-belarus@mail.ru

²ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», г. Минск, 220012,
ул. Сурганова, 2

³ГГУ им. Ф.Скорины, г. Гомель, 246050, ул. Советская, 108

Проведена генетическая паспортизация восьми сортов клюквы крупноплодной из коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси с использованием метода произвольно амплифицированной полиморфной ДНК.

Произвольная амплификация является недетерминированным процессом, не требующим предварительного знания матричной последовательности и использующим единичные или множественные сайты в геноме [1]. Этот тип амплификации может использовать один или несколько произвольных праймеров или комбинацию произвольного и направленного праймеров к специфическим, но неизвестным сайтам в геноме, многие из которых являются полиморфными. К данному виду амплификации, наряду с нижеописанными методами, относится rPCR (Random Polymerase Chain Reaction – произвольная ПЦР). Этот метод позволяет конструировать библиотеки полных кДНК из очень малого количества РНК. В качестве праймера для синтеза кДНК используют универсальный праймер, содержащий на 3'-конце гексамер с произвольной последовательностью. RAPD анализ (Random Amplified Polymorphic DNA – произвольно амплифицированная полиморфная ДНК). Оригинальность RAPD-анализа заключается в двух особенностях: при амплификации ДНК применяется только один праймер. При подборе праймеров для RAPD-анализа достаточны следующие условия: олигонуклеотидная последовательность праймера должна содержать от 50 до 80% G+C оснований, а его длина должна быть около 10 оснований. RAPD-анализ характеризуется следующими свойствами: при использовании большинства типов праймеров RAPD-спектр представлен 5–12 ампликонами; RAPD-маркеры обладают доминантным характером проявления; RAPD чувствителен к изменениям ПЦР-условий, поэтому воспроизведение результатов может быть получено лишь при максимальной стандартизации условий. AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction – произвольно праймированная ПЦР). В данном типе

ПЦР используются праймеры, сходные по длине с таковыми в классической ПЦР (15-25 нуклеотидов). Особенностью этого метода является проведение отжига праймера в нескольких первых циклах при более низкой, чем оптимальная, температуре (так называемый “мягкий” отжиг), что повышает эффективность праймирования при дальнейших “жестких” циклах. DAF (DNA Amplification Fingerprinting – фингерпринтинг амплифицированной ДНК). При DAF используют праймеры длиной 5-8 нуклеотидов. Сложные информационно насыщенные профили ДНК получают в полиакриламидном геле и окрашивают серебром для обнаружения пикограммовых количеств ДНК. В результате DAF с октамерным праймером образуются фингерпринты в 3-10 раз более сложные, чем ДНК-профили, полученные при RAPD-анализе с декамерным праймером. Техника DAF использовалась для характеристики многих организмов – от бактерий до человека [2].

Целью данных исследований являлось проведение генетической паспортизации сортов клюквы крупноплодной из коллекции ЦБС на основании метода произвольно амплифицированной полиморфной ДНК. Работа выполнялась в рамках Программы реконструкции объектов Центрального ботанического сада НАН Беларуси.

Материал для анализа был представлен 8 сортами клюквы крупноплодной из коллекции ЦБС НАНБ (McFarlin, Franclin, Stevens, Ben Leer, Early Black, Bergmark, Cheelcocks, Beckwith). Для получения препаратов суммарной ДНК были использованы ткани листьев. ДНК выделялась СТАВ-методом, описанным в работе [1]. В ходе данного исследования были использованы следующие праймеры (в скобках приведены температуры отжига): Oligo 1 – CGTCTGCCCG (43,0), Oligo 3 – TCCATGCCGT (37,5), Oligo 4 – САААСGGСАС (33,5), Oligo 5 – GATCTCAGCG (25,7), Oligo 6 – САСGGСGAGT (37,3), Oligo 8 – CGCCCCCATT (44,9), Oligo 9 – AGGCCGCTTA (36,0), Oligo 10 – TGTCAGCGGT (32,3), Oligo 11 – TCCCGAACCG (42,0), Oligo 12 – САСААСGGGT (31,5), Oligo 16 – GCCCCTCGTC (39,3), Oligo 18 – СААТСGCCGT (37,8), Oligo 26 – GGTGCGGGAA (42,9), Oligo 27 – GTTTCGCTCC (31,7), Oligo 29 – ААGAGCCCGT (35,1), Oligo 30 – ААСGСGСAАС (39,4), Oligo 32 – ССGСAGCCAA (45,2), Oligo 83 – GAAATATGCC (31,9), Oligo 85 – АТСGGTCGGTA (36,9), Oligo 91 – ССGААСGGGT (41,4), Oligo 92 – ТСАССGААСG (34,5), Oligo 93 – GССAАТССТG (32,4), Oligo 94 – GGACGGGTGC (41,5), Oligo 95 – GGACCACCAT (28,6), Oligo 96 – ССАСGАСGАТ (32,4), Oligo 98 – GGGTAACGCC (36,7), Oligo 104 – GTCAATCCGAT (30,5). Ампликоны анализировались в 12,5% нативном гомогенном полиакриламидном геле и окрашивались серебром [3]. Фотодокументирование продуктов электрофо-реза достигалось за счет видеосканирования в видимом свете системой Image Master (Amersham Pharmacia Biotech).

Математическая обработка полученных данных производилась с помощью программного обеспечения PopGene32.

В результате проведенного анализа образцов клюквы крупноплодной, на основании использования 27 произвольных десятинуклеотидных праймеров, было выявлено 118 различных ампликонов, 46 из которых оказались полиморфными. На основании анализа RAPD-маркеров были составлены многолокусные генетические паспорта на каждый изученный сорт. Анализ генетических паспортов позволил провести сравнение сортов между собой. Для оценки уровня генетического сходства/различия были рассчитаны коэффициенты генетической дистанции Неи [4], приведенные в таблице. Как видно из полученных данных сорта McFarlin и Stevens характеризуются значением D_N равным 0. Это указывает на идентичность генотипов данных образцов. Учитывая большое количество исследованных полиморфных локусов (46), можно сделать вывод, что на самом деле представленные образцы под названиями McFarlin и Stevens являются одним и тем же сортом (вероятность ошибочного выявления сходных генотипов в данном случае составляет менее, чем 1×10^{-10}). Поэтому в дальнейшем при обсуждении полученных данных для этих двух сортов клюквы крупноплодной мы принимаем условное название через знак равенства: McFarlin=Stevens. На основании коэффициентов генетической дистанции Неи, используя невзвешенный парно-групповой метод кластерного анализа (UPGMA) [5], построена дендрограмма, представленная на рисунке и иллюстрирующая степень генетической дифференциации среди изученных сортов клюквы крупноплодной.

Таблица

Коэффициенты генетического сходства и генетической дистанции Неи изученных сортов клюквы крупноплодной: 1 – McFarlin, 2 – Franclin, 3 – Stevens, 4 – Ben Leer, 6 – Early Black, 7 – Bergmark, 8 – Cheelcocks, 9 – Beckwith

№ образца	1	2	3	4	6	7	8	9
1	****	0.813	1.000	0.813	0.737	0.771	0.762	0.796
2	0.206	****	0.813	0.779	0.788	0.889	0.847	0.881
3	0.000	0.206	****	0.813	0.737	0.771	0.762	0.796
4	0.206	0.248	0.206	****	0.805	0.771	0.847	0.796
6	0.304	0.238	0.304	0.216	****	0.813	0.855	0.805
7	0.259	0.116	0.259	0.259	0.206	****	0.872	0.957
8	0.270	0.165	0.270	0.165	0.155	0.136	****	0.881
9	0.227	0.126	0.227	0.227	0.216	0.043	0.126	****

Примечание:

коэффициенты генетического сходства расположены над диагональю;

коэффициенты генетической дистанции расположены под диагональю.

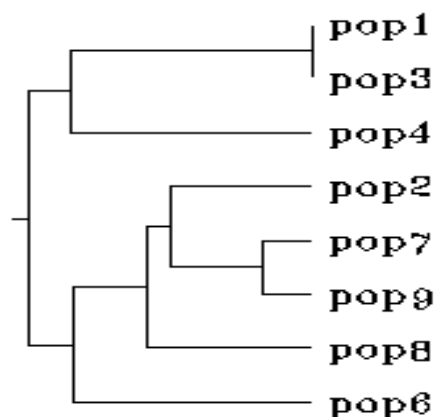


Рис. Дендрограмма, иллюстрирующая степень генетической дифференциации среди изученных сортов клюквы крупноплодной:

1 – McFarlin=Stevens, 2 – Franclin, 3 – McFarlin=Stevens, 4 – Ben Leer, 6 – Early Black, 7 – Bergmark, 8 – Cheelcocks, 9 – Beckwith.

Как видно из дендрограммы, коллекция сортов разделилась на два кластера, объединяющих наиболее сходные по генотипу образцы: в одном кластере – сорта McFarlin=Stevens, Ben Leer, в другом кластере – сорта Franclin, Early Black, Bergmark, Cheelcocks, Beckwith.

Таким образом, в ходе работы была проведена генетическая паспортизация восьми сортов клюквы крупноплодной из коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Полученные результаты продемонстрировали высокую степень разрешения примененного набора праймеров (1×10^{-10}) для диагностики сортового материала. В результате, с одной стороны, использование метода произвольно амплифицированной полиморфной ДНК и анализ полученных данных позволили выявить достоверное генетическое разнообразие среди изученных сортов (McFarlin, Stevens, Franclin, Ben Leer, Early Black, Bergmark, Cheelcocks, Beckwith), а с другой стороны, показали полную идентичность генотипов двух исследованных образцов (McFarlin и Stevens).

Литература

1. Падутов, В.Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев. – Мн.: Юнипол, 2007. – 176 с.
2. Ford-Lloyd, V. Measuring genetic variation using molecular markers / V. Ford-Lloyd, K. Painting. – Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. – 72 p.
3. Westermeier, R. Electrophoresis in practice (Third Edition) / R. Westermeier. – WILEY-VCH Verlag: Weinheim, 2001. – 349 p.
4. Yu, K. Rapid estimation of genetic relatedness among heterogenous populations of alfaalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples / K. Yu, K.P. Pauls // Theor. Appl. Genet. – 1993. – Vol. 86. – P. 788–794.
5. Дюран, Б. Кластерный анализ / Б. Дюран, П. Оделл. – М.: Статистика, 1997. – 126 с.

Summary

Genetic certification of eight varieties of large cranberry from collection Central Botanical Gardens of NAS of Belarus with use of a Random Amplified Polymorphic DNA method is carried out.