

ЛИТЕРАТУРА

1. Никонович, Т. В., Дыдышко, Н. В. Оценка исходного материала перца острого для создания гибридов в органическом земледелии / Н. В. Никонович, Н. В. Дыдышко // Материалы 17-й. межд. конф. «Экологические проблемы 21 века». Ч. 1. – Минск, 2017. – С. 56.
2. Никонович, Т. В. Органическое земледелие – перспективы развития / Т. В. Никонович, Н. В. Дыдышко, С. Л. Василькова // Материалы науч.-практ. конф. «Технологические аспекты возделывания сельскохозяйственных культур». – Горки, 2018. – С. 175.
3. Мульчирование перца [Электронный ресурс]. – 2018. URL: <http://superda4nik.ru/mulchirovanie-solomoj/> (дата обращения: 12.02.2018).

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА У СОРТОВ ВИНОГРАДА, ИСПОЛЬЗУЯ МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКИРОВАНИЯ IDENTIFICATION OF GENETIC POLYMORPHISMS IN GRAPE VARIETIES USING MOLECULAR MARKING

**Т. В. Никонович¹, П. Ю. Колмаков²,
И. Ю. Зайцева¹, А. Ю. Леонов², Г. Г. Пурханов²
T. Nikanovich¹, P. Kolmakov², I. Zaitseva¹, A. Leonov², G. Pirhanov²**

¹Белорусская государственная сельскохозяйственная академия,
г. Горки, Республика Беларусь

²Витебский государственный университет им. П. М. Машерова,
г. Витебск, Республика Беларусь
tvnikonovich@gmail.com

Belarusian State Agricultural Academy, Gorky, Republic of Belarus
Vitebsk State University named after P. M. Masherov, Vitebsk, Republic of Belarus

Представлена методика выявления генетического полиморфизма у растений-регенерантов винограда, полученных в условиях *in vitro*.

In the article the technique of revealing genetic polymorphism in plants-regenerants of grapes obtained in *in vitro* conditions is presented.

Ключевые слова: виноград, ДНК, молекулярные методы, RAPD маркирование, амплификация.

Keywords: grapes, DNA, molecular methods, RAPD marking, amplification.

Исследования выполнялись по проекту «Оценка морфогенеза и функционального состояния ферментов RedOx-системы винограда в культуре *in vitro* и *ex vitro* при различном светодиодном освещении» по договору с БРФФИ № Б17-155 от 18.04.2017 г.

RAPD-техника – это амплификация случайно, или неспецифически выбранных полиморфных участков ДНК. При наличии в геноме комплементарных сайтов, праймер находит их и, соответственно, образуется ПЦР-продукт. Метод RAPD причисляют к технике ДНК-фингера (пальцевого отпечатка), благодаря уникальной информации, которую получают при RAPD-маркировании индивидуальных геномов.

В ходе праймирования происходит ассоциация коротких олигонуклеотидов (RAPD-праймеров) с несколькими сайтами матричной ДНК, распределенных по всему геному. При RAPD-ПЦР каждый образец ДНК, в зависимости от праймера, дает 3–10 и более фрагментов, или полос на электрофореграмме, формирующий RAPD-профиль, или RAPD-паттерн. Определение внутривидового таксона путем сравнения RAPD-профилей образцов называется RAPD-диагностикой. ДНК-фингерпринт – это уникальный для данного индивида набор переменных полос электрофореграммы, получаемый молекулярным маркированием.

При естественном отборе определение генетической гетерогенности биоматериала происходит путем сравнения ДНК-фингера, по наличию постоянных полос с плавным изменением их наличия в некоторой статистически достоверной выборке, характеризующейся непрерывной изменчивостью. Здесь нет естественных классов. Их нужно отметить произвольно. В данных условиях пригодны статистические методы анализа, позволяющие разбить выборку на группы, отражающие внутривидовую изменчивость, либо межвидовую. Данный факт является признаком естественного отбора, отраженный в выборке и RAPD-профилей.

Искусственный отбор принципиально отличается от естественного отбора и характеризуется прерывной или дискретной вариацией. Группы RAPD-профилей, можно наметить произвольно. Определенный сорт, генетически однородный, характеризуется всего лишь одним типом RAPD-профиля с четко конкретными повторяющимися

полосами. Генетически неоднородные сорта характеризуются несколькими четко различимыми группами RAPD-паттернов. В таких условиях группировка данных может быть качественной и количественной.

В результате научных экспериментов была разработана методика выделения тотальной ДНК из живого материала образцов винограда на основе фенольного метода экстракции ДНК.

Протокол экстракции включает следующие стадии:

1. Навеску растительного материала растереть в ступке с оксидом алюминия до состояния гомогената. Прилить в ступку 500 мкл экстракционного буфера. Аккуратно перелить экстракт в микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл. Перемешать на вортексе.

2. Поместить микроцентрифужные пробирки в термостат на 30–40 мин при температуре 40 °С. Перемешивать на вортексе каждые 10 мин.

3. Поместить образцы в ледяную баню.

4. Прилить к образцам 500 мкл фенол-хлороформа (1:1), перемешать на вортексе 2–3 мин или энергичными встряхиваниями рукой. Центрифугировать 10 мин при 10000 об/мин. Отобрать верхнюю фазу в новую пробирку.

5. Прилить 500 мкл хлороформ-изоамилового спирта (1:24). Интенсивно перемешать переворачиванием 2–3 мин. Центрифугировать 10 мин при 10000 об/мин. Отобрать верхнюю фазу.

6. Прилить двойной объем 96 % этилового спирта. Центрифугировать 5 минут на 6000 об/мин.

7. Слить надосадочную жидкость. Прилить 500 мкл 70 % этилового спирта. Перемешать на вортексе. Центрифугировать 5 мин на 6000 об/мин.

8. Слить надосадочную жидкость. Высушить ДНК в термостате при 30 °С.

9. Растворить осадок тотальной ДНК в ТЕ буфере. Перемешать на вортексе.

Для того, чтобы получить RAPD паттерны, нужно полученный материал очистить от примесей РНК. Для этого использовать рабочий раствор РНК-азы из расчета на 100 мкл тотальной ДНК – 1 мкл РНК-азы. После очистки тотальную ДНК необходимо очистить хлороформ-изоамиловым спиртом (1:24) и спиртом. Материал растворить в ТЕ-буфере и сохранять при – 20 °С.

Для оценки чистоты препарата ДНК, свободного от РНК, проводят измерения оптической плотности раствора при длинах волн 260, 280 и 235 нм, то есть на максимумах поглощения растворов ДНК, белков и полисахаридов, соответственно.

Проверка того, что тотальная ДНК выделена из биоматериала, а также проверка ее чистоты может быть проведена при помощи электрофореза.

Для приготовления мастермикса следует использовать концентрацию тотальной ДНК образцов 5 нг/мкл, что нами было определено экспериментальным путем.

Одной из основных особенностей проведения электрофореза – это разгонка ампликонов вначале на 80V в течение пяти минут для того, чтобы ампликоны надежно внедрились в агарозный гель, затем разгонять ампликоны в течение 5 – 6 часов на 40 V. Это делается для того, чтобы RAPD профили качественно разошлись и получилась лестница из определенного количества полос разной молекулярной массы и яркости, пригодных для статистического анализа.

В эксперименте был использован материал растений-регенерантов винограда сортов Маркетт и Маршал Фош, которые культивировались на искусственных питательных средах под различными спектрами освещения. RAPD метод анализа показал, что растения сорта Маркетт являются генетически однородными. Все полученные паттерны идентичны по основным полосам. Растения сорта винограда Маршал Фош генетически гетерогенны и выделилось две генетические группы. Между ними не выявлено переходных форм по всему объему выборки. Существуют только четко выделенные группы, что характерно для культурных сортов, выведенных искусственным методом отбора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никонович, Т. В. Особенности экстракции ДНК из растений винограда, культивируемых в условиях *in vitro* при различном светодиодном освещении / Т. В. Никонович, П. Ю. Колмаков, И. Е. Зайцева и др. // Международный симпозиум по геномике, приуроченному к Году Науки в Республике Беларусь: тез. докл. – Минск, 2017. – С. 146–147.

2. Великов, В. А. Молекулярная биология. Практическое руководство / В. А. Великов. – Саратов, 2013. – 84 с.

3. Юрченко, Е. О. Основы молекулярного маркирования грибной ДНК. Практическое руководство / Е. О. Юрченко, М. Г. Синявская. – Минск: Право и экономика, 2007. – 101 с.