

УДК 631.147+631.526.3+631.527

Редакционная коллегия:

академик НАН Беларуси В.Н. Решетников (отв. редактор), д.б.н. В.В. Титок (отв. редактор), к.б.н. Е.В. Спиридович, к.б.н. Т.И. Фоменко, к.б.н. А.А. Кузовкова

Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: материалы международной научной конференции 18–20 августа 2014 г., Минск. — Минск: ГНУ «Центральный ботанический сад Академии наук Беларуси», 2014.—277 с.

В сборник вошли материалы Международной научной конференции, посвященной актуальным проблемам сохранения биоразнообразия, селекции растений с использованием биотехнологических приемов, представленные учеными Беларуси, России, Украины, Казахстана, Сербии, Литвы, Молдовы, Таджикистана и Узбекистана.

УДК 631.147+631.526.3+631.527

ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси», 2014 г.

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ
ЛИСОХВОСТА ЛУГОВОГО (*Alopecurus platensis* L.) X ЛИСОХВОСТА
ВЗДУТОГО (*Alopecurus ventricorus* Pers.)**

Р.Б. Ахмедов¹, И.П. Кондрацкая², И.Я. Нам¹, В.В. Заякин¹

1. ФГБОУ ВПО «Брянский государственный университет им. акад. И.Г. Петровского» 241036, г. Брянск, ул. Бежицкая, 14. Тел.: 8-953-288-12-64

2. ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»
220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в
e-mail: roma.akhmedov.91@mail.ru

Ключевые слова: лисохвост луговой, ISSR-PCR, ISSR-праймер, микросателлиты, электрофорез ДНК, генетический полиморфизм, паспортизация.

Введение. Среди злаковых трав основную долю в травосмеси занимают сорта райграса пастбищного, лисохвоста лугового и фестулолиума, которые характеризуются интенсивным отрастанием и высоким качеством корма с содержанием обменной энергии 11-11,5 МДж/кг сухого вещества и сырого протеина на уровне 18-20% [1]. Лисохвост вздутый обладает высокой семенной продуктивностью, но характеризуется низким качеством корма. Лисохвост луговой обладает высоким качеством корма, но семена осыпаются. Объединение хозяйственно-полезных признаков в межвидовом гибриде лисохвоста позволит сформировать сорто-популяцию с высоким качеством корма и стабильной семенной продуктивностью. Межвидовые гибриды лисохвоста были получены в отделе кормопроизводства Научно-практического центра НАН Беларуси по земледелию, с применением метода культуры изолированных тканей, оплодотворение *in vitro*, эмбриокультура [2].

Молекулярно-генетический анализ с использованием метода ISSR-PCR – один из наиболее современных и информативных подходов для определения молекулярно-генетического разнообразия и паспортизации сортов культурных растений. Основа данного метода состоит в сравнении полиморфизма длин фрагментов ДНК, находящихся между микросателлитными повторами [3].

Материалы и методы. Исследования проводились на образцах ДНК четырех сортообразцов лисохвоста лугового: Донской 2, Обский и межвидовых гибридов лисохвоста 1/5, 3/3.

Проведенный молекулярно-генетический включал следующие этапы: выделение ДНК → электрофорез геномной ДНК → спектроскопический анализ → ISSR-ПЦР → электрофорез продуктов ПЦР.

ДНК выделяли с использованием лизирующего СТАВ-буфера, денатурирующей смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24/1) и осаждающего агента – этанола (96%). Для растворения осажденной ДНК использовали деионизированную воду (50 мкл).

Выделение геномной ДНК проводили из отдельных не пророщенных зерновок лисохвоста (массой около 0,001 г) с предварительной гомогенизацией растительного материала.

Для визуализации выделенной ДНК выполняли электрофорез в 1 % агарозном геле. Концентрацию и чистоту геномной ДНК определяли методом спектроскопии в УФ-области ($\lambda=230, 260, 280$ нм) на спектрофотометре для микрообъемов NanoVue PlusTM.

В ходе анализа использовали десять ISSR-праймеров из ранее выбранных путем анализа литературных данных: IS1, IS2, IS3, IS4, IS5, IS6, UBC810, U840, HB12, B4 (Таблица 1).

Аmplификацию проводили в многоканальном программируемом термостате «Терцик» компании «ДНК-Технология» по следующей температурной схеме: 1) первичная денатурация – 94°C – 4 мин; 2) денатурация – 94°C – 35 сек – 37 циклов; 3)

отжиг* – 30 сек – 37 циклов; 4) элонгация – 72°C – 2 мин. – 37 циклов; 5) финальный синтез – 72°C – 4 мин.

После амплификации выполняли горизонтальный электрофорез продуктов реакции в 2% агарозном геле в TBE-буфере (U=120 В; t=150 мин).

Таблица 1- Характеристика использованных ISSR-праймеров

Название	Нуклеотидная последовательность	Обозначение	Температура отжига*
IS1	(AG) ₈ YG	A	58
IS2	(AC) ₈ G	B	54
IS3	(GA) ₈ C	C	54
IS4	(CA) ₈ A	D	52
IS5	(CA) ₇ RC	E	54
IS6	(AG) ₈ (Y)T	F	54
UBC810	(GA) ₈ T	I	54
U840	(GA) ₈ YT	G	56
HB12	(CAC) ₃ GC	H	40
B4	(CA) ₆ GG	U	50

Результаты и обсуждение. Для каждого сорта и/или формы получали десять образцов геномной ДНК, после чего проводили их электрофоретическое (рисунок 1) и спектроскопическое исследование.

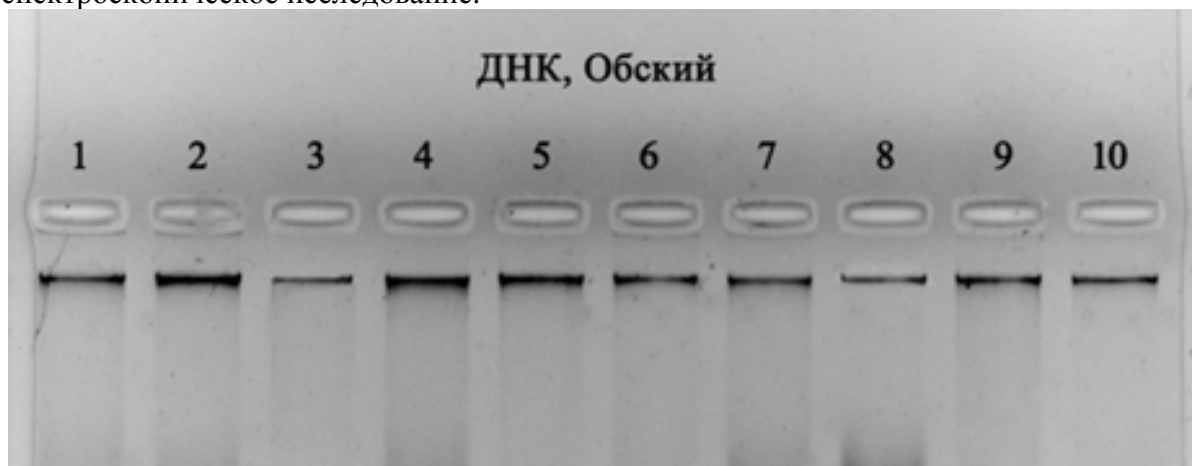


Рисунок 1- Электрофореграмма геномной ДНК в 1 % агарозном геле

Спектроскопическое исследование показало, что концентрация ДНК составляет 10-20 нг/мкл ($A(\lambda_{260})/A(\lambda_{280}) = 1,7-2$) и не требует выравнивания.

Экспериментальный подбор ISSR-праймеров проводили, используя десять образцов ДНК каждого сорта и формы. В ходе данного анализа были выбраны четыре ISSR-праймера (IS3, IS6, UBC810, B4) для проведения молекулярно-генетического анализа. В дальнейшем данные праймеры использовались для установления уровня генетического полиморфизма и паспортизации сортов и форм лисохвоста (рисунок 2, таблица 2).

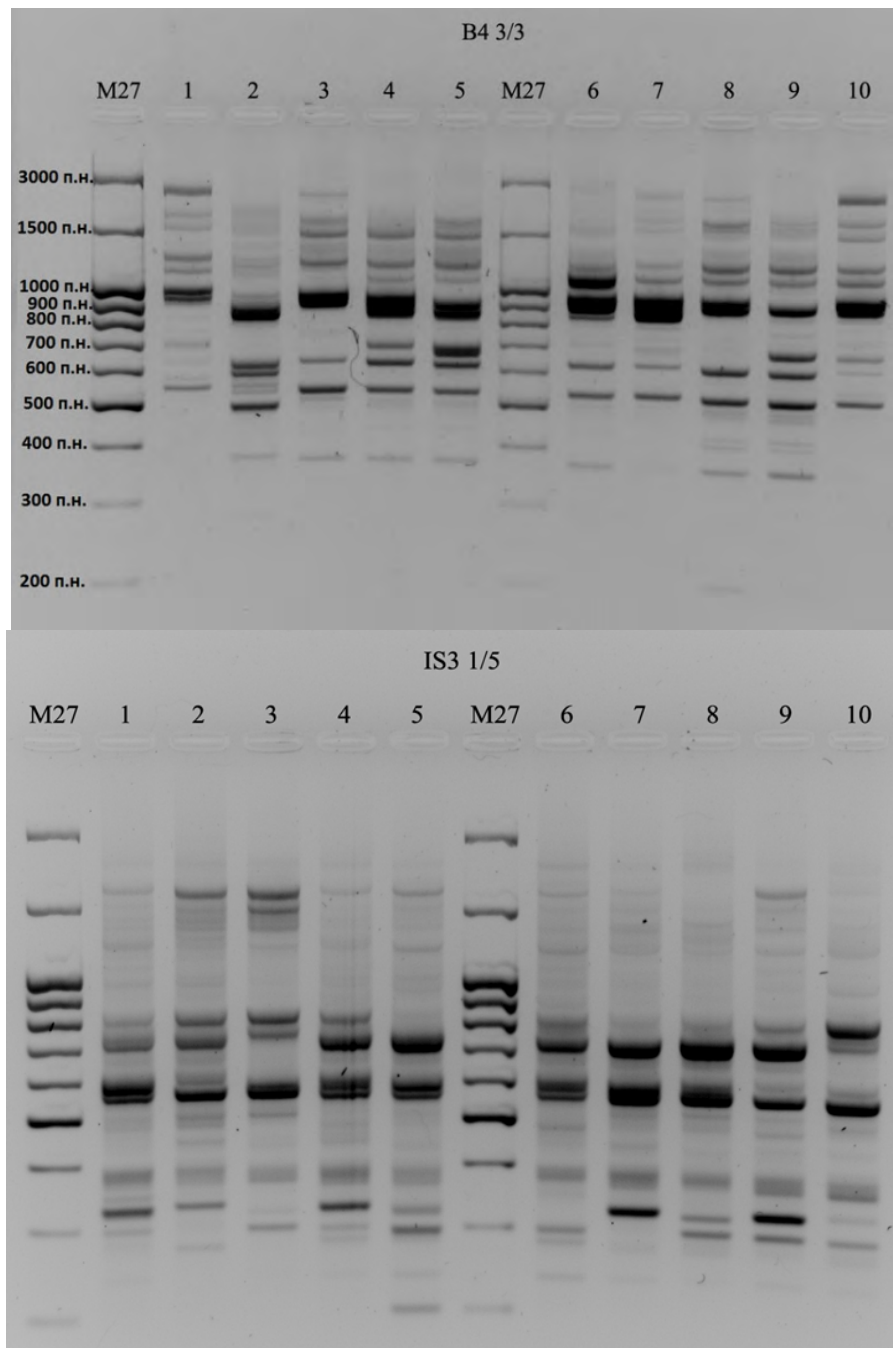


Рисунок 2 -Электрофоретические профили сортообразцов *Aporocurus pratensis*

Таблица 2 - Генетические формулы сортов лисохвоста по трем ISSR-праймаерам

Название сорто-образца	Общая формула полиморфных фрагментов **
3/3	${}^0C_{1780} {}^0C_{1505} {}^4C_{1450} {}^5C_{1400} {}^8C_{1244} {}^2C_{1113} {}^0C_{1007} {}^0C_{950} {}^2C_{917} {}^0C_{870} {}^1C_{854} {}^0C_{830} {}^{10}C_{780}$ ${}^0C_{760} {}^4C_{740} {}^6C_{705} {}^6C_{650} {}^0C_{635} {}^6C_{612} {}^0C_{580} {}^{10}C_{555} {}^0C_{550} {}^0C_{530} {}^7C_{513} {}^1C_{490} {}^2C_{450} {}^8C_{390}$ ${}^{10}C_{373} {}^2C_{359} {}^0C_{345} {}^2C_{336} {}^0C_{328} {}^1C_{305} {}^0C_{290} {}^0C_{287} {}^5C_{277} {}^1C_{232} {}^0C_{202} {}^5U_{2500} {}^5U_{1750} {}^0U_{1584}$ ${}^5U_{1430} {}^0U_{1275} {}^{10}U_{1200} {}^0U_{1170} {}^8U_{1090} {}^0U_{1000} {}^8U_{960} {}^8U_{920} {}^5U_{880} {}^1U_{849} {}^0U_{800} {}^0U_{747} {}^4U_{706}$ ${}^3U_{676} {}^7U_{640} {}^3U_{620} {}^1U_{592} {}^2U_{551} {}^9U_{540} {}^1U_{500} {}^0U_{490} {}^0U_{470} {}^3U_{440} {}^2U_{432} {}^0U_{416} {}^7U_{377} {}^0U_{347}$ ${}^0U_{320} {}^0U_{270} {}^0U_{230} {}^1U_{195} {}^2I_{2050} {}^0I_{1890} {}^6I_{1550} {}^2I_{1400} {}^3I_{1250} {}^1I_{1160} {}^8I_{1120} {}^9I_{1050} {}^1I_{1010} {}^0I_{985}$ ${}^{10}I_{930} {}^0I_{880} {}^0I_{850} {}^6I_{830} {}^2I_{785} {}^1I_{750} {}^0I_{705} {}^0I_{680} {}^5I_{660} {}^2I_{625} {}^0I_{600} {}^6I_{585} {}^0I_{552} {}^4I_{520} {}^0I_{500} {}^3I_{480}$ ${}^0I_{380} {}^2I_{331} {}^0I_{275} {}^0I_{238}$
1/5	${}^8C_{1780} {}^1C_{1505} {}^0C_{1450} {}^2C_{1400} {}^8C_{1244} {}^0C_{1113} {}^2C_{1007} {}^0C_{950} {}^0C_{917} {}^0C_{870} {}^0C_{854} {}^0C_{830} {}^8C_{780}$ ${}^0C_{760} {}^2C_{740} {}^8C_{705} {}^0C_{650} {}^0C_{635} {}^3C_{612} {}^7C_{580} {}^{10}C_{555} {}^0C_{550} {}^0C_{530} {}^0C_{513} {}^0C_{490} {}^0C_{450} {}^{10}C_{390}$ ${}^0C_{373} {}^0C_{359} {}^0C_{345} {}^5C_{336} {}^3C_{328} {}^8C_{305} {}^0C_{290} {}^2C_{287} {}^1C_{277} {}^6C_{232} {}^1C_{202} {}^5U_{2500} {}^0U_{1750} {}^8U_{1584}$ ${}^3U_{1430} {}^6U_{1275} {}^{10}U_{1200} {}^0U_{1170} {}^0U_{1090} {}^0U_{1000} {}^3U_{960} {}^6U_{920} {}^0U_{880} {}^6U_{849} {}^3U_{800} {}^1U_{747} {}^0U_{706}$ ${}^3U_{676} {}^{10}U_{640} {}^9U_{620} {}^4U_{592} {}^4U_{551} {}^{10}U_{540} {}^7U_{500} {}^0U_{490} {}^0U_{470} {}^7U_{440} {}^4U_{432} {}^3U_{416} {}^9U_{377} {}^1U_{347}$ ${}^0U_{320} {}^0U_{270} {}^0U_{230} {}^4U_{195} {}^0I_{2050} {}^0I_{1890} {}^0I_{1550} {}^3I_{1400} {}^1I_{1250} {}^7I_{1160} {}^2I_{1120} {}^6I_{1050} {}^1I_{1010} {}^5I_{985}$ ${}^0I_{930} {}^0I_{880} {}^0I_{850} {}^5I_{830} {}^0I_{785} {}^4I_{750} {}^0I_{705} {}^0I_{680} {}^7I_{660} {}^5I_{625} {}^5I_{600} {}^0I_{585} {}^8I_{552} {}^1I_{520} {}^0I_{500} {}^{10}I_{480}$ ${}^5I_{380} {}^1I_{331} {}^0I_{275} {}^0I_{238}$
Донской 2	${}^3C_{1780} {}^0C_{1505} {}^0C_{1450} {}^0C_{1400} {}^0C_{1244} {}^0C_{1113} {}^1C_{1007} {}^4C_{950} {}^1C_{917} {}^2C_{870} {}^0C_{854} {}^3C_{830} {}^6C_{780}$ ${}^3C_{760} {}^1C_{740} {}^0C_{705} {}^3C_{650} {}^3C_{635} {}^3C_{612} {}^3C_{580} {}^9C_{555} {}^0C_{550} {}^0C_{530} {}^{10}C_{513} {}^4C_{490} {}^3C_{450} {}^6C_{390}$ ${}^6C_{373} {}^3C_{359} {}^5C_{345} {}^6C_{336} {}^0C_{328} {}^4C_{305} {}^0C_{290} {}^0C_{287} {}^5C_{277} {}^5C_{232} {}^1C_{202} {}^1U_{2500} {}^4U_{1750} {}^2U_{1584}$ ${}^4U_{1430} {}^3U_{1275} {}^2U_{1200} {}^7U_{1170} {}^2U_{1090} {}^5U_{1000} {}^1U_{960} {}^3U_{920} {}^0U_{880} {}^3U_{849} {}^4U_{800} {}^6U_{747} {}^2U_{706}$ ${}^0U_{676} {}^6U_{640} {}^4U_{620} {}^7U_{592} {}^8U_{551} {}^9U_{540} {}^0U_{500} {}^0U_{490} {}^0U_{470} {}^4U_{440} {}^9U_{432} {}^8U_{416} {}^7U_{377} {}^5U_{347}$ ${}^0U_{320} {}^0U_{270} {}^3U_{230} {}^1U_{195} {}^0I_{2050} {}^2I_{1890} {}^5I_{1550} {}^7I_{1400} {}^2I_{1250} {}^4I_{1160} {}^8I_{1120} {}^5I_{1050} {}^0I_{1010} {}^7I_{985}$ ${}^4I_{930} {}^0I_{880} {}^0I_{850} {}^6I_{830} {}^1I_{785} {}^2I_{750} {}^0I_{705} {}^1I_{680} {}^8I_{660} {}^3I_{625} {}^6I_{600} {}^3I_{585} {}^2I_{552} {}^3I_{520} {}^0I_{500} {}^5I_{480} {}^5I_{380}$ ${}^1I_{331} {}^0I_{275} {}^0I_{238}$
Обский	${}^0C_{1780} {}^0C_{1505} {}^0C_{1450} {}^2C_{1400} {}^2C_{1244} {}^0C_{1113} {}^0C_{1007} {}^0C_{950} {}^5C_{917} {}^0C_{870} {}^7C_{854} {}^0C_{830} {}^4C_{780}$ ${}^0C_{760} {}^5C_{740} {}^1C_{705} {}^0C_{650} {}^2C_{635} {}^8C_{612} {}^1C_{580} {}^7C_{555} {}^2C_{550} {}^1C_{530} {}^4C_{513} {}^2C_{490} {}^6C_{450} {}^{10}C_{390}$ ${}^5C_{373} {}^1C_{359} {}^1C_{345} {}^7C_{336} {}^0C_{328} {}^0C_{305} {}^2C_{290} {}^2C_{287} {}^10C_{277} {}^3C_{232} {}^2C_{202} {}^0U_{2500} {}^3U_{1750} {}^5U_{1584}$ ${}^1U_{1430} {}^0U_{1275} {}^0U_{1200} {}^8U_{1170} {}^1U_{1090} {}^0U_{1000} {}^2U_{960} {}^1U_{920} {}^9U_{880} {}^5U_{849} {}^5U_{800} {}^2U_{747} {}^4U_{706}$ ${}^0U_{676} {}^4U_{640} {}^3U_{620} {}^6U_{592} {}^4U_{551} {}^1U_{540} {}^8U_{500} {}^6U_{490} {}^2U_{470} {}^0U_{440} {}^8U_{432} {}^2U_{416} {}^6U_{377} {}^{10}U_{347}$ ${}^3U_{320} {}^2U_{270} {}^0U_{230} {}^5U_{195} {}^0I_{2050} {}^0I_{1890} {}^3I_{1550} {}^1I_{1400} {}^0I_{1250} {}^4I_{1160} {}^5I_{1120} {}^1I_{1050} {}^0I_{1010} {}^7I_{985}$ ${}^3I_{930} {}^1I_{880} {}^3I_{850} {}^9I_{830} {}^2I_{785} {}^1I_{750} {}^2I_{705} {}^6I_{680} {}^3I_{660} {}^8I_{625} {}^5I_{600} {}^1I_{585} {}^1I_{552} {}^2I_{520} {}^2I_{500} {}^6I_{480} {}^5I_{380}$ ${}^4I_{331} {}^1I_{275} {}^3I_{238}$

** встречаемость фрагмента данной длины (от 0 до 10) ← ${}^4C_{555}$ → длина полиморфного фрагмента

Выводы. В ходе исследования выбраны четыре ISSR-праймаера (IS3, IS6, UBC810, B4) для проведения молекулярно-генетического анализа. Данные праймеры могут применяться для установления уровня генетического полиморфизма и паспортизации сортов лисохвоста.

По данным ISSR-праймаерам установлен уровень внутривидового молекулярно-генетического разнообразия четырех сортообразцов *Alopecurus pratensis*. Полученные данные о геномном полиморфизме исследуемых сортов и форм использованы для паспортизации, и могут быть применены в дальнейшем селекционном процессе.

Литература

1. Васько П.П. Продуктивность многолетних злаковых трав и пути ее повышения // Земледелие и растениеводство : Научные труды / Белорусский научно-исследовательский институт земледелия и кормов. - Минск, 2000. - Вып.37. - С. 113-119.

2. Шишлова А.М.Создание дигамплоидов зерновых культур и их использование в селекции / М. П. Шишлов и др // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. - 2007. - № 2. - С. 49-58.

3. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013 г. Том 17. № 4/2. с 1044-1054.