

Национальная академия наук Беларуси
Центральный ботанический сад

Опыт и перспективы возделывания ягодных растений семейства Брусничные на территории Беларуси и сопредельных стран

Материалы Международного научно-практического семинара
г. Минск, 18–19 июля 2017 г.

Минск
«Медисонт»
2017

УДК 634.738-15(082)
ББК 42.358-4я43
О-62

Редакционная коллегия:

В. В. Титок, д-р биол. наук, чл.-корр. НАН Беларуси;
Л. В. Гончарова, канд. биол. наук; *Н. Б. Павловский*, канд. биол. наук.

Рецензенты:

В. Н. Решетников, д-р биол. наук, академик НАН Беларуси;
Н. Б. Павловский, канд. биол. наук.

Иллюстрации предоставлены авторами публикаций

Опыт и перспективы возделывания ягодных растений семейства
О-62 Брусничные на территории Беларуси и сопредельных стран : материалы
Международного научно-практического семинара (г. Минск, 18-19
июля 2017 г.) / Национальная академия наук Беларуси; Центральный
ботанический сад ; редкол.: В. В. Титок [и др.]. — Минск : Медисонт,
2017. — 124 с.

ISBN 978-9857-136-61-2.

В сборнике представлены результаты исследований ученых Беларуси и
Росси. В них отражена экологическая проблематика и перспективы разви-
тия нетрадиционного ягодоводства, систематики, интродукции, биохимии,
биотехнологии, переработки и хранения плодов ягодных растений семейства
Vacciniaceae.

УДК 634.738-15(082)

ББК 42.358-4я43

ISBN 978-9857-136-61-2

© Центральный ботанический сад
Национальной академии наук Беларуси, 2017
© Оформление. ООО «Медисонт», 2017

Сравнение ISSR-профилей при использовании общего ПЦР-премикса (на примере генома *Vaccinium corymbosum* L.)

Гуринович Т. М., Водчиц Н. В., Юрченко Е. О.,
Волотович А. А.

*Полесский государственный университет, г. Пинск, Беларусь,
e-mail: tanyshakarpinskaya@yandex.ru*

Резюме. В настоящее время метод ISSR-ПЦР широко используется при обнаружении внутривидового полиморфизма. Воспроизводимость хороших результатов метода зависит от ряда факторов. Проанализировав результаты ISSR-ПЦР-реакций, реагенты которых вносились двумя способами: капельно и с помощью ПЦР-премикса, сделан вывод, что для научно-исследовательской работы предпочтительнее использовать метод отдельного внесения реагентов.

Summary. Currently, the ISSR-PCR method is widely used in the detection of intraspecies polymorphism. The reproducibility of good results depends on a number of factors. After analyzing the results of ISSR-PCR reactions, the reagents of which were introduced in two ways: by drop and by PCR premix, it was concluded that for the research work it is preferable to use the method of separate reagent injection.

Введение

Голубика высокая, как и другие представители подсемейства брусничных семейства вересковых, является ценной ягодной культурой [1]. Выращиванию этой культуры в Беларуси благоприятствуют оптимальные климатические и почвенные условия [2]. Исследования по изучению биохимического состава ягод голубики показали, что она является источником целого ряда биологически активных веществ [3]. Плоды голубики обладают рекордно высокой антиоксидантной активностью [4].

На сегодняшний день выращивание голубики высокой связано с актуальными вопросами сохранения и реализации ее сортов, фитопатологическим состоянием сортового материала, а в случае микроклонального размножения сортов — получением генетически однородных клонов [5]. Использование молекулярно-генетических технологий, в частности методов ДНК-маркирования, — это наиболее эффективный способ диагностики сортового материала в настоящее время [6].

Применение нейтральных молекулярных маркеров, таких как ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats), расположенных между микросателлитными повторами, диспергированными по всему растительному геному, обеспечивает воспроизводимый результат при детекции большого числа локусов [7]. Высокое количество микросателлитных повторов в геноме растений повышает вероятность обнаружения полиморфных локусов, делая ISSR-маркеры универсальным инструментом для генетического анализа [8]. Воспроизводимость результатов при использовании ISSR-ПЦР зависит от концентрации компонентов реакционной смеси, способа ее приготовления, степени очистки исходной ДНК и ряда других факторов [9].

Целью исследования являлось сравнение продуктов ISSR-ПЦР при приготовлении реакционной смеси двумя способами: капельно и с помощью общего премикса.

Материалы и методы исследований

Исследования были проведены на базе научно-исследовательской лаборатории прикладной и фундаментальной биотехнологии биотехнологического факультета УО «Полесский государственный университет». В ходе исследования были использованы молодые стебли голубики высокой сортов *Reka* и *Bluecrop*, произведенных микроклонально на базе научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве Полесского университета.

Для выделения ДНК использовался протокол ЦТАБ-PVP-меркаптоэтанол для растений с высоким содержанием полифенолов и полисахаридов [10]. ДНК изолировали из 0.03 г ткани стеб-

лей растений без очистки РНКазой. Препарат ДНК растворяли в 50 мкл деионизированной воды. Растворы нуклеиновых кислот хранили при -20°C .

Реакционная смесь для проведения ПЦР готовилась в объеме 25 мкл и включала следующие компоненты: $10\times$ ПЦР-буфер «А», 50 мМ MgCl_2 , 10 мМ смесь дНТФ, по 20 пмоль праймера, 20 нг ДНК, 2 ед. *Taq*-ДНК полимеразы (все производства PrimeTech, Беларусь, за исключением смеси дНТФ производства CarlRoth, Германия). Полимеразные цепные реакции проводились на термоциклере Biometra. Для праймеров UBC 824 и UBC 845 устанавливали следующую программу: 94°C — 30 с; 40 циклов: 94°C — 1 мин, 50°C — 1 мин, 72°C — 1 мин; 72°C — 5 мин. Разрешение продуктов амплификации проводили путем горизонтального электрофореза в 1,8 %-м агарозном геле в TBE-буфере в течение 115 мин.

Результаты и их обсуждение

В обычной полимеразной цепной реакции используются следующие реагенты: *Taq*-ДНК полимеразы, хлорид магния, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, праймер(ы), ДНК-матрица, буферный раствор, каждый из которых непосредственно участвует в ПЦР. Стандартную реакционную ПЦР-смесь можно приготовить двумя способами: первый — с использованием общего ПЦР-премикса; все компоненты, кроме ДНК-матрицы, готовятся в виде общей смеси, разделяемой затем на равные части по числу реакционных пробирок, а ДНК вносится отдельно на дно пустых пробирок. Второй вариант — это поэтапное по капельное внесение отдельных реагентов в каждую пробирку. Оба метода были применены для постановки ISSR-ПЦР-реакции с двумя праймерами UBC 824, UBC 845 и ДНК-матрицей сортов *Reka* и *Bluecrop*.

При использовании общего премикса в 5-кратной повторности были отмечены некоторые различия в ISSR-профилях (рис. 1). В первом случае при постановке реакции с ДНК-матрицей сорта *Reka* и праймером UBC 824 общее число наблюдаемых ISSR-маркеров составляло 6. У вариантов *B*, *Г*, *Д* отсутствовал минор-

ный фрагмент № 2. Вместе с тем основной фрагмент № 5 характеризовался изменчивой копийностью, и, как следствие, его зона имела различную яркость (рис. 1).

Во втором случае при постановке реакции с ДНК-матрицей сорта *Bluecrop* и праймером UBC 845 общее число наблюдаемых ISSR-маркеров у всех образцов составляло 4. У вариантов *B*, *D* появились дополнительные маркеры. Профиль *Г* засвечен и его можно считать неинформативным, возможно, в данную пробирку, при перемешивании ПЦР-микса, попало большее количество *Taq*-ДНК полимеразы (рис. 2).

Рабочей гипотезой данного исследования была ожидаемая идентичность ISSR-профилей, поскольку брался один и тот же образец ДНК и условия термоциклинга для всех вариантов были одинаковы. Наблюдаемое несоответствие в продуктах ISSR-ПЦР может быть связано как с небольшими различиями в объеме премикса между вариантами (погрешность дозирования), так и, предположительно, с некоторыми локальными различиями в концентрации компонентов.

Следует отметить, что метод постановки реакции через ПЦР-премикс быстрее и удобнее: он сберегает время за счет уменьшения числа переноса реагентов, минимизирует возможность ошибок при пипетировании, а также требует меньшего количества наконечников для дозаторов. Данный метод позволяет работать с большим количеством повторностей, но при вовлечении в эксперимент более десяти проб реагенты в общем премиксе размешиваются неравномерно, за счет чего некоторые профили засвечиваются. Принимая во внимание разницу между профилями, для научно-исследовательской работы рекомендуется ставить ПЦР с использованием общего премикса в трех повторностях для каждого сочетания образец ДНК-праймер с целью повышения достоверности результата. Это позволит оценить наличие малокопийных ISSR-фрагментов.

Второй использованный нами способ приготовления ПЦР-смеси предусматривал отдельное внесение компонентов в каждую пробирку. Для сочетания сорт-праймер в пяти повторностях наблюдалась высокая схожесть ISSR-профилей (рис. 3, 4).

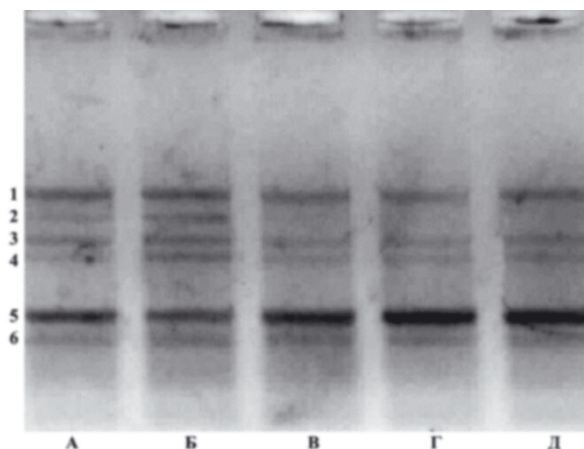


Рис. 1. Электрофоретические профили продуктов ISSR-ПЦР с праймером UBC 824 для сорта *Reka*, метод общего ПЦР-премикса

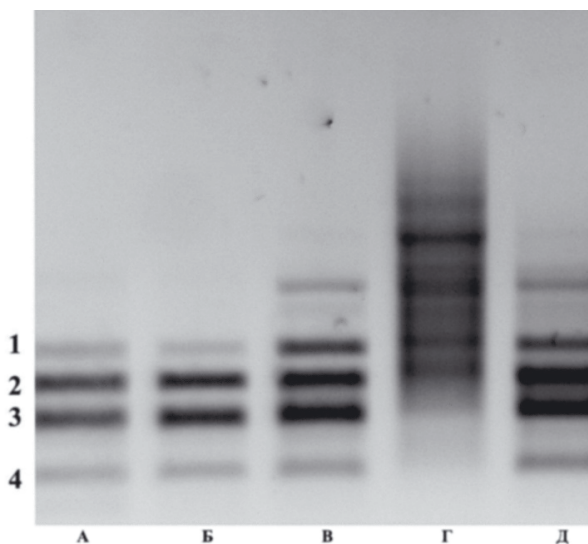


Рис. 2. Электрофоретические профили продуктов ISSR-ПЦР с праймером UBC 845 для сорта *Bluecrop*, метод общего ПЦР-премикса

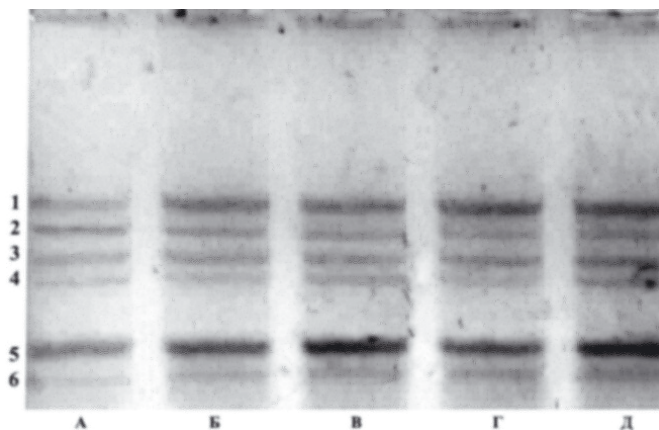


Рис. 3. Электрофоретические профили продуктов ISSR-ПЦП с праймером UBC 824 для сорта *Reka*, метод раздельного внесения реагентов

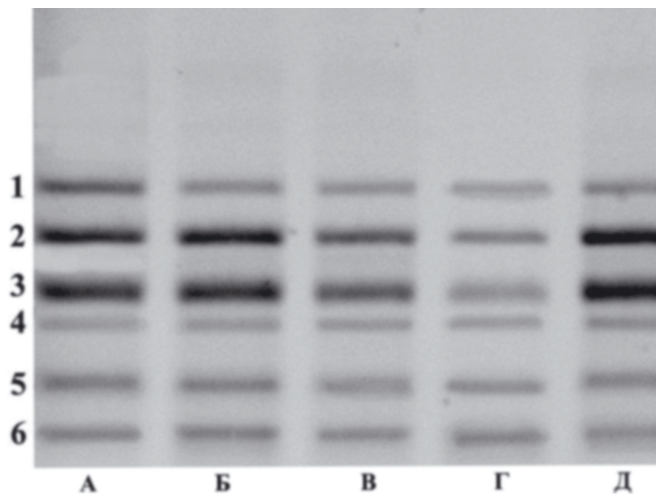


Рис. 4. Электрофоретические профили продуктов ISSR-ПЦП с праймером UBC 845 для сорта *Bluecrop*, метод раздельного внесения реагентов

В первом случае при постановке реакции с ДНК-матрицей сорта *Reka* и праймером UBC 824 все основные фрагменты, вовлеченные в анализ, были постоянны, включая минорный маркер № 2. Основные маркеры № 1 и 5 характеризовались разной копийностью между вариантами, но это мы не считаем помехой для процесса типирования сорта (см. рис. 3).

Во втором случае при постановке реакции с ДНК-матрицей сорта *Bluecrop* и праймером UBC 845 также наблюдалось проявление всех ISSR-маркеров (см. рис. 4).

Таким образом, метод покапельного внесения реагентов в реакционную смесь дает более высокую воспроизводимость продуктов ISSR-ПЦР. Данный способ приготовления ПЦР-смеси может быть выбран в качестве основного для научно-исследовательской работы. Недостатком является то, что из-за большого количества пипетирований при работе с реагентами требуется аккуратность, так как возможна перекрестная контаминация между образцами ДНК.

Выводы

При постановке опыта с одинаковой ДНК-матрицей и разнесением по пробиркам общего ПЦР-премикса (без ДНК) наблюдается достаточно высокая воспроизводимость ISSR-профилей. Использование этого приема позволяет работать с относительно большим количеством повторностей, сберегает время, а также снижает риск загрязнения сток- и конечного раствора. Однако приготовление премикса более чем для десяти проб из-за неравномерного перемешивания реагентов снижает качество некоторых профилей. Для научно-исследовательской работы предпочтительнее использовать метод раздельного внесения реагентов в каждую пробирку, который позволяет получить более высокую воспроизводимость ISSR-профилей.

Список литературы

1. Mainland, C. M. Blueberry health information — some new mostly review / C. M. Mainland, J. W. Tucker [VII International Symposium on *Vaccinium Culture*] // *ISHS Acta Horticulturae*. — 2002. — Is. 574. — P. 39–43.
2. Zu, X. Y. Anthocyanins extracted from Chinese blueberry (*Vaccinium uliginosum* L.) and its anticancer effects on DLD-1 and COLO205 cells / X. Y. Zu [et al.] // *Chinese Medical Journal*. — 2010. — Vol. 123. — No. 19. — P. 2714–2719.
3. Рупасова, Ж. А. Сравнительная оценка биохимического состава плодов перспективных сортов голубики высокорослой в условиях Беларуси / Ж. А. Рупасова, В. Н. Решетников, Н. Б. Павловский, А. П. Яковлев, А. М. Бубнова // *Голубиководство в Беларуси: итоги и перспективы: Мат-лы Респ. науч.-практ. конф. Минск, 17 августа 2012 г. / Центр. бот. сад НАН Беларуси; редкол.: В. В. Титок (отв. ред.) [и др.]*. — Минск, 2012. — С. 62–66.
4. Matchett, M. D. Blueberry flavonoids inhibit matrix metalloproteinase activity in DU145 human prostate cancer cells / M. D. Matchett [et al.] // *Biochemistry and Cell Biology*. — 2005. — Vol. 83. — No. 5. — P. 637–643.
5. Гончарова, Л. В. Молекулярно-генетические аспекты анализа сортов голубики высокой / Л. В. Гончарова, Е. В. Спиридович // *Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры голубики высокой: материалы Междунар. науч. конф., посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси*. — Минск, 2012. — С. 283–287.
6. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. — Минск: Юнипол, 2007. — С. 176.
7. Грушецкая, З. Е. Использование ISSR-анализа для изучения внутри- и межвидового генетического полиморфизма различных таксонов высших растений / З. Е. Грушецкая [и др.] // *Вестн. Белорус. гос. ун-та. Сер. 2, Химия. Биология. География*. — 2013. — № 3. — С. 50–56.
8. Глазко, В. И. Генетические взаимоотношения между сортами сои, оцененные с использованием ISSR-маркеров / В. И. Глазко, А. В. Дубин, Р. Н. Календарь и др. // *Цитология и генетика*. — 1999. — № 5. — С. 47.
9. Харченко, П. Н. ДНК-технологии в развитии агробиологии / П. Н. Харченко, В. И. Глазко. — Москва: Воскресенье, 2006. — 480 с.
10. Водчиц, Н. В. Сравнительный анализ методов экстракции общей геномной ДНК голубики высокорослой / Н. В. Водчиц, И. О. Зайцева, И. Г. Кирикович, Е. О. Юрченко, А. А. Волотович // *Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук*. — 2014. — № 5. — С. 26–29.