

Муминова Н.Г., Абдималикова А.А., Хегай С.В.

**КЫРГЫЗСТАНДЫН ФЛОРАСЫНЫН ГЕНЕТИКАЛЫК
АР ТҮРДҮҮЛҮГҮН ИЗИЛДӨӨДӨ БИОТЕХНОЛОГИЯЛЫК
ЫКМАЛАРДЫ КОЛДОНУУ**

Муминова Н.Г., Абдималикова А.А., Хегай С.В.

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ
В ИЗУЧЕНИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ
ФЛОРЫ КЫРГЫЗСТАНА**

N.G. Muminova, A.A. Abdimalikova, S.V. Hegay

**APPLICATION OF BIOTECHNOLOGY
METHODS IN STUDYING THE GENETIC DIVERSITY
OF THE FLORA OF KYRGYZSTAN**

УДК: 575.153/18

Макалада биотехнология ыкмаларын Кыргызстандын флорасын изилдөөгө арналган. Флоранын генетикалык ар түрдүүлүгүн сактоо жана аны изилдөө маселеси Кыргызстанда гана эмес, бүткүл дүйнөдө дагы биринчи орунда турат. Макалада *Astragalus platyphyllus*, *Astragalus sieversianus* өсүмдүктөрүнөн кургак жалбырактарынан ДНКнын чыгуу ыкмасы, электрофорез ыкмасы менен жыйынтыгын идентификациялоо, жергиликтүү картошка азыктарын өндүрүү үчүн жергиликтүү өстүрүү ыкмасы жана аны экинчи жолу жаңы азыктандыруучу чөйрөгө көчүрүү чыгарылган. Изилдөөлөрдүн натыйжалары практикалык максаттарда колдонулушу мүмкүн. ДНКны бөлүп чыгаруу боюнча изилдөөлөр Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын Биотехнология институтунун өсүмдүктөрдүн биотехнология лабораториясында жүргүзүлгөн. Кыргыз Республикасынын Билим берүү жана илим министрлигине караштуу Ж.Баласагын атындагы Кыргыз Улуттук университетинин Биология факультетинин Өсүмдүктөрдүн Ботаникасы жана физиологиясы кафедрасынын Биотехнология лабораториясында клеткаларды жана ткандарды өстүрүүнү изилдөө жүргүзүлгөн.

Негизги сөздөр: флора, ДНК бөлүп алуу, электрофорез, *Astragalus platyphyllus*, *Astragalus sieversianus*, культивирлөө, картошка.

Статья посвящена изучению методов биотехнологии в изучении флоры Кыргызстана. Вопрос сохранения генетического разнообразия флоры и его изучение не только в Кыргызстане, но и во всем мире стоит на первом месте. В статье описан метод выделения ДНК из сухих листьев растений - *Astragalus platyphyllus*, *Astragalus sieversianus*, идентификация результатов методом электрофореза, метод культивирования эксплантов картофеля для получения каллуса и его вторичная пересадка на свежую питательную среду. Результаты исследований могут быть использованы в практических целях. Исследования по выделению ДНК было проведено в лаборатории биотехнологии растений Института Биотехнологии Национальной Академии наук Кыргызской Республики. Исследования по культивированию клеток и тканей было проведено в лаборатории био-

технологии кафедры ботаники и физиологии растений биологического факультета Кыргызского национального университета имени Ж.Баласагына при Министерстве образования и науки Кыргызской Республики.

Ключевые слова: флора, выделение ДНК, электрофорез, *Astragalus platyphyllus*, *Astragalus sieversianus*, культивирование, картофель.

The article is devoted to the study of biotechnology methods in the study of flora of Kyrgyzstan. The issue of preservation of the genetic diversity of the flora and its study not only in Kyrgyzstan, but also all over the world is in the first place. The article describes a method for isolating DNA from dry plant leaves - *Astragalus platyphyllus*, *Astragalus sieversianus*, identifying the results by electrophoresis, a method for cultivating potato explants to obtain callus and its secondary transplant to fresh nutrient medium. The research results can be used for practical purposes. DNA isolation studies were conducted in the laboratory of plant biotechnology of the Institute of Biotechnology of the National Academy of Sciences. Research on the cultivation of cells and tissues was conducted in the laboratory of biotechnology of the Department of Botany and Plant Physiology, Biological Faculty of the Kyrgyz National University. J.Balasagyn at the Ministry of Education and Science of the Kyrgyz Republic.

Key words: flora, DNA extraction, electrophoresis, *Astragalus platyphyllus*, *Astragalus sieversianus*, cultivation, potatoes.

Актуальность темы. В последнее время биологическое разнообразие в мире начали считать всемирным достоянием. Угроза исчезновения отдельных видов растений стала велика. И если не принять в ближайшее время меры по сохранению видового разнообразия растений, то могут быть потеряны очень ценные виды культурных и диких растений. Отсюда выявляется необходимость разработки эффективных методов по сохранению мирового растительного разнообразия и создания генетических банков растений. Генетические ресурсы растений рассматриваются во всем

мире как основной источник улучшения сельскохозяйственных культур на ближайшие десятилетия.

Кыргызстан богат растительностью как культурного, так и дикого происхождения, последние недостаточно изучены. Флора Кыргызстана наиболее богата представителями различных семейств. Эндемичные растения являются наиболее уязвимым компонентом флоры, так как утрата любого из них, означает большую потерю для биоразнообразия в Кыргызстане, поэтому их изучение и сохранение является важной задачей. Среди редких видов, наиболее важны для сохранения субэндемичные виды, которые являются редкими или особенно важны, как объекты сбора [6].

Благодаря различным методам, в настоящее время удается сохранять генетическое разнообразие флоры, создавая генетические банки растений. Применение современных методов молекулярной биологии и генетики дало возможность глубокого изучения генетики растений и точного определения сортов и видов, а также отличие одного вида от другого.

Целью данной работы является ознакомление с работами по сохранению и использованию эндемиков и редких видов растений Кыргызстана с помощью методов биотехнологии.

Материалы и методы исследования. Подготовка материала, выделение ДНК и учет результатов. Исследования проводились в Институте Биотехнологии НАН КР в лаборатории Биотехнологии растений. Для выделения ДНК использовали сухие листья растений, так как исследование проводилось в зимний период и не всегда можно найти свежие растения. Было использовано два метода выделения нуклеиновых кислот. В первом методе использовали классический СТАВ-метод, во втором этот же метод немного был модифицирован на этапах очистки, т.е. поэтапное добавление холодного этанола 70% [5].

С каждого образца сухих листьев брали навеску 0,5г. Их измельчали в гомогенизаторе (Mo Bio Powerlyzer-24) с металлическими шариками в течение 1,5 минут при 1500 обр/мин. В пробирки эпендорфы с растительным материалом добавляли по 800 µl СТАВ-буфера для выделения ДНК, затем инкубировали (Thermomixer comfort) в течении 1 час при 65°C. После инкубации полученный раствор чистили смесью хлороформа и изоамилового спирта (24:1) с последующим осаждением ДНК путем добавления 2/3 объема холодного изопропанола. После центрифугирования осадок промывали 500 µl washing solution, после добавляли Rinsing solution (раствор для полоскания). Очищенную ДНК растворяли 50 µl TE.

iPBS ПЦР амплификация. Общий объем ПЦР реакции – 25 мкл, состоящий из 25-50 нг ДНК, 1 ед. буфера Taq полимеразы, 0,5 М праймер iPBS-2074, 0,2 mM dNTPs, 1 units Taq DNA polymerase (DreamTaq,

Fermentas) ПЦР программа: 1 цикл 95°C - 3 мин; 30 циклов 95°C - 15 сек, 50°C – 60 сек, 72°C - 60 сек; и 1 цикл финальной элонгации 72°C - 5 мин.

Количество ДНК было оценено спектрофотометром Nanodrop 2000 (США) при длине волны 260/280 нм. Выделенное ДНК и ПЦР продукт определяли с помощью горизонтального гель-электрофореза с 1,5% агарозы и буфером TAE. Продолжительность проведения гель электрофореза составило 1 час при 120 мА. Для визуализации результатов, в раствор агарозы был добавлен бромистый этидий. Фотографии электрофореграмм обрабатывались программой ImageJ.

Метод культуры клеток, тканей и органов растений. Лабораторные исследования проводились в КНУ им. Ж.Баласагына на факультете Биологии кафедры Ботаники и физиологии растений в лаборатории биотехнологии.

Объектом исследования являлась картофель. Лабораторные эксперименты проводили согласно методике Дитченко (2007 г.).

В эксперименте использовали питательную среду Мурасиге-Скуга (1962 г.). Обязательным условием является соблюдение абсолютной стерильности, которая играет важную роль при получении и выращивании каллуса. Растительный материал стерилизуют с помощью химических веществ (хлорамином, гипохлорид Na и Ca), затем нужно вырезать скальпелем участки стебля длиной 5-10мм, листочки, участки корня. Надсечь экспланты острым скальпелем в нескольких местах, в которых в дальнейшем начнется каллусогенез. Надсеченные экспланты разместить на поверхности застывшей питательной среды, которая была заранее разлита в чашки Петри, чуть вдавливая их пинцетом для усиления контакта со средой. В одну чашку помещают 5-10 эксплантов. Далее чашки Петри ставят в термостат без освещения при температуре 22-25°C и влажности 70%. Через три недели можно рассмотреть результат [2].

Для дальнейшей регенерации и роста растения каллусную ткань переносят в новую питательную среду, так как в той питательной среде в которой она находилась исчерпала все питательные вещества для роста. Этот метод называется пассирование каллусных тканей [1]. При пересадке каллуса нужно отделить некротизированные участки и кусочки старой агаризованной среды. Затем каллусную ткань разделить на равные части и перенести в чашки Петри со стерильной питательной средой. Наблюдения за результатом ведутся в течение 3-4 недель [2].

Результаты исследования. **Выделение.** Было использовано два метода выделения ДНК. Качество и количество полученной ДНК варьировалась как для вида растений, так и для использованного протокола экстракции (табл.1).

Таблица 1

Зависимость использования метода выделения ДНК и вида растений Астрагала

№	Образец	Способ выделения					
		Метод 1			Метод 2		
		Концентрация ДНК нг/мкл	Длина волны 260/280 нм	Длина волны 260/230 нм	Концентрация ДНК нг/мкл	Длина волны 260/280 нм	Длина волны 260/230 нм
1.	<i>Astragalus platyphyllus</i>	1212	1,98	1,22	1711,3	2,14	2,09
2.	<i>Astragalus sieversianus</i>	724	1,62	1,43	682	1,77	2,2

Анализ образцов, полученных протоколом 1, показал, что соотношение поглощения при A260/280 нм во всех трех случаях имеют чистую ДНК. Самая высокая концентрация выделенной ДНК равнялась 1212 нг/мкл у *Astragalus platyphyllus*.

Качественный анализ ДНК проводили на горизонтальном электрофорезе [3]. В результате можно наблюдать, что фрагменты ДНК передвигаются в геле в соизмеримо своего размера. Каждое свечение (банд) под действием электрического тока пройдет определенное расстояние в соответствии своему размеру (рис. 2).

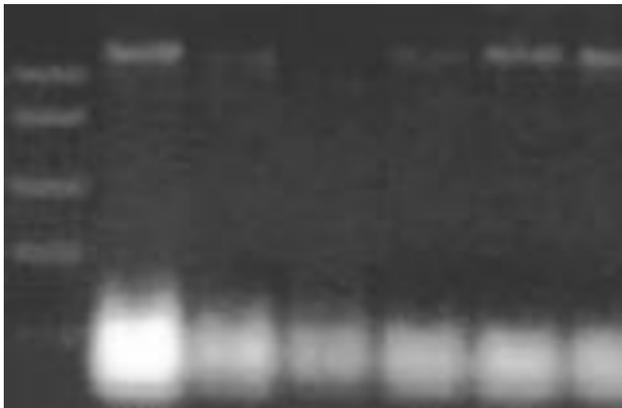


Рис. 2. Результаты выделения ДНК на агарозном геле электрофорезе. L-100 п.о. линейка, 1, 2, 3 - *Astragalus platyphyllus*; 4, 5, 6 - *Astragalus sieversianus*.

Амплификация ДНК. В результате использования универсального маркера iPBS, был обнаружен праймер 2074, который может одним из кандидатов для использования в дальнейшей работы молекулярно-генетическим исследованиям коллекции семенного банка Института биотехнологии НАН КР рода астрагала (рис. 3).

Праймер 2074



Рис. 3. Полиморфизм праймера между *Astragalus platyphyllus* (линия 1,2,3) *Astragalus sieversianus* (линия 4, 5, 6).

В течение первых 3-5 дней наблюдали стерильность питательной среды. Питательная среда с эксплантами была помещена в термостат, где за наблюдаемый период не было обнаружено инфицирования чужеродными микроорганизмами и цвет питательной среды не изменился (рис. 4). Каждую неделю в течение 21 дня проводилось наблюдение за процессом калусообразования. В течение 4-ой недели, посаженные в питательную среду стебли картофеля образовали каллус, цвет которого был светло-зеленый (рис. 5).



Рис. 4. Посаженный эксплант на питательную среду.

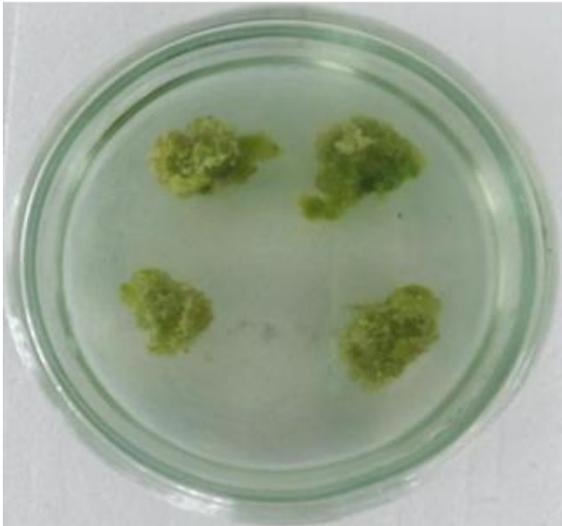


Рис. 5. Нарастание каллуса.

Так прямое попадание света и отдых в темноте является самым важным критерием для дыхания растения. В первую неделю никаких изменений не наблюдалось, только со второй недели начался рост культуры.

Выводы. В результате исследований были получены образцы ДНК из сухих листьев используя два метода выделения. Оба метода можно использовать для выделения ДНК из сухих листьев. Полиморфный праймер iPBS 2074 может быть использован в молекулярно-генетических исследованиях коллекции растений рода Астрагал семенного банка Института биотехнологии НАН КР.

В результате исследований по каллусообразованию у растений картофеля были соблюдены асептические условия. Модифицированная нами питательная среда Мурасиге – Скуга является оптимальной средой для выращивания.

Литература:

1. Анохина В.С., Бабак О.Г., Бажанов Д.П., [и др.]. Генетические основы селекции растений. Том 3. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия. - Минск: Белорусская наука, 2012. - 490 с.
2. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений. - Минск, 2007.
3. Зорина В.В. ПЦР методическое пособие, М-2012, 80 с.
4. Исаева В.К., Кубатбекова Г.К. «Получение межвидовых гибридов «пшеница-эгилопс»». / Республиканский научно-теоретический журнал «Известия вузов Кыргызстана», №1. - Бишкек, 2018. - С. 43-46.
5. Калаев В.Н. Разработка метода получения препарата суммарной ДНК высокого качества из растений рода *Rhododendron* / В.Н. Калаев, О.А. Землянухина, И.Ю. Карпеченко, К.А. Карпеченко, А.М. Кондратьева, В.Н. Вепринцев, Н.А. Карпеченко, С.С. Карпова // Фундаментальные исследования. - 2012. - №5. - С. 148-152.
6. Лазьков Г.А., Умралина А.Р. Эндемики и редкие виды растений Кыргызстана (Атлас), ФАО, Анкара, 2015. - 242 с.
7. Лебедева Н.В. Ускоренное размножение ранних сортов картофеля в условиях *in vitro* и его использование в семеноводстве Северо-Запада РФ. Великие Луки, 2015.
8. Перенков А.Д., Новиков Д.В., Фомина С.Г., Луковникова Л.Б., Калугин А.В., Касатова Е.С., Новиков В.В., Пособие к практическим занятиям по молекулярной биологии. Часть 2. Методы молекулярной диагностики: Учебно-методическое пособие. - Нижний Новгород, 2015. - 44 с.

Рецензент: к.с.-х.н., доцент Исаева В.К.