

## Раздел 5. МЕТОДИКИ

---

УДК 634.11:631.526.32:577.151.4.088.3:543.545.2

### МЕТОДИКА ИДЕНТИФИКАЦИИ СОРТОВ ЯБЛОНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕЛКОВЫХ МАРКЕРОВ\*

**Е.Н. Бирюк, З.А. Козловская**

РУП «Институт плодородства»,

ул. Ковалева, 2, пос. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,

e-mail: belhort@it.org.by

#### РЕФЕРАТ

Разработана методика идентификации сортов яблони с использованием изоферментной системы пероксидазы. Высокополиморфные спектры пероксидазы позволили идентифицировать 83 сортообразца яблони из 112.

Возможность использования вегетативных органов для анализа позволяет сократить время на изучение исходного материала на 5-8 лет в зависимости от длины ювенильного периода конкретных образцов яблони.

Маркирование сортового материала обеспечивает контроль за его однородностью и стандартностью при закладке маточных насаждений, сортовой прочистке садов и при реализации посадочного материала.

Идентификация и паспортизация сортов и ценных форм плодовых культур расширяет возможности системы защиты авторских прав селекционеров.

Методика может использоваться в научных учреждениях по плодородству, высших учебных заведениях аграрного и биологического профилей, системах государственного сортоиспытания и семеноводства для идентификации сортов и защиты авторских прав селекционеров.

Ключевые слова: яблоня, сортоидентификация, белковые маркеры, пероксидаза, электрофорез, Беларусь.

#### ВВЕДЕНИЕ

Идентификация видов и сортов растений представляет собой большую значимость как в практической работе селекционера, так и в решении вопросов фундаментальной науки. Она необходима для точного определения сортовой и видовой принадлежности растения, а также для документации генофонда культурных растений и их диких сородичей в целях учета, сохранения и эффективного использования в селекции, в т.ч. для селекции на устойчивость к инфекционным заболеваниям. Идентификация необходима в селекционном процессе для выявления и выделения желаемых генотипов из сложных естественных сортовых и гибридных популяций. Особенно актуальна идентификация сортов в связи с интенсификацией селекционного процесса.

---

\*Рекомендована к публикации Ученым советом РУП «Институт плодородства», протокол № 5 от 04.06.2010 г.

До недавнего времени идентификация сортового генофонда плодовых проводилась по морфологическим признакам и биохимической оценке плодов. Актуальной проблемой современного плодоводства являются поиск надежных методов тестирования сортов, оценка и отбор ценных генотипов, установление их подлинности и оригинальности. Одним из таких способов является метод белковых маркеров, среди которых для плодовых культур эффективны многокомпонентные и генетически полиморфные ферментные системы [1, 2].

Генетические маркеры играют исключительно важную роль в оценке наследственной конституции организма и являются одним из главных вспомогательных средств селекции. Они дают возможность более точно идентифицировать генные локусы и таким образом позволяют в генетическом анализе избежать проблем, связанных с влиянием других локусов. Наиболее полная информация, заключенная в генетических системах, выражена в белках как первичных продуктах экспрессии гена. Благодаря этому, белковые маркеры дают возможность выявлять недоступные визуальному анализу мелкие мутации, которые более важны для селекции, чем мутации большого эффекта [3, 4, 5].

В настоящее время идентификация сортов по белковым маркерам широко используется для различных сельскохозяйственных культур [6, 7, 8, 9, 10-15]. Так, наиболее удобными и надежными в сортовой идентификации злаковых культур являются запасные белки. Они множественны, наиболее полиморфны и локализованы в морфологически однородных тканях – эндосперме и семядолях зрелого растения.

Проблема белковых маркеров у таких сложных гетерозиготных культур как плодовые может быть отнесена к новым разделам биологии плодовых, развивающихся на стыке генетики, биохимии, физиологии и селекции. В настоящее время показана перспективность использования белкового полиморфизма у плодовых для решения задач прикладного характера: уточнение происхождения видов и сортов, установления гибридности, выявления связи отдельных маркеров с хозяйственно ценными признаками [1, 16, 17].

В литературе имеются данные о возможности использования запасных белков семян для отбора и анализа перспективных форм облепихи [18]. По данным Т.В. Арсеньевой, в запасных белках семян красной смородины преобладает глобулиновая фракция [19].

Однако следует отметить, что запасные белки семян могут быть использованы только тогда, когда растение вступает в фазу плодоношения, в то время как актуальными проблемами остаются оценка исходного и селекционного материала. В данном случае наиболее пригодными являются белки вегетативных органов, в том числе изоферментные системы [20-24, 12].

Самое большое количество исследований полиморфизма ферментов на плодовых культурах было выполнено с целью характеристики сортовых особенностей в пределах вида. Изоферменты использовали для характеристики сортов персика, черешни, миндаля, вишни. На плодовых культурах сортовую характеристику по ферментам часто объединяют с анализом родословных [25].

Белковая идентификация растений нашла применение в качестве дополнительного инструмента к морфологическим признакам в решении проблемы паспортизации культурных растений.

Таким образом, большое число полиморфных изоферментных систем у растений, простота их выявления по продуктам энзиматических реакций, возможность использования вегетативных органов для анализа обеспечивают их широкое применение в качестве маркеров многолетних, в частности, плодовых культур.

## 1. ПОДГОТОВКА ПРОБ

### 1.1. Оборудование и реактивы

**Оборудование:** центрифуга с охлаждением до +4°C (до 8000 об/мин), спектрофотометр СФ-103 или аналог, морозильная камера (до -18°C), пипетки автоматические одноканальные переменного объема (2-20 мкл, 20-100 мкл, 200-1000 мкл, 0,2-1,0 мл, 0,5-5,0 мл), фарфоровые ступки с пестиком, чистый кварцевый песок или толченое стекло, микропробирки Eppendorf, стеклянные стаканы, цилиндры, стеклянные пробирки (20 мл).

**Реактивы:** для экстракции легкорастворимых белков – трис(гидроксиметил)аминометан (о.с.ч.), кислота соляная концентрированная (х.ч.), сахараза (ч.д.а), этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА Na) (ч.д.а), 2-меркаптоэтанол (ч.д.а), аскорбиновая кислота (х.ч.), вода дистиллированная; для количественного определения белка – кумасси R-250 (х.ч.), кислота ортофосфорная концентрированная (ч.д.а.), спирт этиловый 96%-ный, вода дистиллированная, бычий сывороточный альбумин (БСА) (ч.д.а).

### 1.2. Отбор проб и выделение белкового экстракта

Для исследований отбирают листья яблони со здоровых растений: с различных частей кроны, со средней части побега в количестве 10-20 штук.

Выделение белков из растительной ткани основано на способности соответствующих буферов экстрагировать белок из гомогенизируемых тканей, обеспечивая одновременно защиту от действия протеолитических и окислительных ферментов, сохранение нативной структуры белковых молекул.

Подготовка исходного белкового образца для анализа складывается из этапов приготовления репрезентативной навески, гомогенизации ее в присутствии защитного экстрагирующего буфера, экстракции белков, осаждения механических частиц центрифугированием. Кроме того, необходимо количественно определять содержание белков в экстракте и выравнять количество общего белка в отдельных пробах.

Свежий растительный материал в количестве 0,5 г растирают на холоде в фарфоровой ступке в 5 мл 0,05 М трис-HCL буфера (рН 6,7), содержащего защитные добавки (сахараза – 10%, ЭДТА Na – 0,2%, 2-меркаптоэтанол – 0,05%, аскорбиновая кислота – 0,1%). Затем экстракционную смесь центрифугируют 30 мин при +4°C и 8000 об/мин.

Для приготовления 100 мл раствора для экстракции к 25 мл 0,05 М трис-HCL буфера (рН 6,7) добавляют 10 г сахаразы, 200 мг ЭДТА Na, 50 мкл 2-меркаптоэтанола, 100 мг аскорбиновой кислоты, все тщательно перемешивают и доводят раствор до 100 мл дистиллированной водой.

Полученный супернатант отделяют от осадка и используют для электрофоретического разделения. Для того чтобы все образцы содержали одинаковое количество белка, предварительно проводят определение общего содержания белка по методу Брэдфорда [22].

Белковые образцы хранят при температуре -18...-20°C в течение 3-4 месяцев. Повторное замораживание и размораживание не допускается. Для повторных опытов используют дробное разливание образцов малыми порциями (по 100-200 мкл) по не-

скольким пробиркам Eppendorf. Непосредственно перед использованием, за 30 минут до анализа, образцы ставят на размораживание (при комнатной температуре).

### 1.3. Количественное определение белка

Для определения содержания белка в анализируемых экстрактах используют метод Брэдфорда. К 100 мкл исследуемого образца добавляют 5 мл раствора красителя, тщательно перемешивают и через 10 минут определяют экстинкцию поглощения ( $\lambda=595$  нм) против контрольного раствора (100 мкл соответствующего буфера + 5 мл красителя).

Раствор красителя готовят следующим образом: 100 мг кумасси бриллиантового голубого G-250 (Serva) растворяют в 50 мл этанола (96%), добавляют 100 мл фосфорной кислоты (85%), доводят до 1 л дистиллированной водой, перемешивают и фильтруют. Раствор красителя хранят не более 2 недель. Концентрацию белка в образце рассчитывают с помощью калибровочной кривой, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

Для каждого нового раствора красителя строят новую калибровочную кривую.

## 2. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВОГО ЭКСТРАКТА

### 2.1. Оборудование и реактивы

Легкорастворимые белки листьев анализируют методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в щелочной буферной системе. Для разделения белковых компонентов используют 7%-ный ПААГ.

Оборудование: комплект прибора для вертикального электрофореза в ПААГ фирмы Hoefer (США) или аналогичный другого производства, источник питания фирмы Hoefer (США) или аналогичный другого производства, блок для автоматического окрашивания гелей фирмы Amersham pharmacia biotech (США).

Реактивы:

для приготовления гелей – акриламид (АА) (х.ч.), N,N-метиленбисакриламид (МБА) (х.ч.), N,N,N',N'-тетраэтилметилендиамин (ТЕМЕД) (х.ч.), персульфат аммония (ч.д.а), кислота соляная концентрированная (х.ч), трис(гидроксиэтил)аминометан (Трис) (о.с.ч.), вода дистиллированная;

для окраски и фиксирования гелей – глицин (о.с.ч.), ледяная уксусная кислота (х.ч.), ацетат натрия (кристаллогидрат) (ч.д.а.), перекись водорода (ч), бензидин основание (ч.д.а.), глицерин (ч), этанол (96%), нитропруссид натрия (ч.д.а.), ЭДТА Na (ч.д.а.), вода дистиллированная.

Растворы:

1,5 М трис-НСl буфер, рН 8,9 (18,15 г триса растворяют в дистиллированной воде, доводят рН до 8,9 концентрированной НСl и дистиллированной водой доводят объем раствора до 100 мл). Хранят 3-4 месяца при температуре +4°C.

60%-ный АА:МБА, С=3% (к 58,2 г акриламида и 1,8 г метиленбисакриламида добавить 15-20 мл дистиллированной воды и растворить на водяной бане, довести объем раствора до 100 мл и профильтровать). Хранят 3-4 месяца при температуре +4°C.

ТЕМЕД (тетраэтилметилендиамин) – готовый раствор.

ПСА 40%-ный раствор (персульфат аммония) готовят перед применением.

## 2.2. Условия проведения электрофореза

Электрофорез проводят в буфере, содержащем 0,025 М трис(гидроксиметил)аминометан и 0,192 М глицин (рН 8,3). Для этого 3 г триса и 14 г глицина растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 1 литра.

Электрофорез проводят при силе тока 50 мА на один гель и начальном напряжении 230 В. Время разделения образцов около 3 часов. Электрофорез прекращают, когда фронт белков достигает отметки 0,5 см от нижнего края геля.

## 2.3. Идентификация зон пероксидазной активности

После электрофоретического разделения гели промывают в 0,1М ацетатном буфере (рН 4,5-5,0). Для этого 40 мл 0,2М раствора уксусной кислоты (11,55 мл ледяной уксусной кислоты на 1 л дистиллированной воды) смешивают с 60 мл 0,2М раствора ацетата натрия (27 г ацетата натрия (кристаллогидрат) на 1 л дистиллированной воды) и добавляют в смесь 100 мл дистиллированной воды.

Для идентификации зон пероксидазной активности гели помещают в раствор красителя и после 10-15 минут инкубации в раствор добавляют 2,5 мл  $H_2O_2$  (конц.). В течение 5-15 минут развивается окраска зон пероксидазной активности. Для прекращения реакции гели 5-6 раз промывают проточной водой и в течение 4 часов фиксируют смесью, содержащей 176 мл этанола (96%), 10 мл глицерина и 14 мл ледяной уксусной кислоты. После этого гели промывают в воде до возвращения им первоначальных размеров, высушивают между двумя кусками целлофана и хранят.

**Раствор красителя:** 45 мг нитропрусида натрия (ч.д.а.) и 45 мг ЭДТА натрия (ч.д.а.) заливают 5 мл этанола (96%). Через час в смесь добавляют 75 мг бензидина основания (ч.д.а.), смесь выдерживают в темноте при комнатной температуре в течение 1 часа, затем добавляют в нее 200 мл 0,1М ацетатного буфера. После непродолжительного отстаивания прозрачный раствор выливают на гель.

## 2.4. Денситометрическая обработка результатов

Гель готов к денситометрической обработке непосредственно после обработки фиксирующей смесью. Высушенный гель можно хранить и денситометрировать в удобное для исследователя время. Однако метод гистохимической окраски геля не допускает длительного хранения ввиду быстрого обесцвечивания изозимных спектров, поэтому высушенный гель нужно просканировать на денситометре не позднее 1-2 недель после окраски.

Электрофореграммы содержат информацию об относительном положении ( $R_f$ ), ширине и интенсивности окраски белкового компонента. Количественные и качественные различия между отдельными компонентами электрофоретических спектров белковых фракций определяются путем денситометрирования. Сканирование гелей осуществляется на денситометре ImageScanner фирмы Amersham Biosciences. Компьютерная обработка результатов осуществляется с помощью программы ImageQuant TL, позволяющей определить положение белкового компонента ( $R_f$ ), высоту и площадь пика на денситограмме, и относительное содержание каждого компонента.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Маркирование сортового материала обеспечивает контроль за его однородностью и стандартностью при закладке маточных насаждений, сортовой прочистке садов и при реализации посадочного материала.

Использование вегетативных органов для анализа позволяет сократить время на изучение исходного материала на 5-8 лет в зависимости от длины ювенильного периода конкретных образцов яблони.

Идентификация и паспортизация сортов и ценных форм яблони расширит возможности системы защиты авторских прав селекционеров.

Методика может использоваться в научных учреждениях по плодоводству, высших учебных заведениях аграрного и биологического профилей, системах государственного сортоиспытания и семеноводства для идентификации сортов и защиты авторских прав селекционеров.

## Литература

1. Голышкина, Л.В. Возможности использования полиморфных белков как генетических маркеров в идентификации различных генотипов плодовых культур / Л.В. Голышкина // Проблемы оценки исходного материала и подбора родительских пар в селекции плодовых растений: сб. докл. и сообщ. XVI Мичуринских чтений, Мичуринск, 26-27 октября 1995 г. / ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина; редкол.: В.Е. Перфильев (гл. ред.) [и др.]. – Мичуринск, 1996. – С. 105-107.
2. Biles, C.L. Characterization of muskmelon fruit peroxidases at different developmental stages / C.L. Biles [et al.] // *Biologia Plantarum*. – 2000. – Vol. 43, № 3. – P. 373-379.
3. Конарев, В.Г. Морфогенез и молекулярно-биологический анализ растений / В.Г. Конарев. – СПб.: ВИР, 2001. – 417 с.
4. Молекулярно-биологические аспекты прикладной ботаники, генетики и селекции / под ред. академика РАСХН В.Г. Конарева. – М.: «Колос». – 1993. – 403 с.
5. Падутов, В.Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев. – Мн.: Юнипол, 2007. – 176 с.
6. Гончаренко, Г.Г. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов / Г.Г. Гончаренко, В.Е. Падутов, В.В. Потенко. – Гомель: БелНИИ лесного хозяйства, 1989. – 159 с.
7. Мусин, С.М. Методические указания по использованию белковых маркеров для идентификации генотипов картофеля / С.М. Мусин [и др.]. – М.: ВНИИ картофельного хозяйства, Россельхозакадемия, 2003. – 25 с.
8. Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур / ВНИИСПК; под общ. ред. Е.Н. Седова и Т.П. Огольцовой. – Орел: ВНИИСПК, 1999. – 608 с.
9. Тарлаковская, А.М. Сортовая идентификация и регистрация генофонда двудольных / А.М. Тарлаковская [и др.] // Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян; под ред. акад. РАСХН В.Г. Конарева. – СПб.: ВИР, 2000. – 186 с.
10. Garcia, J.L. Possible juvenile-related proteins in olive tree tissues / J.L. Garcia [et al.] // *Scien. Hortic.* – 2000. – Vol. 85. – P. 271-284.

11. Ghosh, A.K. European and Asian pear: simple sequence repeat-polyacrilamide gel electrophoresis-based analysis of commercial important North American cultivars / A.K. Ghosh [et al.] // HortScience. – 2006. – Vol. 41. – P. 304-309.

12. Kudryakova, N.V. Prospects for the use of isozyme markers in identification of Rubus samples propagated in vitro / N.V. Kudryakova, S.E. Dunaeva // Scientific works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture. Horticulture and Vegetable Growing. – 2001. – Vol. 20, № 3. – P. 79-83.

14. Lucchese, C. Identification of pepper (*Capsicum spp.*) cultivars by field and electrophoresis tests / C. Lucchese [et al.] // Seed. Sci. & Technol. – 1999. – Vol. 27. – P. 37-47.

15. Vladova, R. Seed storage proteins in *Capsicum annuum* cultivars / R. Vladova, R. Pandeva, K. Petcolicheva // Biol. Plant. – 2000. – Vol. 43, № 2. – P. 291-295.

16. Писарев, Б.А. Методы оценки оздоровленных сортов и меристемных линий в элитном семеноводстве картофеля / Б.А. Писарев [и др.]. – М.: НИИ картофельного хозяйства, 1991. – 40 с.

17. Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур / ВНИИСПК; под ред. Е.Н. Седова. – Орел: ВНИИСПК, 1995. – С. 111-139.

19. Арсеньева, Т.В. О возможности применения метода электрофореза запасных белков семян в сортоведении смородины красной / Т.В. Арсеньева // Молодые ученые – садоводству России: тез. докл. Всерос. совещ., Москва, 1995 г. / ВСТИСП. – М., 1995. – С. 61-64.

20. Гаркавая, Л.П. Использование биохимических маркеров в селекции и питомниководстве плодовых культур: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.00.05 / Л.П. Гаркавая; Ин-т земледелия УАН. – Киев, 1997. – 22 с.

21. Гаркавая, Л.П. Использование изоферментного анализа для идентификации хеномелеса / Л.П. Гаркавая, К. Румпунен // Проблемы производства и переработки малораспространенных плодовых и ягодных культур: тез. докл. науч.-производ. конф., Самохваловичи, 26-29 авг. 1996 г. / БелНИИ плодоводства; редкол.: В.А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 1996. – С. 69-71.

21. Романова, О.В. Методика молекулярно-генетической идентификации сортов косточковых культур / О.В. Романова, В.А. Высоцкий. – М., РАСХН, 2007. – 71 с.

22. Bradford, M.M. A rapid sensitive method for the action of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.

22. Голышкина, Л.В. Изоферменты в идентификации сортового генофонда плодовых растений во ВНИИСПК / Л.В. Голышкина // Роль сортов и новых технологий в интенсивном садоводстве: материалы к междунар. науч.-метод. конф., Орел, 28-31 июля 2003 г. / ВНИИСПК. – Орел, 2003. – С. 63-65.

23. Токарева, И.В. Белки вегетативных органов облепихи как возможные маркеры в сортовой идентификации культуры / И.В. Токарева // Адаптив. подход в земледелии, селекции и семеноводстве с.-х. культур в Сибири. – Новосибирск. – 1996. – С. 102-103.

24. Токарева, И.В. Полиморфизм белков облепихи и возможность использования их в селекции в качестве маркеров / И.В. Токарева // Состояние и проблемы садоводства России: сб. науч. тр. / РАСХН. Сиб. отд. НИИ садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко. – Новосибирск, 1997. – Ч. 1. – С. 128-141.

25. Menendez, R.A. Characterization of Pyrus species and cultivars using gradient polyacrylamide gel electrophoresis / R.A. Menendez [et al.] // J. Environ. Hortic. – 1986. – Vol. 4. – P. 56-60.

## METHODOLOGY OF APPLE CULTIVARS IDENTIFICATION USING PROTEIN MARKERS

E.N. Biryuk, Z.A. Kozlovskaya

### SUMMARY

The methodology of apple cultivars identification applying isoenzyme peroxidase system has been worked out. The highly polymorphous peroxidase spectra have made possible to identify 83 apple samples from 112.

Possibility to use vegetative organs for analysis reduce terms of initial material study by 5-8 years, according to juvenile period of a particular apple sample.

The labeling of cultivars provides control upon their homogeneity and correspondence to standards during nursery plantings founding, revising orchards for cultivar purity, cleaning and production of planting material.

Identification and passport system of cultivars and valuable forms broaden the protective facilities of the breeders' copyright interests.

The methodology can be applied in the scientific organizations connected with fruit-growing, in the system of the State Testing Committee and in the State Inspection of Plant Varieties Testing and Protection.

Key words: apple, cultivar identification, protein markers, peroxidase, electrophoresis, Belarus.

*Дата поступления статьи в редакцию 08.06.2010*