

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ ОРДЕНОВ ОКТЯБРЬСКОЙ
РЕВОЛЮЦИИ И ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»**

АГРОНОМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА РАСТЕНИЕВОДСТВА

КАФЕДРА ЗЕМЛЕДЕЛИЯ

**ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
ВОЗДЕЛЫВАНИЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ
КУЛЬТУР**

**Сборник статей
по материалам XIII Международной
научно-практической конференции,
посвященной 100-летию кафедры растениеводства
(г. Горки, 30–31 января 2019 г.)**

Горки
БГСХА
2019

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ ОРДЕНОВ ОКТЯБРЬСКОЙ
РЕВОЛЮЦИИ И ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»

АГРОНОМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА РАСТЕНИЕВОДСТВА

КАФЕДРА ЗЕМЛЕДЕЛИЯ

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
ВОЗДЕЛЫВАНИЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ
КУЛЬТУР

Сборник статей
по материалам XIII Международной
научно-практической конференции, посвященной
100-летию кафедры растениеводства
(г. Горки, 30–31 января 2019 г.)

Горки
БГСХА
2019

УДК 631.5(063)

ББК 41.4я43

Т 38

Редакционная коллегия:

МАСТЕРОВ А. С., зав. кафедрой земледелия, канд. с.-х. наук, доцент; ТРАПКОВ С. И., декан агрономического факультета, канд. с.-х. наук, доцент; ТАРАНУХО В. Г., зав. кафедрой растениеводства, канд. с.-х. наук, доцент; ДУКТОВА Н. А., председатель методической комиссии агрономического факультета, канд. с.-х. наук, доцент; ЦЫРКУНОВА О. А., зам. декана агрономического факультета по научной работе, ст. преподаватель каф. ботаники и физиологии растений

Рецензенты:

заведующий кафедрой общего земледелия УО ГГАУ,
кандидат с.-х. наук, доцент *В. Г. Смольский*;
заведующий кафедрой агрохимии УО БГСХА,
доктор с.-х. наук, профессор *И. Р. Вильдфлуш*

Т 38. Технологические аспекты возделывания сельскохозяйственных культур: сборник статей по материалам XIII Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию кафедры растениеводства. – Горки : БГСХА, 2019. – 336 с.

Представлены материалы XIII Международной научно-практической конференции. Изложены результаты исследований по актуальным проблемам сельскохозяйственного производства.

Для научных работников, преподавателей, студентов и специалистов сельскохозяйственного профиля.

Статьи печатаются в авторской редакции с минимальной технической правкой

ПОЛУЧЕНИЕ ISSR-ФРАГМЕНТОВ ГОЛУБИКИ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ SCAR-ПРАЙМЕРОВ

¹Водчиц Н. В. – зав. лабораторией; ²Пасовец М. В. – магистрант;
²Волкова Е. М. – к. с.-х. н., доцент; ³Волотович А. А. – к. б. н.,
доцент, зав. лабораторией
УО «Полесский государственный университет», ¹научно-
исследовательская лаборатория клеточных технологий
в растениеводстве; ²кафедра битехнологии; ³КФХ «Бокша»

Голубика высокая *Vaccinium corymbosum* L. представляет интерес благодаря высокому потенциалу содержащихся в ней активностей веществ: гликозидов, каротиноидов, антоциановых соединений, обуславливающих особую ценность ягод.

Выращиванию этой культуры в Беларуси способствуют достаточно оптимальные климатические и почвенные условия [1].

В связи с высокой актуальностью голубики стоит задача строгой сертификации коллекционного и посадочного материала и коллекций *in vitro* на основе современных молекулярно-биологических и генетических методов. Создание генетического паспорта сорта является стратегической необходимостью при оценке качества растительного материала: подтверждения сортности и стабильности генотипа.

Специфические SCAR маркеры являются полезными инструментами для решения проблем сравнительной генетики и геномики, молекулярной систематики и таксономии, позволяют дискриминировать определенные молекулярные фенотипы различных видов одного рода, выявить уникальные соматоклональные варианты и молекулярные события, сопряженные с вариабельностью соматклонов, они способствуют поддержанию и оценке коллекций семян в генетических банках [3].

Целью работы было элюирование сорт-уникальных ISSR-маркеров ДНК для дальнейшего создания на их основе SCAR-праймеров.

Исследования были проведены на базе научно-исследовательской лаборатории прикладной и фундаментальной биотехнологии биотехнологического факультета учреждения образования «Полесский государственный университет» (далее БТФ ПолесГУ). В качестве исследуемых объектов использовали ткани голубики (лист, стебель), сортов Northland, Bluejaу, произведенные методом клонального микроразмножения *in vitro* на базе научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве БТФ ПолесГУ.

ДНК выделяли протоколом «ЦТАБ-PVP-меркаптоэтонол». Измерение концентрации ДНК проводили по стандартной методике на спектрофотометре NanoDrop 1000, в диапазоне длин волн 220–350 нм.

Реакционная смесь с праймерами UBC 818, UBC 808 для проведения ISSR-ПЦР готовилась в объеме 25 мкл и включала стандартные компоненты [1].

Размер амплифицированной последовательности для каждой аллели оценивали с помощью горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле.

В дальнейшем фрагменты длиной 240 и 260 п.н. элюировали методом центрифугирования и использовали в качестве ДНК-матрицы в повторных ISSR-ПЦР-реакциях.

SCAR-маркеры применимы для разнообразных исследований. Для получения локус-специфичных маркеров интересующий фрагмент экстрагируют из геля, клонируют и секвенируют. На основе полученной нуклеотидной последовательности подбирают длинные высокоспецифичные праймеры, которые амплифицируют единичный фрагмент с высокой степенью воспроизводимости [5].

При проведении межмикросателлитного анализа с пятью праймерами для шести сортов голубики было выявлено 32 уникальных маркера [1].

Для дальнейшего исследования нами были выбраны легкие фрагменты длиной 260 п.н. с праймером 808 для сорта Northland и 240 п.н. с праймером 818 для сорта Bluejaу. Данные уникальные локусы выявлены у сортов, внесенных в государственный реестр древесно-кустарниковых пород Беларуси [2]. Они небольшого размера, учитывая, что наиболее оптимальной длиной для конструирования праймер-расчитают фрагменты в диапазоне 150–300 пар оснований [4].

Выбранные ДНК-маркеры выделяли из агарозного геля и оценивали их спектрофотометрические характеристики (таблица 1).

Использованная нами методика экстракции, позволяет выделять ДНК-фрагменты с хорошей концентрацией реамликонов и достаточно высокой степенью их очистки. Пик поглощения находился на длине волны равной 260 нм.

Таблица 1. Спектрофотометрические характеристики образцов

Сорт голубики	Фрагмент ДНК (п.н.)	1 выделение		2 выделение	
		Конц (нг/мкл)	Степень очистки λ 260/280	Конц (нг/мкл)	Степень очистки λ 260/280
Northland	260	52.7	1.80	90.4	1.76
Bluejay	240	40.6	1.75	39.8	1.79

Элюированные фрагменты подвергали обогащению через повторную амплификацию и проводили электрофоретический анализ. Во всех случаях на электрофореграмме наблюдалась хорошая воспроизводимость фрагментов, яркие, насыщенные полосы с четкими контурами, что свидетельствует об удовлетворительном качестве ДНК-матрицы и удалении ингибиторов.

Из представленных ранее 32 микросателлитных уникальных локусов, нами были отобраны два фрагмента длиной 240 п.н. и 260 п.н. После экстрагирования из агарозного геля методом центрифугирования, спектрофотометрические характеристики выделенных реампликонов позволили использовать их в дальнейших исследованиях.

На профилях наблюдались продукты амплификации, заданного размера без неспецифических фрагментов.

Элюированные видоспецифические маркеры могут быть в дальнейшем преобразованы в SCAR-праймеры, которые позволяют идентифицировать и дифференцировать сорта голубики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Водчиц, Н. В. Применение ISSR-маркеров для генетической паспортизации и сертификации растений рода *Vaccinium* / Н. В. Водчиц // Весці НАНБ. Сер. біял. навук. – 2016. – № 3. – С. 115–120.
2. Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород // Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Государственная инспекция по испытанию и охране сортов растений ; ред. В. А. Бейня. – Минск. – 2018. – 138 с.
3. Омашева, М. Е. Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок генотипирования / М. Е. Омашева, К. П. Аубакирова, Н. А. Рябушкина // *Biotechnology. Theory and practice*. – 2013. – № 4. – С. 20–28.
4. Основные аспекты конструирования праймеров для определения видовой принадлежности ДНК крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции / О. В. Кригер [и др.] // *Современные проблемы науки и образования*. – 2012. – № 2. – С. 326–328.
5. Поиск и конструирование популяционно-генетических SCAR-маркеров для камчатской микижи *Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss* / М. Н. Мельникова [и др.] // *Генетика*. – 2010. – том 46. – № 6. – С. 792–797.