

УДК 582:581(082)
ББК 28.59я43
И73

Редакционная коллегия:

д.б.н., чл.-корр. НАН Беларуси *В. В. Титок* (ответственный редактор),
к.б.н. *П. Н. Белый*; к.б.н. *И. М. Гаранович*; д.б.н. *Н. В. Гетко*;
к.б.н. *Л. А. Головченко*; *С. М. Кузьменкова*; д.б.н. *Е. Н. Кутас*;
к.б.н. *Н. М. Лунина*; к.б.н. *О. В. Чижик*; к.б.н. *А. П. Яковлев*

Рецензенты:

доктор биологических наук, Ботанический институт
имени В. Л. Комарова Российской академии наук *К. Г. Ткаченко*;
кандидат биологических наук, Институт экспериментальной
ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси
А. В. Пугачевский

**Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия
И73 флоры** : материалы международной научной конференции, посвященной 90-летию
Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси (Минск,
28 июня – 1 июля 2022 г.). В 2 ч. Ч. 2 / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. редкол.: В.В. Титок
[и др.] – Минск : Белтаможсервис, 2022. – 420 с.

ISBN 978-985-7004-75-1

В сборнике представлены материалы международной научной конференции, посвященной 90-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. Часть 2: секция 3 «Биотехнологические и молекулярно-генетические аспекты изучения и использования биоразнообразия растений», секция 4 «Решение вопросов защиты растений в ботанических садах», секция 5 «Научное, прикладное и просветительское значение ботанических коллекций» и секция 6 «Современные направления ландшафтного дизайна и зеленого строительства».

УДК 582:581(082)
ББК 28.59я43

ISBN 978-985-7004-75-1 (ч. 2)
ISBN 978-985-7004-72-0

© ГНУ «Центральный ботанический сад
Национальной академии наук Беларуси», 2022
© Оформление. РУП «Белтаможсервис», 2022

ВАЖНЫЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ ДНК КОЛЛЕКЦИИ И ПАСПОРТИЗАЦИЯ НОВЫХ ФОРМ МНОГОЛЕТНИХ ЗЛАКОВЫХ ТРАВ

Кондрацкая И. П.¹, Юхимук А. В.¹, Чижик О. В.¹, Столепченко В. А.², Решетников В. Н.¹

¹Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси

Беларусь, 220012, Минск, ул. Сурганова, 2в,

ikondratskaya@mail.ru

²РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по земледелию»

Беларусь, 222160, Жодино, ул. Тимирязева, 1,

vstolepchenko@mail.ru

Резюме. Современные методы селекции и создание генетической коллекции растений является надежной основой развития растениеводства, продовольственной и биологической безопасности страны. Создана ДНК коллекция и представлена система регистрации генотипов гибридных форм и сортов многолетних злаковых трав в виде молекулярно-генетических паспортов, которые отражает состав аллелей в локусах, ассоциированных с кодирующими областями ДНК.

IMPORTANT ASPECTS OF DNA COLLECTION CREATING AND CERTIFICATION OF NEW FORMS OF PERENNIAL GRASSES

Kondratskay I. P., Yukhimuk A. N., Chizhik O. V., Stolepchenko V. A., Reshetnikov V. N.

Summary. Modern methods of breeding and creating a genetic collection of plants are a reliable source for the development of crop production, food and biological security of the country. A DNA collection of hybrid forms and varieties of perennial grass crops has been created. The system for genotype's registration – molecular genetic passports – has been elaborated.

Научные и практические разработки в области генетики и селекции приводят к сокращению сроков создания гибридов и сортов, поэтому сегодня происходит значительное увеличение, как скорости создания новых сортов, так и их количества. Вместе с этим для современной селекции характерна тенденция к уменьшению генетических дистанций между вновь созданными сортами. Это происходит из-за того, что при создании этих сортов часто в скрещивание вовлекаются одни и те же генотипы, обладающие хозяйственно-ценными свойствами. Такое сокращение генетического разнообразия сортов приводит к необходимости идентификации большого количества сортов близкородственного происхождения [1]. На сегодняшний день такую оценку можно проводить с использованием ДНК-маркерных систем.

Исследования на уровне ДНК, а именно: решение проблемы экстракции чистой недеградированной ДНК из растительных объектов является определяющим первым этапом молекулярно-генетических исследований. Различные виды растений, растения и органы на различных стадиях развития, даже различные органы одного вида на одной стадии развития растения содержат различные количества и классы вторичных метаболитов и запасных веществ [2]. Компонентный состав оказывает значимое влияние на качество и количество экстрагируемой ДНК. Для изолирования ДНК лучше использовать молодые органы растений и листья, поскольку они содержат меньшие количества запасных веществ и вторичных метаболитов. Однако, молодые листья и органы растения не всегда доступны, и приходится модифицировать методы для получения удовлетворительных результатов из взрослых органов растений, гербарного материала и др. Для выделения ДНК можно использовать семена, как сухие, так и пророщенные, в ряде исследований используется листовая ткань лиофильно высушенная или фиксируемая в силикагеле.

Для проведения ДНК-маркирования и создания ДНК коллекции многолетних злаковых трав нами проведена исследовательская работа по оптимизации метода выделения ДНК, обеспечивающий высокий выход качественных препаратов ДНК. Процедура выделения ДНК обусловлена специфическими особенностями злаковых трав, которые отличаются высоким содержанием

белка и высокой концентрацией полисахаридов в листьях. Особое внимание было уделено отбору и подготовке растительного материала. Для выделения ДНК мы использовали: 1) высушенные семена; 2) набухшие семена в течение 12 часов; 3) свежий листовый материал; 4) листовую ткань зафиксированную при -20°C и -80°C ; 5) листовой ткани высушенную от 37°C до 42°C ; 6) высушенную растительную ткань с помощью силикагеля до полного обезвоживания.

В ходе проведения оптимизации процесса выделения высококачественной ДНК нами выбран модифицированный СТАВ-метод из обезвоженной силикагелем листовой ткани злаковых трав. Качественными считались препараты с концентрацией ДНК не менее 50 нг/мкл и соотношениями $A_{260}/A_{280} \geq 1,7$ и $A_{260}/A_{230} \geq 1,5$.

Данные о качестве препаратов тотальной ДНК представлены в таблице для представителей рода *Lolium* L. и их гибридных форм.

Таблица 1. Качественные и количественные параметры препаратов тотальной ДНК

№	Наименование	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	с (DNA), нг/мкл
1	<i>Lolium perenne</i> L. cv. Гусяр	1,8	2,1	602
2	<i>Lolium multiflorum</i> Lam. cv. Матадор	1,8	2,1	906
3	<i>Lolium perenne</i> × <i>multiflorum</i> 22-7	1,8	2,1	931
4	<i>Lolium perenne</i> × <i>multiflorum</i> 22-7-21	1,8	2,1	700
5	<i>Lolium perenne</i> × <i>multiflorum</i> 22-7-23	1,9	2,3	817

Полученные препараты ДНК гибридных форм и сортов многолетних злаковых трав включены в ДНК-коллекцию многолетних злаковых трав и помещены на гарантированное долговременное хранение при температуре -80°C в ДНК-БАНК отдела биохимии и биотехнологии растений ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси».

Таблица 2. Паспорт базовой коллекции ДНК на примере представителей рода *Lolium* L. и гибридных форм. Куратор коллекции научный сотрудник Юхимук А. В.

№	Наименование	Источник ДНК	Метод выделения	Качественные показатели (A_{260}/A_{280})/(A_{260}/A_{230})	Концентрация	Объем
1	<i>Lolium perenne</i> L. cv. Гусяр	листовая ткань	Demster, 1999	1,8/2,1	602	>100
2	<i>Lolium multiflorum</i> Lam. cv. Матадор	листовая ткань	Demster, 1999	1,8/2,1	906	>100
3	<i>Lolium perenne</i> × <i>multiflorum</i> Выбор 22-7	листовая ткань	Demster, 1999	1,8/2,1	931	>100
4	<i>Lolium perenne</i> × <i>multiflorum</i> 22-7-211	листовая ткань	Demster, 1999	1,8/2,1	700	>100
5	<i>Lolium perenne</i> × <i>multiflorum</i> 22-7-25	листовая ткань	Demster, 1999	1,9/2,3	817	>100
					ng/ μL	μL

Dempster E.L., Pryor K. V., Francis D., Young J. E., Rogers H. J. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses // Biotechniques. – 1999. – V. 27(1). – P: 66–68.

В настоящее время в Отделе биохимии и биотехнологии растений ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» сформирована коллекция ДНК сортов представителей родов:

- *Lolium perenne* L, *Lolium multiflorum* Lam.,
- *Festuca arundinacea* SCHREB.;
- *Agropyron cristatum* L.;
- *Festulolium*;
- *Alopecurus pratensis* L., *Alopecurus arundinaceus* Poir.

и их:

- *Lolium perenne* L X *Lolium multiflorum* Lam.;
- *Alopecurus pratensis* L.X *Alopecurus arundinaceus* Poir.;
- *Lolium perenne* L, X *Agropyron cristatum* L.;
- *Lolium perenne* L, X *Festuca arundinacea* SCHREB. Всего 39 образца.

Полученные высококачественные препараты тотальной ДНК сортов и гибридных форм многолетних злаковых трав будут использованы для проведения ДНК маркирования с использованием маркерных систем.

На основе молекулярных маркеров нами разработана система ДНК-паспортизации сортов и гибридов многолетних злаковых трав.

Для молекулярно-генетической паспортизации сортов и гибридов многолетних злаковых трав, на основе литературных данных [3,4] отобран пул праймеров, которые были протестированы на предмет получения высокополиморфных, воспроизводимых маркеров. Для маркирования включенных в исследования гибридных форм и сортов многолетних злаковых трав были отобраны мультилокусные праймеры: ISSR (*inter simple sequence repeat*); RAPD (*random amplification of polymorphic DNA*); SCoT (*start codon targeted*); SRAP (*Sequence-related amplified polymorphism*) и микросателлитный праймер SSR (*Simple Sequence Repeat*).

Проведенное ДНК маркирование всех гибридных форм и сортов многолетних злаковых трав с использованием выше перечисленных маркерных систем, позволило дифференцировать все исследованные генотипы, разработать и составить уникальные профили для каждого из них, рассчитать генетические дистанции родства/отдаленности.

На основании полученных ДНК-спектров для исследованных образцов составлены генетические паспорта.

Таблица 2. Молекулярно-генетические паспорта на примере межвидового гибрида рода *Lolium* L. и родительских форм, составленные на основе результатов мультилокусного маркирования тотальной ДНК

<i>Lolium multiflorum</i> LAM., сорт Матадор	
Праймер	Маркер, bp
SCoT	
SCoT-01	1656, 1271, 828, 781, 715, 658, 607, 538, 427, 357, 248
SCoT-06	1003, 675, 604, 527, 382, 310, 269, 221, 176
SCoT-13	849, 690, 610, 475, 408, 356, 280, 202
SCoT-21	879, 693, 669, 481
SCoT-32	1093, 884, 534, 453, 386, 317, 264, 226
SRAP	
SRAP-Em06/Me02	970, 579, 449, 376, 298, 223
SRAP-Em06/Me09	1074, 907, 847, 686, 489, 453, 369, 213
SRAP-Em12/Me09	990, 896, 776, 533, 429, 349, 327
SRAP-Em13/Me05	1573, 1429, 1251, 544, 423, 365

<i>Lolium perenne</i> L., сорт Гаспадар	
Праймер	Маркер, bp
SCoT	
SCoT-01	1656, 1271, 973, 828, 715, 607, 559, 510, 427, 357, 248, 201
SCoT-06	1003, 701, 527, 421, 221
SCoT-13	729, 690, 610, 488, 449, 408, 356, 280, 231, 202
SCoT-21	879, 693, 669, 550, 481, 304
SCoT-32	1525, 1093, 884, 613, 490, 352, 317, 264, 226
SRAP	
SRAP-06/Me02	579, 472, 376, 343, 258, 223
SRAP-06/Me09	1074, 847, 686, 630, 489, 453, 413, 249, 213
SRAP-12/Me09	896, 776, 459, 349
SRAP-13/Me05	1573, 887, 513, 423, 342, 288
<i>Lolium</i> L. гибрид № 22-7 (сорт Выбор)	
Праймер	Маркер, bp
SCoT	
SCoT-01	1656, 1094, 866, 715, 658, 538, 486, 427, 357, 275, 201
SCoT-06	1119, 1003, 845, 742, 476, 310, 269, 221
SCoT-13	1002, 690, 610, 449, 408, 356, 280, 231, 202
SCoT-21	879, 812, 693, 669, 481, 432, 227
SCoT-32	1093, 884, 613, 490, 453, 431, 386, 317, 264
SRAP	
SRAP-m06/Me02	970, 895, 579, 472, 404, 376, 223
SRAP-m06/Me09	1074, 974, 907, 847, 630, 489, 453, 413, 369, 213
SRAP-m12/Me09	925, 842, 776, 459, 385, 349
SRAP-m13/Me05	1573, 730, 513, 423

Наличие ДНК-паспорта созданных новых высоко конкурентных сортов злаковых трав при внедрении в сельском хозяйстве позволит:

- провести проверку соответствия новых сортов критериям ООС-теста;
- оценить генетическую новизну сортов, линий и гибридов;
- оценить соответствие партий семян стандарту;
- подтвердить кондиционность семян, закупаемых за рубежом;
- исключить возможность фальсификации сортов и связанных с этим экономических потерь.
- улучшить систему патентования новых сортов, а также по характеристике аллельного состояния локусов решать спорные вопросы соответствия и авторства сорта.

Список литературы

1. Генетические основы селекции растений. В 4 т. Т. 4. Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетическая инженерия/ науч.ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. Беларуская навука, 2014, 653с.
2. Рябушкина, Н.А., Омашева, Галиакпаров Н. Н. Специфика выделения ДНК из растительных объектов. Биотехнология. Теория и практика, 201, № 2, с. 9–24.
3. Paäakinskiene I., Griffiths C. M., Bettany A. J.E., Paplauskiene V., Humphreys M. W. Anchored simple-sequence repeats as primers to generate species-specific DNA markers in *Lolium* and *Festuca* grasses. TheorAppl Genet, 2000, V. 100, p. 384–390.
4. Arghavani A., Asgharu A., Shokrpour M., Chmanabad M. Genetic diversity in ecotypes of two *Agropyron* species using RAPD markers. Research Journal of Environmental Sciences, 2010, V. 4 (1), p. 50–56.