

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
ОТДЕЛ БИОХИМИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

**КЛЕТОЧНЫЕ ЯДРА И ПЛАСТИДЫ
РАСТЕНИЙ:
БИОХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ**

Сборник материалов Международной конференции,
г. Минск,
26-28 мая 2004 г.

Минск

УП «ТЕХНОПРИНТ»

2004

**Клеточные
ядра
и пластиды
растений:**

биохимия и биотехнология

26-28
Май 2004 МИНСК



ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ В БЕЛАРУСИ СОРТОВ ГОЛУБИКИ ВЫСОКОЙ НА ОСНОВЕ RAPD-МАРКЕРОВ

Решетников В.Н., Спиридович Е.В., Филипена В.Л.,
Чижик О.В., Зубарев А.В., *Баранов О.Ю.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси,
220012, Беларусь, г. Минск, ул. Сурганова, 2В,
e-mail: biolog@it.org.by

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

Голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.) – ценное пищевое и лекарственное растение. Начиная с 1983 г., Центральный ботанический сад НАН Беларуси проводит целенаправленную работу по интродукции сортов данной культуры. В результате многолетних исследований доказана перспективность выращивания голубики высокой в Беларуси, показано преимущество этого вида перед местным видом – голубикой топяной (*Vaccinium uliginosum* L.) [1]. Определен перечень сортов голубики, которые имеют стабильные урожаи и высокое товарное качество ягод. Установлены климатические зоны промышленного выращивания голубики в Беларуси, а также разработана технология её возделывания. Создана коллекция, содержащая более 30 сортов этого вида, разработана технология получения посадочного материала из одревесневших и зеленых черенков, а также методом микроклонального размножения *in vitro*, что позволяет обеспечить потребности Республики в элитном посадочном материале. В этой связи актуальны исследования по паспортизации имеющегося сортового материала. Современные аналитические способы исследования специфичности биологических макромолекул позволяют на принципиально новой основе решить проблему идентификации генотипов, а также ряд вопросов, касающихся охраны прав собственности на селекционные достижения, сохранения и реализации сортов, контроля безопасности материала (наличие вирусов) и т.п. В

дополнение к традиционным подходам паспортизации на основе морфолого-физиологических признаков, успешно разрабатываются целые направления с использованием биохимических и молекулярных маркеров – белков и нуклеиновых кислот.

Молекулярно-генетические методы в отличие от морфолого-физиологических, позволяют выявить степень генетической дивергенции исследуемых растений вне зависимости от условий произрастания этих растений. Одним из широко распространенных методов изучения полиморфизма ДНК является RAPD-анализ (анализ произвольно амплифицированной полиморфной ДНК) [2]. Данный метод основан на амплификации препаратов ДНК с короткими (обычно десятичленными) произвольными праймерами. Выявляемые амплимерные зоны являются удобными маркерами для генетических исследований, а также для изучения филогенетических и таксономических взаимоотношений.

Целью данной работы являлось получение уникальных многолокусных портретов (генетических паспортов) для 9 интродуцированных сортов голубики высокой с использованием RAPD-диагностики.

Материалы и методы. Объектами исследования служили следующие сорта голубики высокой: Aiwengo, Tifblue, Weymouth, Concord, Blueray, Dixi, Rancocas, Earlyblue, Atlantic, селекционированные в США и интродуцированные в Беларусь. Для изолирования геномной ДНК использовали почки, молодые листья и активно растущие побеги растений открытого грунта, а также побеги культивируемых *in vitro* растений.

Геномную ДНК голубики высокой выделяли по методикам [3,4]. Качественную и количественную оценку препаратов ДНК производили спектрофотометрически (UV-VIS SP, Shimadzu). Отношение поглощения при 260 нм/230 нм использовалось как показатель степени очистки от белковых примесей, отношение поглощения при 260 нм/280 нм – от РНК. Для скрининга образцов использовались 20 праймеров коммерческого дизайна. Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в агарозном геле по стандартным методикам [5].

Результаты и обсуждение. Первым этапом работы при использовании молекулярных методов исследования ДНК расте-

ний, является получение высокоочищенной геномной ДНК из различных растительных тканей. Несмотря на существование ряда опубликованных протоколов по выделению тотальной ДНК растений, при работе со сложными для исследования древесными культурами, к которым относится и голубика высокая, необходима модификация этих методик. Это связано с наличием в клетках этих растений большого количества вторичных метаболитов, в том числе эндогенных полисахаридов и фенольных соединений, которые трудно отделить от ДНК. Образцы ДНК, полученные нами по нескольким стандартным методикам [3,4] содержали большое количество примесей и не могли быть использованы для дальнейшего RAPD-анализа. Модификация протокола выделения тотальной растительной ДНК с помощью СТАВ-буфера, позволила получить высококачественную геномную ДНК голубики (табл. 1). В результате данного этапа работы также установлено, что наиболее подходящим растительным материалом являются молодые, активно растущие побеги и листья.

Таблица 1

Качественные и количественные показатели препаратов геномной ДНК голубики высокой.

Сорт	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	Концентрация (нг/мкл)
Aiwengo	1,934	1,866	731,0
Tifblue	1,358	1,866	220,0
Weymouh	1,641	1,864	296,1
Concord	2,033	1,814	780,3
Blueray	1,311	1,576	326,3
Dixi	1,187	1,770	176,8
Rancocas	1,249	1,690	196,2
Earlyblue	1,433	1,634	355,9
Atlantic	1,196	1,507	496,3

OD – поглощение препарата ДНК при 230, 260 и 280 нм.

Проведена оптимизация RAPD-метода и идентификация праймеров, которые обнаруживают полиморфизм применительно к некоторым сортам голубики высокой. Испытано 20 произ-

вольных десятичных праймеров, различающихся по нуклеотидной последовательности и GC составу на геномной ДНК из листьев голубики. Электрофоретическое фракционирование продуктов полимеразной цепной реакции препаратов ДНК голубики с этими праймерами позволило выявить широкий спектр амплирных зон. Следует отметить, что для ДНК голубики изучаемых сортов из 20 использованных праймеров, полиморфные спектры были получены по 5 из них (табл. 2).

Таблица 2

Характеристика праймеров для RAPD-диагностики голубки высокой

Название праймера	Размер, (в нукл.)	Нуклеотидная последовательность (5'-3')	Температура отжига, °C
Oligo 1	10	CGTCTGCCCCG	42,0
Oligo 3	10	TCCATGCCGT	36,5
Oligo 9	10	AGGCCGCTTA	36,0
Oligo 10	10	TGTCAGCGGT	31,3
Oligo 11	10	TCCCGAACCG	41,0

Анализ по данным праймерам позволил выявить 19 амплирных зон, 11 из которых были полиморфны. На основании полученных RAPD-спектров, для всех исследованных сортов голубики были составлены многолокусные RAPD-паспорта (табл. 3). В табл. 3 приведены только те амплирные зоны, электрофоретическая идентификация которых была наглядна и легка, а генетическая детерминация не вызывала никаких сомнений.

Для количественной оценки полиморфизма и определения уровня дивергенции между исследуемыми сортами голубики, полученные результаты были представлены в виде матрицы состояний бинарных признаков: присутствие фрагмента принималось за 1, отсутствие – за 0. Величина размера каждой амплифицированной зоны вычислялась относительно электрофоретической подвижности маркеров с известной молекулярной

Таблица 3

Многолокусные генетические паспорта сортов голубики высокой, составленные на основе анализа RAPD-спектров

Праймер	Локус, п.н.	Сорт									
		Aiwengo	Tifblue	Weymouth	Concord	Blueray	Dixi	Rancocas	Earlyblue	Athlantic	
Oligo1	510	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
	705	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	980	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Oligo3	1140	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	430	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
	480	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
	500	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Oligo9	720	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0
	730	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	1800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Oligo10	370	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
	650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Oligo11	180	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	300	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1
	405	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
	730	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Oligo11	1480	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	790	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0

массой. Обозначение зон производилось по названию праймера, использованного для полимеразной цепной реакции, и размера зоны (в парах нуклеотидов) в надстрочнике. Так, например, зона размером в 370 п.н. в электрофоретическом спектре продуктов ПЦР с праймером Oligo 3 была обозначена – Oligo 3³⁷⁰. Показано, что популяции различаются по генетической вариабельности их представителей, которая выражалась не только наличием полиморфных локусов в ДНК некоторых растений, но и варьированием интенсивности гомологичных фрагментов в профилях амплификации ДНК у разных растений (рис. 1).

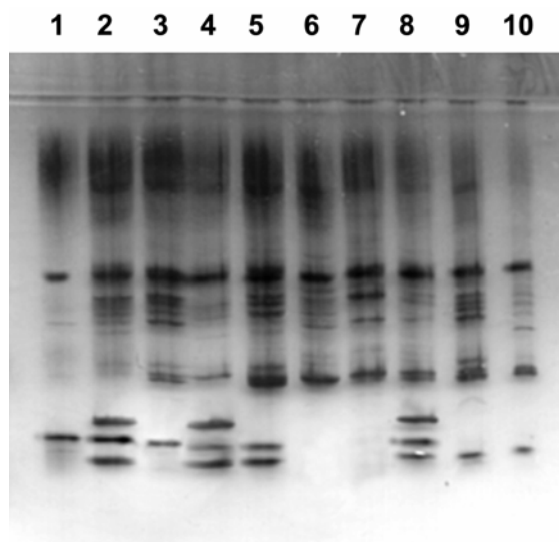


Рис. 1. RAPD-спектр разных сортов голубики высокой по праймеру Oligo 3.

1 – Bluecrop; 2 – Tifblue, 3 – Atlantic, 4 – Weymouth, 5 – Concord, 6 – Blueray, 7 – Aiwengo, 8 – Dixi, 9 – Rancocas, 10 – Earlyblue.

В результате исследования отработан метод выделения высокоочищенной геномной ДНК голубики, подобраны эффективные праймеры и оптимизированы условия проведения ПЦР. Адаптирован метод RAPD-анализа для популяционно-генетических исследований и паспортизации голубики высокой.

Полученные данные будут перенесены в предметно-ориентированную базу коллекции сортов голубики высокой. Впервые предлагается комплексный подход документирования уникальных коллекций голубики высокой ЦБС НАН Беларуси, основанный на направленной RAPD-паспортизации, которая будет сопровождаться цифровыми фотографиями, морфолого-физиологическим описанием, областями использования растения и другими характеристиками сорта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Курлович Т.В., Босак В.Н. Голубика высокорослая в Беларуси. Минск, 1998. 176 с.
2. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers / J.G.K. Williams, A.R. Kubelik, K.J. Livak et al. // *Nucleic Acids Res.* – 1990. – Vol. 18. – P. 6531-6535.
3. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from plant tissue / *Focus.* – V.12. – 1990. – P. 13-15.
4. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство. / Под редакцией Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. // М. – «Мир». – 1991. – С. 236-237.
5. Westermeier R. Electrophoresis in practice (Third Edition). – WILEY-VCH Verlag: Weinheim, 2001. – 349 p.