

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

Сравнительный ISSR-ПЦР-анализ ДНК растений, выделенной протоколом ЦТАБ-PVP-меркаптоэтанол

Водчиц Н. В., Коршун Е. Р., Пасовец М. В., Жатько К. И.,
Гуринович Т. М., Волотович А. А.

Полесский государственный университет, г. Пинск, Беларусь,
e-mail: vodna76@mail.ru

Резюме. Общей проблемой высших растений при выделении ДНК являются различные загрязняющие вещества: полисахариды и полифенолы. Получение качественного препарата суммарной ДНК и устранение ингибирующих веществ для растений, богатых полифенолами и полисахаридами, удалось с помощью протокола ЦТАБ-PVP-меркаптоэтанол. Была проведена амплификация ДНК всех образцов с использованием ISSR-праймера UBC 845. Применение выделенной ДНК в качестве матрицы в ISSR-анализе позволило получить воспроизводимые электрофоретические профили с количеством фрагментов от 7 до 11.

Summary. The common problem of higher plants in the isolation of DNA are various pollutants: polysaccharides and polyphenols. The preparation of a qualitative preparation of total DNA and the elimination of inhibitory substances for plants rich in polyphenols and polysaccharides was achieved with the help of the CTAB-PVP-mercaptoethanol protocol. DNA amplification of all samples was performed using the ISSR primer UBC 845. The use of isolated DNA as a template in the ISSR analysis yielded reproducible electrophoretic profiles with a number of fragments from 7 to 11.

Введение

Семейство вересковых (*Ericaceae*) включает около тысячи видов вечнозеленых, полулистопадных и листопадных кустарников и деревьев, особое место среди которых занимают обширные роды — *Rhododendron* и *Vaccinium* [1].

Голубика высокая является ценной ягодной культурой как в биологическом, так и в экономическом отношении, а в результате многолетних исследований была доказана перспективность ее выращивания в условиях Беларуси [2].

Рододендроны лишь сравнительно недавно стали по-настоящему популярны, так как они продуцируют биологически активные вещества, обладающие широким спектром фармакологического действия и успешно применяются для профилактики и лечения многих заболеваний [3; 4].

Плоды современных сортов малины обычного и ремонтантного типов рода *Rubus* в настоящий момент являются одними из наиболее востребованных. Они пользуются большим спросом у населения, так как обладают уникальными питательными и лечебными свойствами [5].

Получение высокомолекулярной ДНК из тканей растений — это сложная задача, поскольку важным фактором является эффективное разрушение клеточных стенок, а растительные экстракты содержат большое количество белков, полисахаридов, танинов и пигментов, которые в ряде случаев весьма трудно отделить от нуклеиновой кислоты [6]. Устранения ингибирующих ПЦР веществ у растений рода *Vaccinium* с высоким содержанием полифенолов и полисахаридов удалось достигнуть с помощью протокола ЦТАБ-PVP-меркаптоэтанол [7]. Растительный материал рододендронов и малины также отличается большим содержанием данных соединений [4; 5].

ISSR-метод используется для выявления генетического разнообразия растительного материала, идентификации генетического полиморфизма видов растений с различными целями (классификация, идентификация, паспортизация и т. д.) [8].

Целью данной работы являлось проведение сравнительного молекулярно-генетического анализа ДНК, выделенной протоколом ЦТАБ-PVP-меркаптоэтанол из растительных тканей рододендрона вечнозеленого, малины обыкновенной и двух сортов голубики высокой.

Материалы и методы исследований

Исследования были проведены на базе научно-исследовательской лаборатории прикладной и фундаментальной биотехнологии биотехнологического факультета УО «Полесский государствен-

ный университет» (далее БТФ ПолесГУ). Использовали ткани разных органов растений (стебель и лист) сортов голубики высокой *Toro*, *Bluegold*, малины обыкновенной сорт *Polana* и рододендрона вечнозеленого, произведенных методом клонального микроразмножения *in vitro* на базе научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве БТФ ПолесГУ.

ДНК выделяли протоколом ЦТАБ-PVP-меркаптоэтанол [7]. Осадок ДНК растворяли в 50 мкл воды milliQ. Полученный раствор нуклеиновых кислот хранили при -20°C .

Оценку эффективности выделения ДНК из листьев и стеблей растений проводили, используя электрофоретическое разделение полученного продукта в агарозном геле, спектрофотометрическое определение концентрации и чистоты образцов, а также ISSR-ПЦР-анализ.

Длину фрагментов выделенной ДНК оценивали с помощью горизонтального электрофореза экстракта с загрузочным красителем, наносимых в 0,8 % агарозный гель в трисборатном буфере при напряжении 70 V в течение 30 мин.

Измерение концентрации ДНК проводили по стандартной методике по объему 1,5 мкл полученного экстракта в 1–3 повторностях на спектрофотометре NanoDrop 1000 в диапазоне длин волн 220–350 нм.

Реакционная смесь для проведения ПЦР готовилась в объеме 25 мкл и включала следующие компоненты: 10× ПЦР-буфер «А», 50 мМ MgCl_2 , 10 мМ дНТФ, 20 пм праймера UBC 845, 20 нг ДНК, 2 ед. *Taq*-полимеразы (производства PrimeTech, Беларусь). Полимеразные цепные реакции проводились на термоциклере Biometra по следующей программе: 94°C — 5 мин; 40 циклов: 94°C — 1 мин, 50°C — 1 мин, 72°C — 1 мин; 72°C — 5 мин.

Длину фрагментов амплифицированной ДНК оценивали с помощью горизонтального электрофореза в 2 %-ном агарозном геле в трисборатном буфере при напряжении 60 V в течение 180 мин. Для определения длины фрагментов ДНК использовали размерные маркеры 100 bpDNA Ladder (производства ThermoScientific, Литва). Визуализация результатов электрофореза проводилась в приборе гель-документирования Quantum ST4.

Результаты и их обсуждение

Выделение ДНК проводили протоколом ЦТАБ-PVP-меркаптоэтанол, который ранее был адаптирован для голубики высокой [7]. Анализ ДНК, полученной данным протоколом, показал, что соотношение поглощения при 260/280 нм в среднем равно 1.80. Это свидетельствует о том, что полученные образцы ДНК не содержат примесей. Средняя концентрация ДНК голубики высокой сорта *Bluegold* из листа составила 31,7 нг/мкл, из стебля — 55,1 нг/мкл; сорта *Toro* из листа — 55,2 нг/мкл, из стебля — 97,2 нг/мкл. Средние значения концентрации ДНК рододендрона из листа составили 39,1 нг/мкл, из стебля — 68,9 нг/мкл. Средняя концентрация ДНК малины обыкновенной сорта *Polana* из листа составила 138,4 нг/мкл, из стебля — 56,6 нг/мкл. Было установлено, что лучшие результаты получаются при выделении ДНК из стебля у сортов голубики высокой и рододендрона вечнозеленого, из молодого листа у малины обыкновенной. Количество ДНК варьировало в пределах 21.0–154.3 нг/мкл [9].

На рисунке 1 видно, что ДНК всех образцов светится в виде довольно компактной полосы, что свидетельствует о ее малой фрагментации.

Примененный нами протокол за счет увеличения количества меркаптоэтанола позволил получить из стебля и листа исследуемых растений ДНК высокого качества, с отсутствием дегградации, без примесей полифенолов и полисахаридов.

Проведенный ISSR-ПЦП-анализ с ДНК-матрицей, выделенной протоколом ЦТАБ-PVP-меркаптоэтанол, позволяет говорить об отсутствии шмера и хорошей воспроизводимости результатов (рис. 2).

Всего было детектировано 17 ISSR-ПЦП-маркеров. Число амплифицированных фрагментов варьировало от 11 — у сортов голубики высокой, 9 — у сорта малины обыкновенной и до 6 у рододендрона вечнозеленого.

Основная зона разделения фрагментов расположена в диапазоне от 880 до 170 п. н. Сравнительный анализ показал, что маркеры размером 360 и 280 п. н. являются мономорфными для двух сортов голубики и рододендрона, что подтверждает принадлеж-

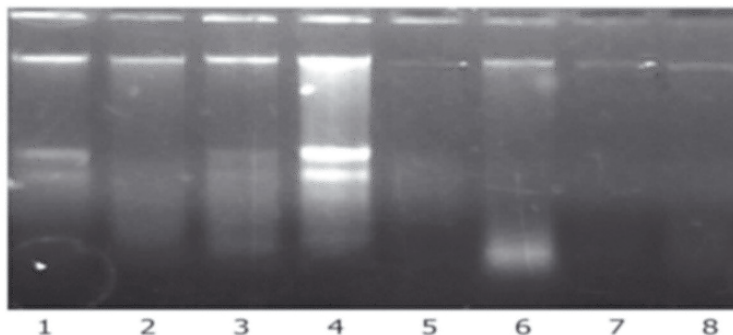


Рис. 1. Электрофореграмма образцов ДНК, выделенной протоколом ЦТАБ-РVP-меркаптоэтанол, без обработки РНКазой:
 1 — голубика высокая сорт *Bluegold* (лист); 2 — голубика высокая сорт *Bluegold* (стебель); 3 — голубика высокая сорт *Toro* (лист); 4 — голубика высокая сорт *Toro* (стебель); 5 — рододендрон вечнозеленый (лист); 6 — рододендрон вечнозеленый (стебель); 7 — малина обыкновенная сорт *Polana* (лист); 8 — малина обыкновенная сорт *Polana* (стебель)

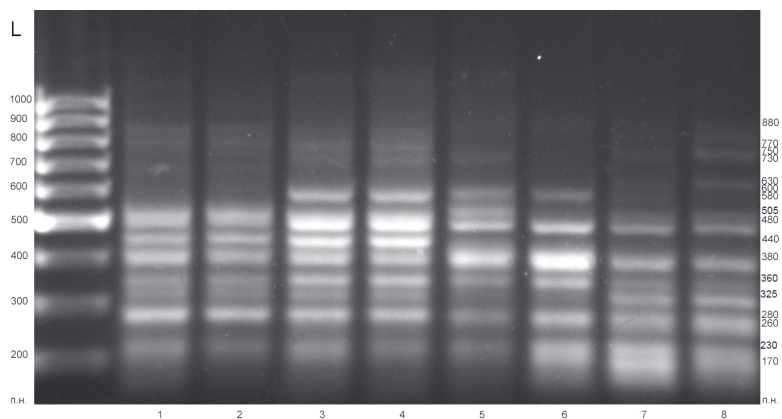


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ISSR-ПЦР растительных образцов с праймером UBC 845:
 1 — голубика высокая сорт *Bluegold* (лист); 2 — голубика высокая сорт *Bluegold* (стебель); 3 — голубика высокая сорт *Toro* (лист); 4 — голубика высокая сорт *Toro* (стебель); 5 — рододендрон вечнозеленый (лист); 6 — рододендрон вечнозеленый (стебель); 7 — малина обыкновенная сорт *Polana* (лист); 8 — малина обыкновенная сорт *Polana* (стебель); L — стандарт длин фрагментов (п. н.)

ность их к одному семейству *Ericaceae*. Учитывая, что малина обыкновенная относится к другому семейству и не имеет общего происхождения [1] с тремя другими объектами исследования, выявленный фрагмент размером 505 п. н., который был общим для нее и двух сортов голубики, а также аллели размером 380 и 220 п. н., мономорфные для всех образцов, скорее всего полиморфны на уровне нуклеотидных сиквенсов.

Выявленные в данном исследовании локусы 505 и 325 п. н. для двух сортов голубики, в предыдущей работе по ISSR-маркированию шести других сортов (*Bluecrop*, *Northland*, *Reka*, *Denisblue*, *Northblue* и *Bluejay*), были определены нами как мономорфные, то есть одинаковые для всех. Маркер размером 580 п. н., сорта *Toro* совпадает с сорт-специфическим фрагментом сорта *Denisblue*, а аллель 380 п. н., определившаяся у двух сортов голубики высокой, задействованных в данном исследовании, совпадает с уникальным фрагментом черники обыкновенной. Выявленный локус 280 п. н. сортов *Bluegold* и *Toro*, у шести исследуемых ранее сортов не обнаружен [10].

Выводы

Методика ЦТАБ-PVP-меркаптоэтанол позволяет получить чистый препарат ДНК без признаков деградации и примесей у растений, богатых полифенолами и полисахаридами, за счет увеличения концентрации меркаптоэтанола.

Экспериментально установлено, что лучшие результаты получаются при выделении ДНК из стебля у сортов голубики высокой и рододендрона вечнозеленого, из молодого листа у малины обыкновенной.

Средний коэффициент абсорбции при длине волны A260/A280 нм равнялся 1.80. При этом количество ДНК варьировало в пределах 21.0–154.3 нг/мкл.

Использование выделенной ДНК в качестве матрицы в ISSR-ПЦР-анализе позволило получить воспроизводимые электрофоретические профили с количеством фрагментов от 7 до 11, зона разделения которых расположена в диапазоне от 880 до 170 п. н.

Выявленные мономорфные фрагменты у растений, принадлежащих к разным семействам *Ericaceae* и *Rosaceae*, вероятнее всего отличаются на уровне нуклеотидной последовательности.

Результаты, полученные для сортов голубики высокой *Bluegold* и *Toro*, совпадают с полученными ранее данными по ISSR-анализу растений рода *Vaccinium* с праймером UBC 845.

Список литературы

1. Шостаковский, С. А. Систематика высших растений: учеб. для вузов / С. А. Шостаковский — М.: «Высшая Школа», 1972. — 352 с.
2. Божидай, Т. Н. Анализ генетической стабильности растений голубики сорта Duke, полученных в культуре *in vitro*. / Т. Н. Божидай, Н. Н. Волосевич, Н. В. Кухарчик // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук — 2015. — № 2. — С. 60–63.
3. Калаев, В. Н. Разработка метода получения препарата суммарной ДНК высокого качества из растений рода *Rhododendron* / В. Н. Калаев [и др.] // Фундаментальные исследования. — 2012. — № 5. — С. 148–152.
4. Катанская, В. М. Рододендроны: биология, фармакология, полифенолы. / В. М. Катанская, Н. В. Загоскина // Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные проблемы: материалы I Междун. научной конф. — Новосибирск: Изд-во НГАУ, 2013. — С. 167–169.
5. Соболев, В. В. Использование метода полимеразной цепной реакции для генетического маркирования ремонтантной малины: автореф. дис. на соиск. учен. степ. к. б. н.: спец. 03.00.23 / В. В. Соболев — Москва, 2004. 18 с.
6. Великов, В. А. Молекулярная биология. Практическое руководство: учеб. пособие для студ. биол. фак. и фак. нано- и биомед. технол., — Саратов: Издательство «Саратовский источник», 2013. — 84 с.
7. Водчиц, Н. В. Сравнительный анализ методов экстракции общей геномной ДНК голубики высокорослой / Н. В. Водчиц, Е. О. Юрченко, И. О. Зайцева, И. Г. Кирикович, А. А. Волоотович // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук. — 2014. — № 2. — С. 25–30.
8. Новикова, А. А. Оценка возможности применения ISSR-маркеров для систематизации и генетической паспортизации растений рода *Rho*

- dodendron* // Научный журнал КубГАУ. — 2012. — № 82 (08). — С. 79–89.
9. Жатько, К. И. Возможность применения протокола ЦТАБ-RVP-мер-каптоэтанол для выделения ДНК из растений, богатых полифенолами и полисахаридами / К. И. Жатько [и др.] // Научный потенциал молодежи — будущему Беларуси: материалы XI Междунар. молодежной науч.-практ. конф., УО «Полесский государственный университет». — Пинск: ПолесГУ, 2017. — С. 291–293.
 10. 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.