

ПРИМЕНЕНИЕ ISSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА СОРТОВ ГОЛУБИКИ

А.О. Кузьменчук, В.А. Халюк, 4 курс

Научный руководитель – Н.В. Водчиц, заведующий ОЛ

«ДНК и клеточных технологий в растениеводстве и животноводстве»

Полесский государственный университет

Голубика высокорослая (*Vaccinium corymbosum* L.) является ценной ягодной культурой, использующейся длительное время в пищевых и лекарственных целях [1, с. 204]. Ее плоды – диетический гипоаллергенный продукт, обладающий рекордно высокой антиоксидантной активностью [2, с. 23].

Среди современных методов анализа генетического полиморфизма применяются различные модификации ПЦР, в том числе ISSR–ПЦР (межмикросателлитный анализ ДНК) [3, с. 415]. Метод обладает высокой разрешающей способностью для оценки отношений между сортами и гибридами растений. Он основан на анализе участков ДНК, расположенных между микросателлитными повторами, диспергированными по всему растительному геному, и обеспечивает воспроизводимый результат при детекции большого числа локусов. [4, с. 18].

Цель работы: проведение молекулярно-генетического анализа тринадцати сортов голубики, отобранных в отраслевой лаборатории «ДНК и клеточных технологий в растениеводстве и животноводстве» УО «Полесский государственный университет», с использованием микросателлитных маркеров.

Исследования были проведены на базе отраслевой лаборатории «ДНК и клеточных технологий в растениеводстве и животноводстве».

Объектом исследования являлись ISSR-маркеры тринадцати сортов голубики, произведенной методом клонального микроразмножения *in vitro* на базе отраслевой лаборатории.

Реакционная смесь для проведения ISSR-ПЦР с праймером UBC 818 готовилась по стандартной методике [5, с. 67–68]. Полимеразные цепные реакции проводились в термоциклере TC–1000G.

Длину фрагментов амплифицированной ДНК оценивали с помощью горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле, в 1х буфере ТБЕ, при стартовом напряжении 90 В и основном напряжении фореза 50 В, в течение 240 мин. Окраска ДНК осуществлялась бромистым этидием, вносимым в гель в концентрации 5 мкг/мл, до полного застывания геля.

Визуализация результатов электрофореза проводилась в приборе гель-документирования Quantum ST4. Для окончательной обработки ISSR-профилей применялась программа Adobe Photoshop PS v.12. Для сопоставления профилей применялся инструмент «горизонтальные направляющие». Для определения размера фрагментов применялся метод создания калибровочного графика в программе Microsoft Excel.

Праймер UBC 818 позволил получить стабильные электрофоретические профили ISSR-фрагментов.

В целом учитывалось 14 амплифицированных фрагмента тринадцати сортов голубики. При электрофорезе основная зона разделения фрагментов находилась в пределах 270–1160 п.н., из них 450 п.н. и 540 п.н. 2 (14,3 %) являлись мономорфными для всех сортов. Среди выявленных маркеров 1 фрагмент (7,1 %) длиной 1040 п.н. относился к уникальным, т. е. он встречался только один раз среди анализируемых генотипов у сорта Пуру (рисунок).

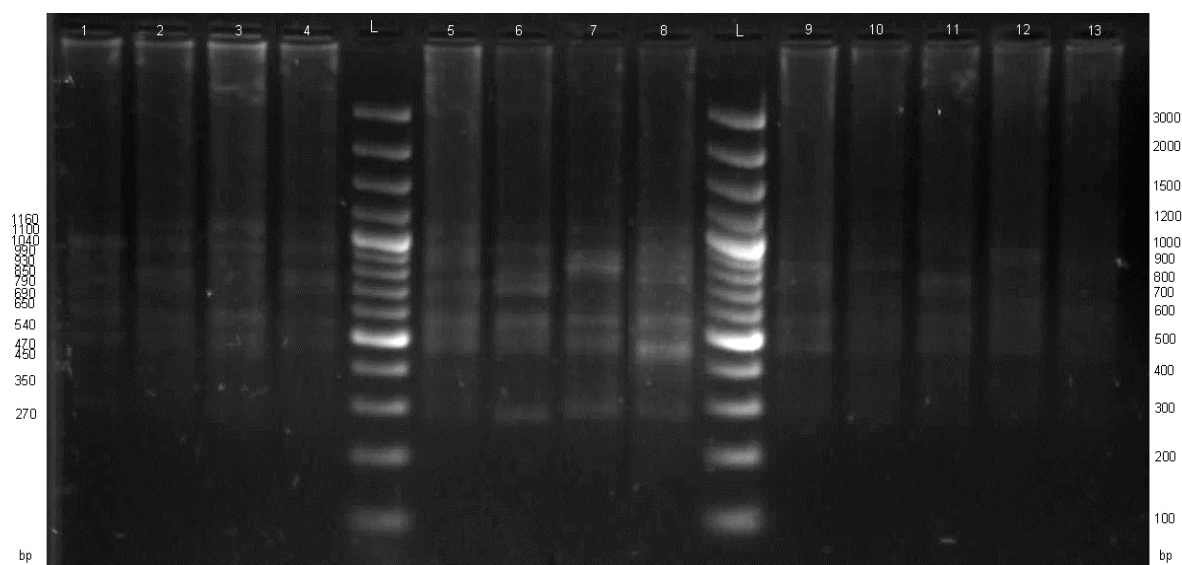


Рисунок – Электрофореграмма ISSR-продуктов для сортов голубики с праймером UBC 818
Сорта: 1 – Бонус, 2 – Элизабет, 3 – Аврора, 4 – Нельсон, 5 – Хардиблю, 6 – Конкорд, 7 – Блюджей, 8
– Патриот, 9 – Герберт, 10 – Дюк, 11 – Пуру, 12 – Торо, 13 – Шантеклер.
L – стандарт длин фрагментов (bp)

Продукты амплификации длиной 270 п.н. и 1160 п.н. являлись мономорфными для 7 сортов голубики, 1100 п. н. – для 11 сортов, 990 п. н. – для 12 сортов.

Можно отметить различия по количеству фрагментов между исследуемыми сортами Патриот – 11 фрагментов (78,6 % от общего числа), Бонус – 9 фрагментов (64,3 %), Аврора, Конкорд, Хардиблю и Блюджей – 8 фрагментов (57,1 %), Элизабет, Нельсон, Герберт и Торо – 7 фрагментов (50 %), Дюк и Пуру – 6 фрагментов (42,9 %), Шантеклер – 4 фрагмента (28,6 %).

Использованный праймер позволил получить для каждого исследуемого образца голубики воспроизводимые электрофоретические профили ISSR-фрагментов.

В результате электрофоретического разделения растений тринадцати сортов голубики было выявлено наличие уникального фрагмента для сорта Пуру. Остальные маркеры могут быть полиморфными и мономорфными относительно друг друга.

Список использованных источников

1. Власова, А.Б. Сертификация сортов голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.), районированных в Беларуси, на основе RAPD- и ISSR-маркеров / А.Б. Власова, А.Н. Юхимук, Е.В. Спиридович, В.Н. Решетников // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2010. – Т. 8, № 2. – С. 203–210.
2. Оптимизация условий культивирования голубики высокой *Vaccinium corymbosum* L. *in vitro*. Голубиководство в Беларуси: итоги и перспективы : материалы Респ. науч.-практ. конф., Минск, 17 августа 2012 г. ; редкол. : В. В. Титок [и др.]. – Минск, 2012. – 23–26 с.
3. ДНК-полиморфизм популяций хлопковой совки и картофельной минирующей моли по ISSR-маркерам: Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем : мат-лы Междунар. научн.-практ. конф. Вып. 5, Краснодар, 23–25 сентября 2008 г. ; редкол. : В.И. Киль [и др.]. – Краснодар, 2008. – 415–417 с.
4. Кавцевич В. Н. Оценка генетической разнородности линий томата на основе технологии ISSR-PCR / В. Н. Кавцевич [и др.] // Весці БДПУ. Сер. 3. – 2013. – №3. – С. 18–23.
5. Глинская Н. А. Методы работы с ДНК : метод. пособие / Н. А. Глинская [и др.]. – Пинск : ПолесГУ, 2017. – 88 с.