

О.Ю. Баранов, старший науч. сотрудник ИЛ НАН Беларуси

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕСТРИКЦИОННОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *BETULA L.*

Presents an RFLP study of genus *Betula L.* It was investigated combinations of six restriction endonucleases and four labeling probes. Showed absence of *RoIB* gene in *Betula*.

В настоящее время область применения ДНК-маркеров в генетических и селекционных исследованиях весьма значительна: типировка хозяйственно ценных особей и генотипов, включая получение и анализ трансгенных растений; выявление и типировка вирусных, бактериальных и грибных инфекций; построение генетических карт; исследование генетической структуры популяций и ее динамики; анализ филогенетических взаимоотношений видов; изучение уровня генетического разнообразия видов и др. [1].

Одним из первых появившихся методов анализа ДНК является полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ), или RFLP. Данная технология основана на изучении изменчивости размера определенных ДНК фрагментов, образовавшихся вследствие расщепления ДНК рестрикционными ферментами [2]. Разница в RFLP-спектре, выявляемая между двумя организмами, является следствием либо точковой мутации (образование или нарушение сайта рестрикции) – отсутствие/наличие фракции, либо реорганизации областей ДНК между рестрикционными сайтами (делеция или вставка) – изменение длины фрагмента.

На начальном этапе разработки данного метода исследователи просто сравнивали электрофоретические спектры рестриктов изучаемых образцов [3], представленные большим числом фракций, что являлось достаточно трудоемкой процедурой. В ходе усовершенствования RFLP-анализа технология была дополнена последующей гибридизацией рестриктов с меченой пробой [1]. Проба является специфичной для выявления одного локуса (RFLP: sigle-locus probe) – геномные, кДНК, мтДНК, хлДНК библиотеки или нескольких локусов (RFLP: multi-locus probe) – тандемные повторы (микро- и минисателлиты), короткие последовательности (DNA fingerprinting) [1].

RFLP-анализ обладает рядом преимуществ перед другими ДНК-маркерами:

- высокая воспроизводимость;
- кодоминантный характер наследования; возможность использования как на видовом и популяционном уровне (RFLP: single-locus probe), так и на уровне индивида (RFLP: multi-locus probe);

– технологичность – после оптимизации сочетания рестриктаза – проба, метод можно использовать для анализа и других видов.

К настоящему времени использование RFLP-маркеров позволило решить фундаментальные и прикладные задачи, связанные с изучением генофондов различных растительных видов, включая оценку интенсивности обмена генетическим материалом между популяциями, анализ межвидовой гибридизации, построение генетических карт, исследование уровня генетического разнообразия и др. [1]. Что же касается представителей рода *Betula*, то молекулярно-генетические исследования берез только начинают разворачиваться, и имеющиеся данные носят отрывочный характер.

Исходя из всего вышесказанного, целью исследований являлась разработка методических основ RFLP-анализа березы повислой. Работа проводилась по следующим программным вопросам: разработка методики выделения ДНК из различных тканей березы повислой; оптимизация условий проведения рестрикции препаратов ДНК березы повислой; оптимизация условий электрофоретического фракционирования, переноса рестриктов на мембрану и гибридизации с меченой пробой; описание выявляемых RFLP-спектров.

В целом в ходе исследований были изучены комбинации 6 рестриктаз: *EcoRI*, *Sall*, *HindIII*, *AluI*, *KpnI*, *SacI*, и 4 меченных проб: *Oligo1*⁵⁰⁴, *Oligo11*¹¹⁰⁰, *Bp04*¹⁵², *RoIB*. Данные о выявляемых зонах представлены в таблице. Следует отметить, что образцы ДНК для приготовления проб получали с помощью полимеразной цепной реакции [4]. В ходе работы были использованы амплифицированные RAPD-фрагменты березы карельской *Oligo1*⁵⁰⁴ (размер 504 п. н.), *Oligo11*¹¹⁰⁰ (1100 п. н.), микросателлитный локус *Bp04* (152 п. н.) и фрагмент гена *RoIB* из *Agrobacterium rhizogenes*, отвечающий за корнеобразование у трансформированных растений. Интерес к последнему локусу был вызван публикацией Сузуки с соавт. [5], в которой описывается встройка части агробактериального генома в ходе эволюции к представителям рода *Nicotiana* (Табак). Таким образом, данный локус был использован для выявления наличия горизонтального переноса генов между агробактериями и *Betula*.

RFLP спектры, выявленные в ходе изучения березы повислой

Проба Рестриктаза	OligoI(504)	OligoII(1100)	Вр04(152)	RolB
EcoRI	3 зоны (120, 210, 280 п. н.)	1 зона (1300 п. н.)	1 зона (420 п. н.)	отсутствие гибридизации
HindIII	1 зона (940 п. н.)	3 зоны (380, 390, 400 п. н.)	1 зона (370 п. н.)	отсутствие гибридизации
Sall	1 зона (680 п. н.) 2 зоны (270, 410 п. н.)	1 зона (2460 п. н.)	1 зона (230 п. н.)	отсутствие гибридизации
KpnI	1 зона (690 п. н.)	2 зоны (670, 1050 п. н.)	1 зона (180 п. н.)	отсутствие гибридизации
SacI	1 зона (1310 п. н.)	1 зона (1710 п. н.)	1 зона (410 п. н.)	отсутствие гибридизации
AluI	2 зоны (530, 710 п. н.)	1 зона (2320 п. н.)	1 зона (350 п. н.)	отсутствие гибридизации

В результате проведенных исследований разработаны методические основы RFLP-анализа применительно к березе повислой. Выявленные в ходе изучения RFLP-маркеры будут использованы в дальнейших молекулярно-генетических исследованиях представителей рода *Betula*.

Литература

1. Ford-Lloyd B., Painting K. Measuring genetic variation using molecular markers. – Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. – 72 p.
2. Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E.F. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. – Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989. – 321 p.
3. Глазко В.И., Созинов И.А. Генетика изоферментов животных и растений / Под ред. А.А. Созинова. – Киев: Урожай, 1993. – 528 с.
4. Newton CR, Graham A PCR (Introduction to Biotechniques Series). – Springer Verlag: New York, 1997. – 211 p.
5. Suzuki K., Yamashita I., Tanaka N. Tobacco plants were transformed by *Agrobacterium rhizogenes* infection during their evolution // Plant Journal. – 2002. – V. 32. – P. 775 – 785.