

Lucrarea de laborator 2

ГЕНЕТИКА (51 балл)

Идентификация генома соматоклональных линий кукурузы из генофонда растительных ресурсов Республики Молдова.

В настоящее время в лабораторию генетических растительных ресурсов Института генетики, физиологии и защиты растений АНРМ переданы на консервацию семени девятнадцати генотипов кукурузы из генетической коллекции соматоклональных линий, созданных в двух научных центрах Республики Молдова (Государственного Аграрного Университета Молдовы и Института растениеводства «Порумбень»).

Для проведения данной практической работы были отобраны **семь соматоклональных линий**, полученных из каллуса незрелых зародышей кукурузы линии-оригинала ВС.

Проведена паспортизация генома этих соматоклональных линий на уровне белковых и двух типов ДНК-маркеров следующими методами:

- 1) методом маркирования запасного белка кукурузы – зеина;
- 2) RAPD-анализом – техникой амплификации матрицы ДНК с помощью произвольно выбранных **праймеров** (короткий олигонуклеид, осуществляющий ренатурацию (отжиг) шаблона однонитевой ДНК, обеспечивая удвоение этой структуры, из которой ДНК-полимераза будет синтезировать новую нить ДНК для того, чтобы продуцировать двухцепочечную молекулу) на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- 3) ISSR-анализом - техникой генотипирования на основе ПЦР, использующая в качестве **праймеров** простые повторяющиеся нуклеотидные последовательности.

Каждый из этих методов основан на одной из ключевых характеристик белка и ДНК – **полиморфизма**, оценка которого проводится методом электрофореза (ЭФ).

Результаты компьютерного моделирования ЭФ-спектров соматоклональных линий кукурузы, созданных на основе линии-оригинала ВС, представлены на следующих трех схемах (см.ПРИЛОЖЕНИЯ 1, 2, 3 и НАБОРЫ электрофореграмм 1, 2, 3):

ПРИЛОЖЕНИЕ 1 -схема 1 - запасного белка кукурузы – зеина,

ПРИЛОЖЕНИЕ 2 -схема 2 -ДНК-маркирования методом RAPD-анализа

ПРИЛОЖЕНИЕ 3 -схема 3- ДНК-маркирования методом ISSR-анализа

Наборы компьютеризированных матриц электрофоретических полос, характеризующих электрофоретические профили соматоклональных линий кукурузы, с указанием **внутренних стандартов (St)** изучаемых молекулярных форм (МФ):

Набор №1 – "Zeina" – белковые профили соматоклональных линий и линии-оригинала ВС;

Набор № 2 - «RAPD» - RAPD–профили соматоклональных линий и линии-оригинала ВС;

Набор № 3 - «ISSR» - ISSR- профили соматоклональных линий и линии-оригинала ВС.

ПРОТОКОЛ РАБОТЫ

Часть I. Проведение расчетов (табл.1,2,3):

1. Ознакомьтесь со структурой рабочих таблиц 1, 2, 3, составленных для проведения анализа-сопоставления представленных электрофоретических паспортов соматоклональных линий кукурузы (С5, С15, С51, С54, С55, С56 и С57) с линией-оригиналом ВС.
2. В графе **В** (таблицы 1, 2, 3) приведены количественные характеристики общих ЭФ-спектров молекулярных форм (МФ) белка (табл.1) и МФ ДНК (табл. 2 и табл.3).
3. Подсчитайте количество молекулярных форм (МФ) ЭФ-спектра каждой из изученных соматоклональных линий, сходных с МФ ЭФ-спектра линии-оригинала, внесите в графу **С** таблиц 1, 2, 3 и рассчитайте *среднюю величину* этой выборки.
4. Подсчитайте количество новых молекулярных форм (МФ) ЭФ-спектра каждой из изученных соматоклональных линий, которые дополняют в ЭФ-спектре каждой анализируемой соматоклональной линии молекулярные формы, сходные с линией-оригиналом, внесите в графу **Д** таблиц 1, 2, 3 и рассчитайте *среднюю величину* этой выборки.
5. Рассчитайте для каждой соматоклональной линии % МФ, сходных с компонентами спектра линии-оригинала ($E_{\text{соматоклона}}$) по формуле:

$$E_{\text{соматоклона}} \% = C_{\text{соматоклона}} \times [100 / V_{\text{оригинала}}]$$

Полученные результаты внесите в графу E таблиц 1, 2, 3.

6. Рассчитайте для каждой соматоклональной линии % новых МФ в спектре соответствующего соматоклона ($F_{\text{соматоклона}}$) по формуле:

$$F_{\text{соматоклона}} \% = [D_{\text{соматоклона}} / V_{\text{соматоклона}}] \times 100$$

Полученные результаты внесите в графу F таблиц 1, 2, 3.

7. Рассчитайте средние величины выборок, представленных в графах **E, F** по каждой из рабочих таблиц 1,2,3.

ТАБЛИЦЫ

для проведения расчетов по ЭФ спектрам, представленных на рисунках 1, 2, 3.

Таблица 1. Степень сходства и различия между белковыми профилями соматоклональных вариантов кукурузы и линии-оригинала ВС (по общему количеству молекулярных форм белка = МФ).

Соматоклон	Общее количество МФБ	Количество МФБ		Количество МФБ (в % от оригинальной линии)	
		Сходные с МФБ линии-оригинала	новые	Сходство с МФБ линии-оригинала	новые
<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>
Линия-ориг.	12	12	0	100	0
С 5	13				
С 15	13				
С 51	11				
С 54	12				
С 55	8				
С 56	9				
С 57	13				
<i>Среднее</i>					

Таблица 2. Степень сходства и различия между RAPD-профилями соматоклональных вариантов кукурузы и линии-оригинала ВС (по общему количеству молекулярных форм ДНК = МФ-ДНК).

Соматоклон	Общее количество МФ-ДНК	Количество МФ-ДНК		Количество МФ-ДНК (в % от оригинальной линии)	
		Сходные с МФ-ДНК линии-оригинала	новые	Сходство с МФ-ДНК линии-оригинала	новые
<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>
Линия-ориг.	27	27	0	100	0
С 5	23				
С 15	27				
С 51	29				
С 54	28				
С 55	30				
С 56	31				
С 57	27				
<i>Среднее</i>					

Таблица 3. Степень сходства и различия между ISSR-профилями соматоклональных вариантов кукурузы и линии-оригинала ВС (по общему количеству молекулярных форм ДНК = МФ-ДНК).

Соматоклон	Общее количество МФ-ДНК	Количество МФ-ДНК		Количество МФ-ДНК (в % от оригинальной линии)	
		Сходные с МФ-ДНК линии-оригинала	новые	Сходство с МФ-ДНК линии-оригинала	новые
<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>
Линия-ориг.	26	26	0	100	0
С 5	22				
С 15	23				
С 51	19				
С 54	18				
С 55	21				
С 56	18				
С 57	27				
<i>Среднее</i>					

Часть II.

Анализ полученных результатов и формулировка выводов

1. Используя расчетные данные, приведенные в графе В таблиц 1, 2, 3, заполните таблицу 4, строка 2 (**12 пунктов**). В 3-ей строке этой таблицы укажите метод (***) , выделившийся по наибольшей степени полиморфизма белка или ДНК (**1 пункт**).
2. Используя расчетные данные, приведенные в графе Е таблиц 1, 2, 3, заполните таблицу 5, строка 2 (**12 пунктов**). В 3-ей строке этой таблицы укажите метод (***) , наиболее приемлемый для выявления генетического сходства соматоклональной линии кукурузы с исходной линией-оригиналом (**1 пункт**).
3. Используя расчетные данные, приведенные в графе F таблиц 1, 2, 3, заполните таблицу 6, строка 2 (**12 пунктов**). В 3-ей строке этой таблицы укажите метод (***) , наиболее приемлемый для выявления отклонения генома соматоклональной линии кукурузы от генома линии-оригинала (**1 пункт**).
4. В 4-ой строке каждой таблицы 4, 5, 6 – напишите выводы в соответствии с индивидуальной интерпретацией полученных результатов (4 пункта для каждой из 3-х таблиц = **12 пунктов**).

ТАБЛИЦЫ для формулировки выводов

Таблица 4. Сопоставление эффективности методов оценки генома по количественным характеристикам ЭФ молекулярных форм белка и ДНК соматклонов кукурузы и их линии-оригинала.

Соматклон	Метод	ЭФ-анализ белков	ЭФ-анализ ДНК	
			RAPD- анализ	ISSR-анализ
1.	Линия-оригинал	12	27	26
2.	Среднее			
3. Указать метод, выделившийся по <u>наибольшему</u> полиморфизму белка или ДНК				
4. Выводы:				

Таблица 5. Сопоставление эффективности методов оценки генома для выявления наибольшего генетического сходства соматклонов кукурузы с исходной линией-оригиналом.

Соматклон	Метод	ЭФ-анализ белков (в %)	ЭФ-анализ ДНК (в %)	
			RAPD- анализ	ISSR-анализ
1.	Линия-оригинал	100	100	100
2.	Среднее			
3. Указать метод, наиболее приемлемый для проводимой оценки				
4. Выводы:				

Таблица 6. Сопоставление эффективности методов для выявления наибольшего отклонения генома соматклональной линии кукурузы от генома линии-оригинала.

Соматклон	Метод	ЭФ-анализ белков (в %)	ЭФ-анализ ДНК (в %)	
			RAPD- анализ	ISSR-анализ
1.	Линия-оригинал	0	0	0
2.	Среднее			
3. Указать метод, наиболее приемлемый для проводимой оценки				
4. Выводы:				

