



# БОЛЬШИЕ ВЫЗОВЫ

ВСЕРОССИЙСКИЙ КОНКУРС  
НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЕКТОВ



Региональный трек  
Всероссийского конкурса  
научно-технологических проектов

**«БОЛЬШИЕ ВЫЗОВЫ»**

направление

**Агропромышленные и биотехнологии**

название работы

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ  
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИСТОЧНИКОВ ЦМС  
ЯРОВОГО РАПСА**

участник(и)

**Богатырёва Мария Сергеевна**

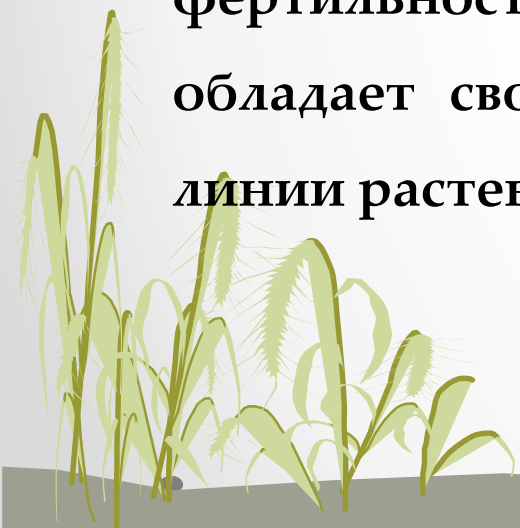
#большиевызовы  
#МГК

[mgk.olimpiada.ru](http://mgk.olimpiada.ru)

г. Москва  
2021

# Актуальность

- В мировом сельском хозяйстве рапс занимает прочные позиции одной из важных сельскохозяйственных культур.
- Повышения урожайности ярового рапса можно достигнуть переходом на возделывание чистых линий гибридов.
- Для получения чистых линий гибридов в промышленных масштабах наиболее удобным и технологичным является использование генов восстановления фертильности и цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС), которая обладает свойством организма, препятствующим самоопылению внутри одной линии растений.



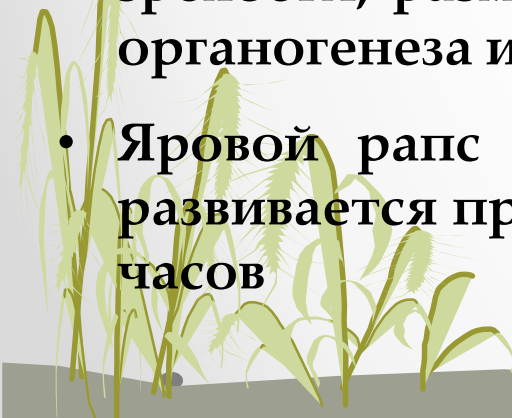
# Гипотеза, цель и задачи работы

- **Гипотеза:** существует методика выявления типов цитоплазмы сортов ярового рапса для перехода на возделывание чистых линий гибридов
  
- **Цель работы:** идентификация источников ЦМС ярового рапса.
  
- **Задачи:**
  - Определение типа цитоплазмы Ogura.
  - Определение типа цитоплазмы Pol.
  - Определение типа цитоплазмы Nap.
  - Разработка тест системы для лучшего определения типов ЦМС.



# Рапс как объект селекции

- Рапс (*Brassica napus*) - это аллополиплоидный вид, который, как считается, образовался в результате гибридизации двух диплоидных видов около 6800-12500 лет назад
- Принадлежит к семейству Капустные (*Brassicaceae*).
- Рапс представлен в культуре озимой и яровой формами
- Жизненный цикл рапса включает в себя 5 возрастных периодов (семенной, юности, зрелости, размножения, старения), 12 этапов органогенеза и 7 фенологических фаз роста.
- Яровой рапс весьма светолюбив и быстро развивается при длине светового дня более 14 часов



# Материалы и методы

**В исследовании использовались методики, применяемые в молекулярной биологии.**

**Работа включала в себя 4 этапа:**

- 1. Проращивание семян**
- 2. Выделение ДНК из растительных объектах**
- 3. Измерение концентрации ДНК на нанофотометре**
- 4. ПЦР и электрофорез ДНК выделенной из образцов рапса**



# Выделение ДНК

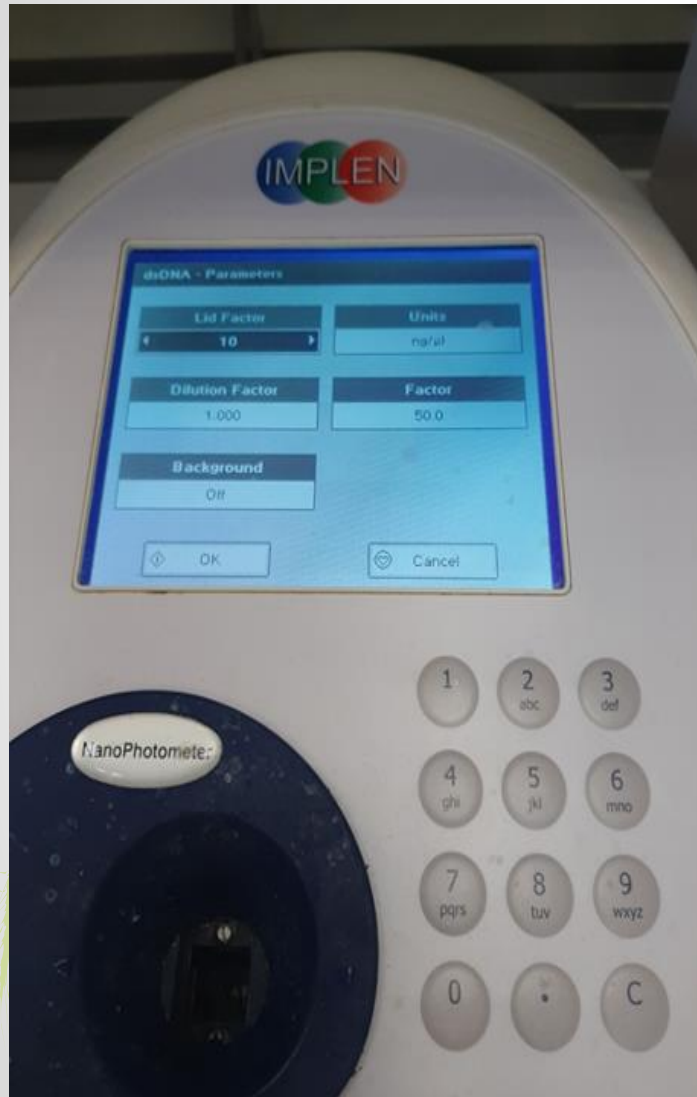
Процедура выделения ДНК включает следующие обязательные процедуры:

- Разрушение клеток
- Удаление мембранных липидов
- Удаление вторичных метаболитов и запасных веществ
- Удаление белков
- Осаждение ДНК

Протокол выделения ДНК, обеспечивающий максимальный выход продукта наиболее высокого качества:

1. В пробирку с растительным материалом поместить 500 мкл бусин для растирания.
2. В эту же пробирку 500 мкл лизирующего р-ра.
3. Поместить пробирки в гомогенизатор на 8000 колебаний 2 цикла по 25 секунд, перерыв между циклами – 20 секунд.
4. Поместить пробирки в термостат на 65°C на 25 минут.
5. Центрифугировать 13000 об./мин в течение 5 мин.
6. Отбираем супернатант (400-600 мкл) в новую пробирку.
7. Приливаем 140 мкл 7,5М ацетата аммония или 60 мкл ацетата калия.
8. Перемешиваем на Vortex и помещаем в холодильник на 5 мин (+4°C)
9. Центрифугировать 13000 об./мин в течение 5 мин.
10. Отбираем супернатант.
11. Осаждаем изопропанолом (соотношение к супернатанту 1:1).
12. Перемешиваем:  
А) мало - центрифугировать 13000 об./мин в течение 5 мин.  
Б) много - Центрифугировать 8000 об./мин в течение 5 мин.
13. Сливаем супернатант.
14. Промываем 700 мкл 70% этанола.
15. Центрифугировать 13000 об./мин в течение 2 мин.
16. сушим до полного испарения этанола.
17. Приливаем 100 мкл ТЕ-буфера.
18. Помещаем в термостат на 65°C на 5 минут.
19. Перемешиваем на Vortex.

# Измерение концентрации ДНК на нанофотометре



№ п/п	Образец	ДНК, ng/ $\mu$ l	A260/230	A260/280
1	1A-5	65	1,65	2,1
2	1A-8	42	1,94	1,96
3	1A-9	84	1,9	2,2
4	<u>Сальса №1 стер.</u>	37	1,97	2,1
5	NXU213F1	54	2,1	1,87
6	<u>CMS-pol</u>	65	1,89	2,0
7	<u>Line-Rf</u>	45	1,78	2,1
8	<u>Сальса F<sub>1</sub></u>	57	1,68	1,89
9	<u>Культус F<sub>1</sub> №1 ферг</u>	78	1,78	2,0
10	<u>Солар F<sub>1</sub> ферг</u>	68	1,85	1,90
11	<u>Солар №2 стер</u>	84	1,86	2,3

Таблица 5. Результаты измерения концентрации ДНК для каждого образца и каждой повторности

- Чтобы убедиться, что ДНК удалось выделить в достаточном количестве, её концентрация было измерена с помощью нанофотометра (нг/мкл).
- Был выбран оптимальный протокол выделения ДНК, который обеспечил большим количеством ДНК почти в каждом из образцов

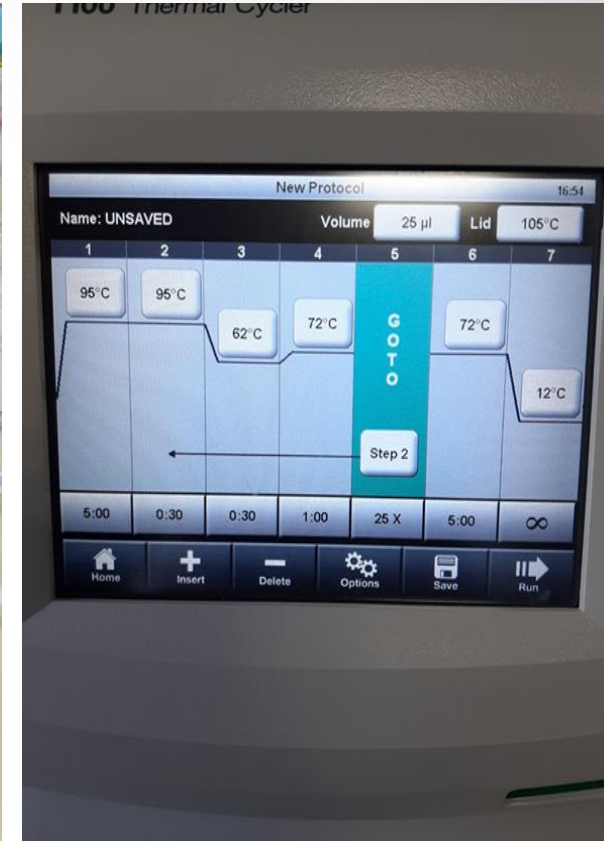
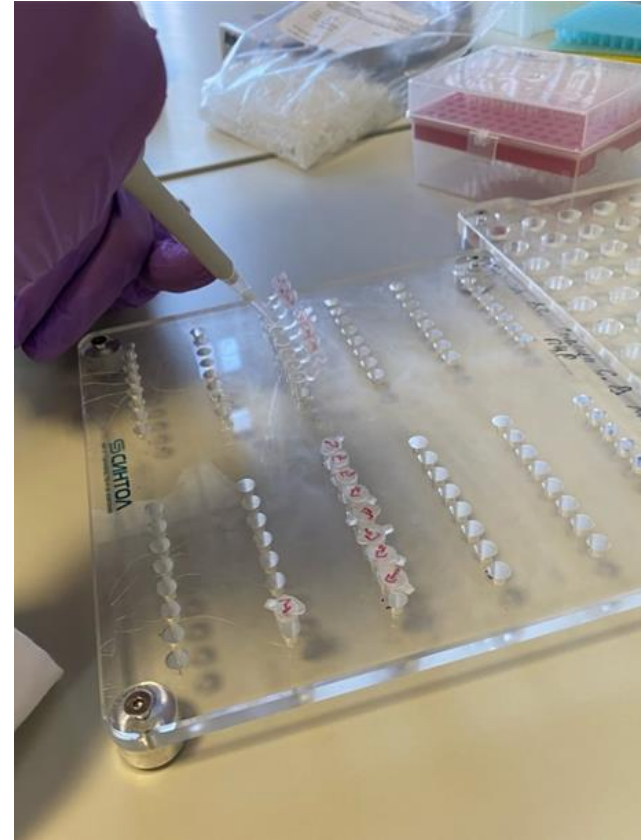
# ПЦР и электрофорез ДНК выделенной из образцов рапса

## Стадии ПЦР:

1. Активация, первая денатурация ДНК
2. Денатурация
3. Отжиг (присоединение) праймеров
4. Элонгация цепей ДНК, т.е. формирование наших копий ДНК

Произведена ПЦР всех образцов рапса с использованием праймеров MSS2 MSS6 MSS14 MSS21 (амплификация у sam- и rol-типов ЦМС)

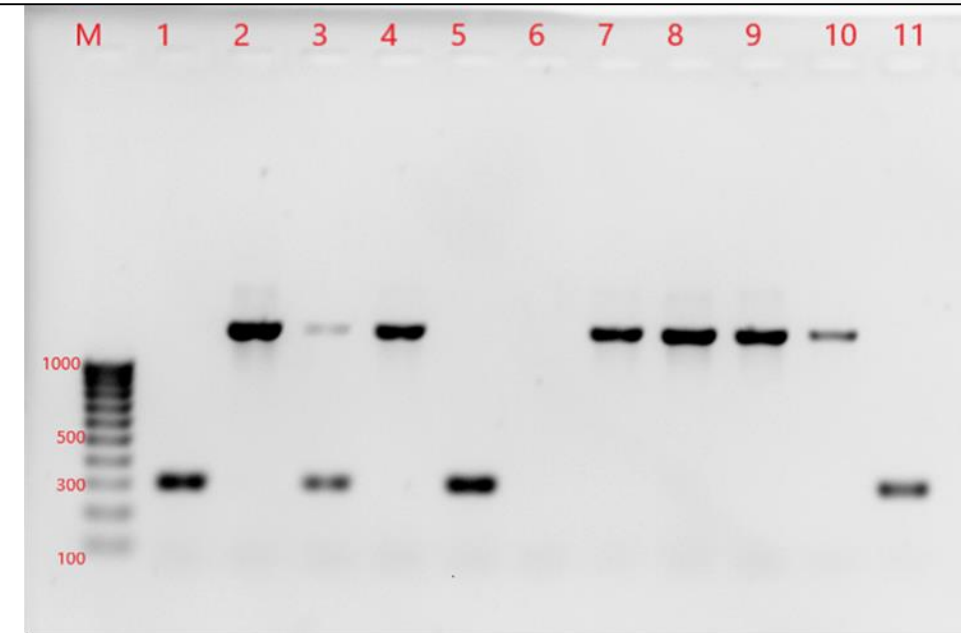
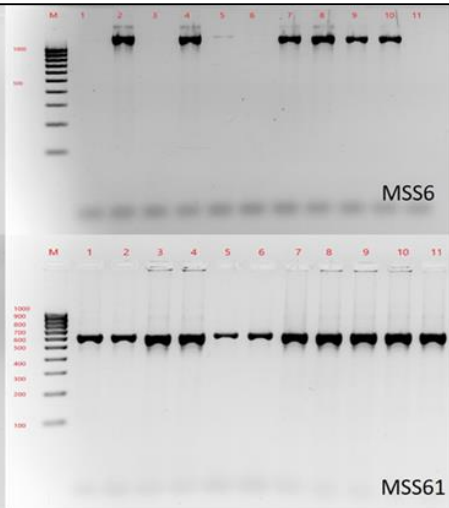
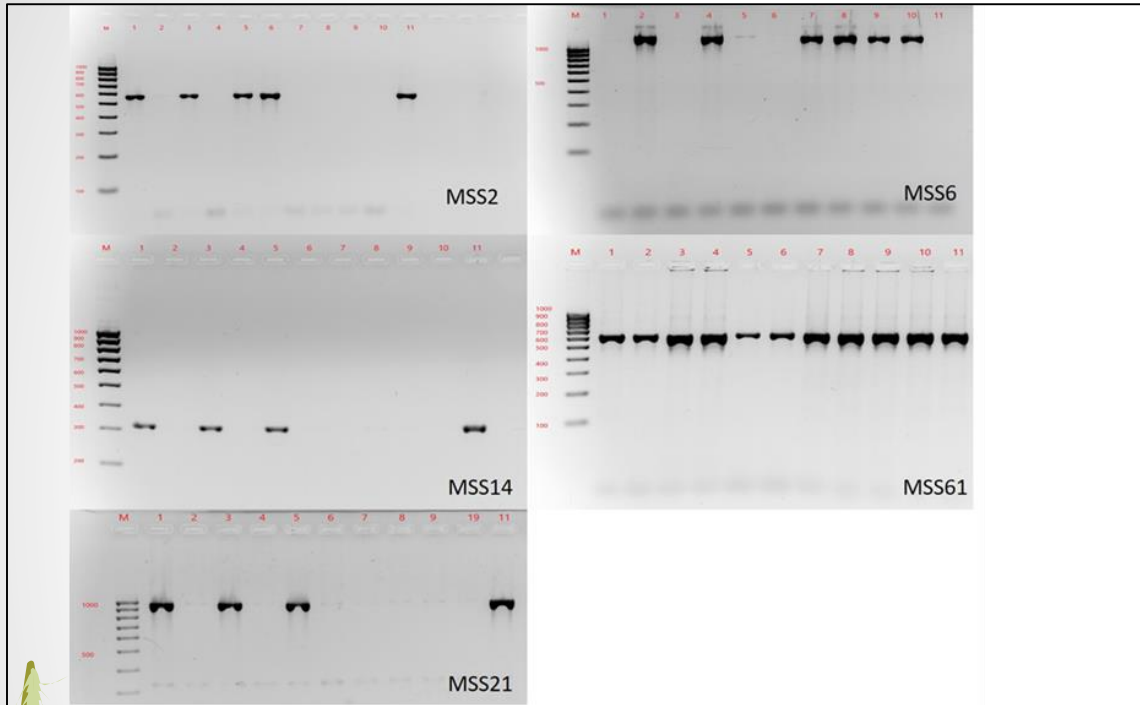
После завершения процесса ПЦР полученные ампликоны необходимо идентифицировать. Для визуализации результатов ПЦР используют метод электрофореза в агарозном геле.





# Результаты и обсуждение

Были использованы 5 пар праймеров: MSS2, MSS21, MSS6, MSS61 и MSS14



Из 5 пар праймеров, только один (MSS61) не дал ожидаемых результатов, т.к. продукты ПЦР были детектированы на всех образцах. Кроме этого, не удалось достоверно отличить *rol*- и *cam*-типы цитоплазмы.

Чтобы быстро отличать *Ogu* цитоплазму от *Cam* и *Pol*, был проведён мультиплексный анализ с двумя парами праймеров, MSS6 (*cam* и *rol* 1387) и MSS14 (*ogu* 342). Для первого этапа скрининга предлагается использовать мультиплекс ПЦР – тест систему из MSS6 / MSS14

# Вывод

В результате проделанной работы были освоены методы выделения ДНК, измерения концентрации ДНК, техника ПЦР и техника электрофореза в агарозном геле. Удалось отличить различные типы цитоплазмы у представленных 11 образцов ярового рапса.

1. Тип цитоплазмы *Ogura* идентифицирован у 1, 3, 5 и 11 образцов.
2. Образцы 2, 4, 7, 8, 9 и 10 определены как источники *Pol*.
3. Единственным образцом с типом цитоплазмы *Nar* является 6 сортообразец.
4. Чтобы быстро отличать *Ogu* цитоплазму от *Pol*, был проведён мультиплексный анализ с двумя парами праймеров, MSS6 и MSS14.



# Практическая значимость и перспективы

В дальнейшем планируется продолжить работу по мультиплексной ПЦР и протестировать образцы рапса с использованием праймера на структурные перестройки MSS14 (огу ЦМС), а также праймеров, ассоциированных с типами ЦМС для точной идентификации типов цитоплазмы у образцов рапса.

Основываясь на данных, которые были получены в ходе работы, будет проанализирована возможность скрещивания сортов ярового рапса. Благодаря этому можно получить чистые линии гибридов, из семян которых впоследствии делают высококачественное масло.

