

УДК 634.11:631.541.11]:581.143.6:575.2

RAPD-АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ПОДВОЯ ЯБЛОНИ 62-396 ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ IN VITRO И IN VIVO

А.А. Змушко, Н.Н. Волосевич, Н.В. Кухарчик

РУП «Институт плодородства»,

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

e-mail: belhort@it.org.by

РЕЗЮМЕ

Исследования проведены в отделе биотехнологии РУП «Институт плодородства» в 2010-2011 гг. Был проведён RAPD-анализ генетической изменчивости растений клонового подвоя яблони 62-396, культивируемых в условиях *in vitro* в течение 5 лет, в течение 6 месяцев, а также культивируемых *in vivo* (традиционными методами). Из 40 олигонуклеотидных праймеров были отобраны 5, которые дали спектр хорошо различимых полос. Было установлено, что клоновый подвой яблони 62-396 на начальных этапах микроразмножения имел больший уровень полиморфизма отдельных локусов (33,3 %), чем при длительном культивировании в течение 5 лет (17,3 %). Анализ растений клонового подвоя 62-396, выращиваемого в поле (*in vivo*), также выявил генетическую вариабельность изученных образцов (уровень полиморфизма отдельных локусов составил 18,42 %).

Ключевые слова: RAPD, генетическая изменчивость, соматоклональная вариабельность, клоновый подвой яблони, культура *in vitro*, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

В структуре плодовых насаждений Республики Беларусь яблоня занимает более 90 % площадей и является одной из приоритетных культур для страны. В настоящее время требуется существенное увеличение производства плодов в республике. Важным резервом интенсификации садоводства является использование слаборослых клоновых подвоев. При этом, производство оздоровленного и тестированного посадочного материала является одним из научных приоритетов в развитии адаптивного интенсивного плодородства нашей страны [1].

При использовании технологий культивирования *in vitro* чрезвычайно важным является получение генетически однородного материала размножаемых культур. Использование культуры *in vitro* может приводить к возрастанию уровня генетической изменчивости размножаемых растений по сравнению с материалом, культивируемым традиционными методами [2, 3, 4]. Это объясняется наличием в среде регуляторов роста, стрессовыми условиями введения в культуру (поранение, стерилизующие агенты), нарушением организменного контроля за мутантными клетками [5, 6, 7, 8, 9, 10].

Значительное влияние на уровень мутабельности культуры тканей оказывает модель размножения. Наиболее стабильное в генетическом и фенотипическом отношении потомство наблюдается при микроразмножении через культуру апикальных меристем [11, 12]. Тем не менее, и здесь не всегда удаётся сохранить стабильность исходного генотипа [4, 11].

Уклоняющиеся варианты, возникающие при различных способах размножения *in vitro*, могут иметь генетическую, онтогенетическую или фенотипическую (эпигенетическую) природу [6, 7]. Соматоклональными вариантами называют лишь генетически изменённые формы; такие изменения стабильны на протяжении значительного числа поколений и могут передаваться при половом размножении. Отличить соматоклональные (генетические) вариации от других, в частности, *эпигенетических*, не всегда легко. Для подтверждения генетической природы изменений необходим генетический анализ [13].

В генетико-селекционных работах феномен генетической нестабильности клеток растений в культуре тканей является одним из инструментов для создания новых сортов растений, обладающих комплексом хозяйственно полезных признаков [14, 15, 16]. Однако при клональном микроразмножении растений с целью длительного хранения отобранных генотипов или массового размножения посадочного материала высокий уровень соматоклональной изменчивости является нежелательным [2].

Наиболее перспективным и широко используемым методом для изучения соматоклональной изменчивости является RAPD-анализ (random amplified polymorphic DNA), основанный на полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием случайных праймеров [17, 18]. С помощью RAPD-анализа выявляется значительно большее число генетических различий, нежели обнаруживается при фенотипическом и генетическом анализе соматоклонов [17].

Информация о генетической изменчивости подвоев яблони необходима для их успешного размножения в культуре *in vitro* и получения однородного материала. В Беларуси до настоящего времени не проводилось комплексное изучение микроразмножения клоновых подвоев яблони *in vitro* с учетом анализа соматоклональной вариабельности культуры.

Целью данной работы было изучить генетическую стабильность клонового подвоя яблони 62-396 с помощью RAPD-PCR при культивировании в условиях *in vitro* и традиционными методами.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследований был карликовый подвой яблони 62-396. Получен в 1962 г. на кафедре плодоводства Плодоовощного института им. И.В. Мичурина путём скрещивания гибрида 13-14 с В9. Хорошо укореняется в маточнике. Средний балл укоренения – 4, морозоустойчив. Корни выдерживают температуру минус 16 °С. В питомнике приживается на 93 %, выход привитых саженцев составляет 95-100 % от числа посаженных. В саду высота 5-летних деревьев в зависимости от сорта – 2,1-2,4 м. Деревья вступают в плодоношение на второй год после посадки. Совместимость с районированными сортами хорошая; включен в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь [19, 20].

Для анализа генетической стабильности были изучены следующие образцы ДНК: генетический материал подвоя, культивируемого в полевых условиях, генетический материал подвоя, размножаемого в условиях *in vitro* в течение 5 лет и в течение 6 месяцев.

Растения-регенеранты культивировали на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга с концентрацией 6-бензиладенина 2 мг/л, GA₃ (гибберелловой кислоты) – 2 мг/л, индолилмасляной кислоты – 0,2 мг/л. Условия культивирования *in vitro* – освещение 2,5-3 тыс. люкс, температура 21-23 °С, фотопериод 16/8 часов.

Методика выделения ДНК из растений

Для выделения ДНК из растительной ткани использовали коммерческий набор “Genomic DNA purification kit” (Fermentas). Выделение проводили в соответствии с методическими рекомендациями фирмы-производителя.

Наличие ДНК в полученном растворе проверяли при помощи электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Полученные образцы ДНК хранили при +4 °С.

Методика проведения ПЦР-анализа

Для проведения ПЦР-анализа готовили смесь реакционных компонентов: 18,7 мкл milliQ воды, 2,5 мкл 10X Taq-буфера, 1,5 мкл 25 mM раствора MgCl₂, 0,5 мкл 0,2 mM раствора dNTP, 0,5 мкл праймера, 0,3 мкл Taq-полимеразы (1 ед.), 1 мкл ДНК-матрицы. Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл.

ПЦР-реакция проводилась при следующих заданных параметрах: 1 цикл: 94 °С – 2,5 мин; 35 циклов: 94 °С – 0,5 мин, 36 °С – 0,5 мин, 72 °С – 1,5 мин; 1 цикл: 72 °С – 12 мин.

Продукты амплификации разделяли при помощи электрофореза в 1%-ном агарозном геле и 0,5 X TAE-буфере. Результаты электрофореза анализировали с помощью аппаратного обеспечения GelDoc (BioRad) и пакета программ QuantityOne-4.5.1 (BioRad). Оценивали размер амплифицируемых фрагментов, подсчитывали число мономорфных и полиморфных полос, а также общее число полос на праймер (размытые полосы с незначительной интенсивностью исключали из анализа). Процент идентичности высчитывали как процент мономорфных полос по отношению к общему изученному числу фрагментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Подбор праймеров

Оценивали эффективность использования при проведении RAPD-PCR с исследуемыми ДНК-матрицами 40 олигонуклеотидных праймеров: 10 праймеров, последовательности которых были взяты из публикации А.В. Фортэ и др. [21], а также 30 десяти-нуклеотидных праймеров с произвольной последовательностью, которые разрабатывали самостоятельно. Анализировали наличие, количество и чёткость полос в агарозном геле, а также различие в спектрах между различными образцами ДНК. Для дальнейших исследований отбирали праймеры, дающие максимальное количество чётко различимых полос. В качестве матрицы использовали ДНК, выделенную из полевых образцов подвоя 62-396. Для дальнейшей работы были отобраны 5 праймеров (G2-70-2, G3-70-2, G4-70-1, ОРА-01, UBC-347), которые дали спектр хорошо различимых полос (таблица 1).

Таблица 1 – Праймеры, отобранные для оценки генетической стабильности подвоя яблони 62-396

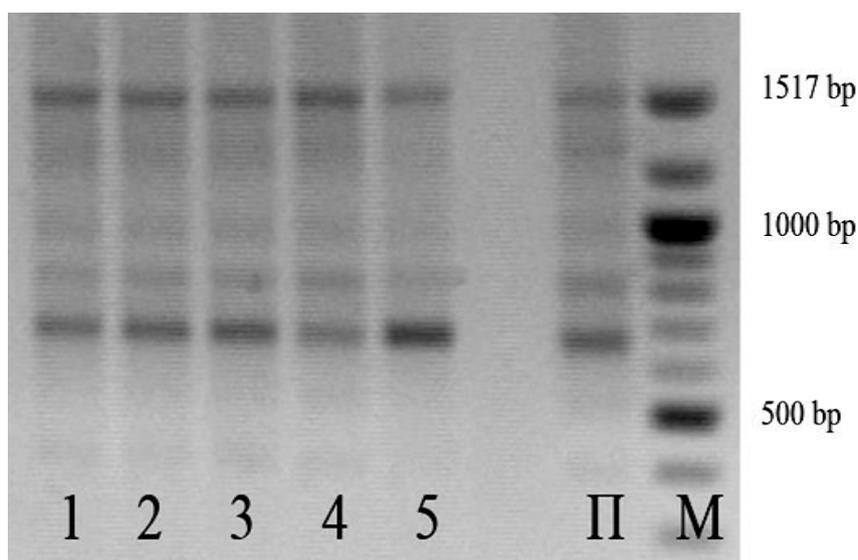
Название праймера	Нуклеотидная последовательность
G4-70-1	GCCCCCTCTTG
G3-70-2	GCTCTCCGTG
G2-70-2	GGCCTACTCG
ОРА-01	CAGGCCCTTC
UBC-347	TTGCTTGGCG

Оценка генетической изменчивости клонового подвоя яблони 62-396 на начальных этапах культивирования *in vitro* (6 месяцев). В качестве контроля использовали образец ДНК, выделенный из растений 62-396, культивируемых в поле. Генетическую стабильность подвоя 62-396 оценивали с помощью 5 праймеров (таблица 2). Каждый праймер генерировал продукты амплификации, варьирующие по размеру от 350 bp (G3-70-2) до 1520 bp (G4-70-1). Максимальное число полос в геле генерировал праймер ОРА-01 (8 полос), минимальное – праймер G2-70-2 (5 полос). Было проанализировано 33 различных полосы, из них 22 мономорфных и 11 полиморфных. Уровень полиморфизма составил 33,3 %.

Таблица 2 – Число и размер полос, генерируемых праймерами на основе ДНК-матрицы подвоя 62-396, размножаемого в полевых условиях и в культуре *in vitro*

Название праймера	Число полос			Размер амплифицированных фрагментов, bp
	анализированных	мономорфных	полиморфных	
G2-70-2	5	5	0	400-1510
G3-70-2	6	4	2	350-1300
G4-70-1	7	7	0	400-1520
ОРА-01	8	3	5	400-1180
УВС-347	7	3	4	400-1510

Праймеры G2-70-2 и G4-70-1 показали идентичные RAPD-профили для культуральных и полевых образцов (рисунок 1). Праймеры G3-70-2, ОРА-01, УВС-347 продемонстрировали генетические отличия между изученными образцами. Наибольшее количество полиморфных полос (5 полос) генерировал праймер ОРА-01, а наименьшее – праймер G3-70-2 (2 полосы).



1-5 – ДНК растений-регенерантов, П – полевой образец, М – маркер 100 bp DNA Ladder (BioLabs)

Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов RAPD-PCR, ДНК-матрица представлена подвоем 62-396 с использованием праймера G4-70-1.

Полученные отличия в спектрах амплифицированных фрагментов свидетельствуют о наличии генетических отличий между растениями, размножаемыми в культуре *in vitro* и в полевых условиях. Коэффициенты попарной генетической дистанции между растениями подвоя 62-396 варьировали от 0 до 0,281250 (таблица 3).

Таблица 3 – Матрица генетической дистанции между размножаемыми *in vitro* и культивируемыми в поле растениями подвоя 62-396

	1	2	3	4	5	П
1	0,000000					
2	0,103448	0,000000				
3	0,000000	0,103448	0,000000			
4	0,161290	0,133333	0,161290	0,000000		
5	0,137931	0,233333	0,137931	0,225806	0,000000	
П	0,161290	0,068966	0,161290	0,187500	0,281250	0,000000
Примечания: 1-5 – растения, культивируемые <i>in vitro</i> ; П – растения, культивируемые в полевых условиях.						

Как видно из данных таблицы 3, микропобеги 1 и 3 оказались генетически идентичны. Коэффициент попарной генетической дистанции между ними составил 0 %. В остальном генетическая вариабельность между растениями-регенерантами варьировала от 10,35 % до 23,33 %. Все изученные микропобеги отличались от полевого образца (6,9-28,13 %).

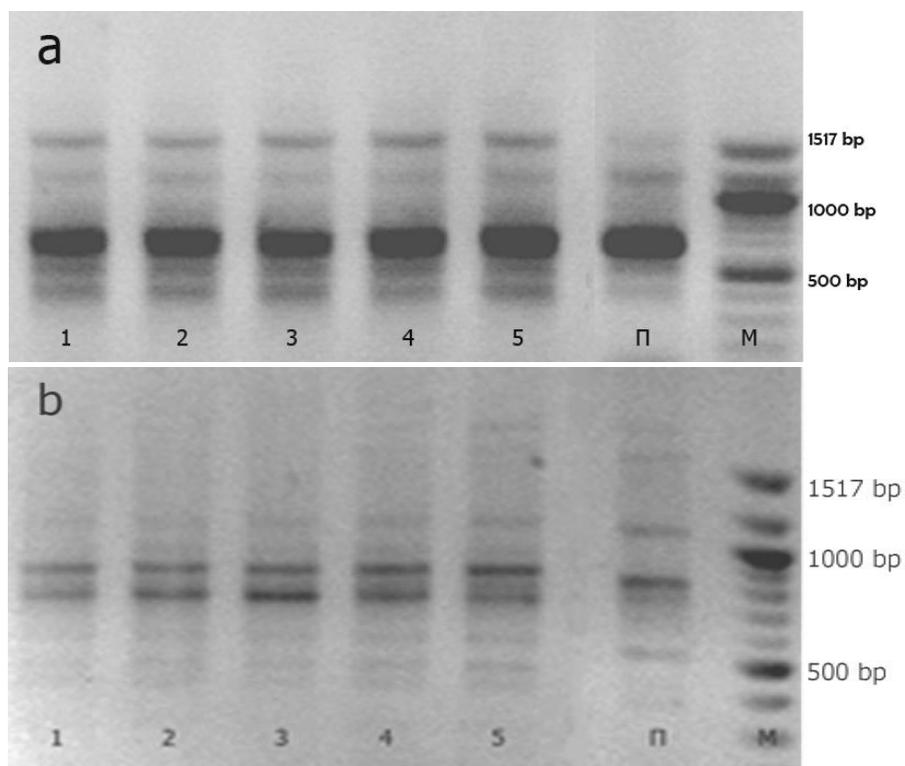
Влияние длительного культивирования *in vitro* (5 лет) на генетическую изменчивость клонового подвоя яблони 62-396. Для оценки генетической стабильности подвоя 62-396 использовали 5 праймеров (таблица 4).

Таблица 4 – Число и размер полос, генерируемых праймерами на основе ДНК-матрицы подвоя 62-396, размножаемого в полевых условиях и в культуре *in vitro*

Название праймера	Число полос			Размер амплифицированных фрагментов, bp
	анализированных	мономорфных	полиморфных	
G2-70-2	5	5	0	400-1510
G3-70-2	4	3	1	350-900
G4-70-1	7	7	0	400-1520
OPA-01	8	5	3	400-1180
UBC-347	5	4	1	400-1510

Каждый праймер генерировал продукты амплификации, варьирующие по размеру от 350 bp (G3-70-2) до 1520 bp (G4-70-1). Максимальное число полос в геле продемонстрировал праймер OPA-01 (8 полос), минимальное – праймер G3-70-2 (4 полосы). RAPD-анализ позволил получить 29 полос, из них 24 мономорфных и 5 полиморфных. Уровень полиморфизма составил 17,3 %. Праймеры G2-70-2 и G4-70-1 дали идентичные RAPD-профили для опытных и контрольных образцов, в то время как праймеры UBC-347, G3-70-2 и OPA-01 продемонстрировали генетические отличия между изученными образцами. Наибольшее количество полиморфных полос (3 полосы) дал праймер

ОРА-01, а два других праймера (UBC-347, G3-70-2) генерировали по 1 полиморфной полосе (рисунок 2).



1-5 – ДНК растений-регенерантов, П – полевой образец, М – маркер 100 bp DNA Ladder (BioLabs)

Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов RAPD-PCR, ДНК-матрица представлена подвоем 62-396 с использованием праймера G2-70-2 (a) и праймера ОРА-01 (b).

Полученные отличия в спектрах амплифицированных фрагментов позволяют говорить о наличии генетических отличий между растениями, размножаемыми в культуре *in vitro* и в полевых условиях. Коэффициенты попарной генетической дистанции между растениями подвоя 62-396 варьировали от 0 до 0,17 (таблица 5).

Таблица 5 – Матрица генетической дистанции между размножаемыми *in vitro* и культивируемыми в поле растениями подвоя 62-396

	1*	2	3	4	5	П**
1	0,000000					
2	0,037037	0,000000				
3	0,037037	0,000000	0,000000			
4	0,000000	0,037037	0,037037	0,000000		
5	0,000000	0,037037	0,037037	0,000000	0,000000	
П	0,137931	0,172414	0,172414	0,137931	0,137931	0,000000
Примечания: *1-5 – растения, культивируемые <i>in vitro</i> ; **П – растения, культивируемые в полевых условиях.						

Как видно из данных, представленных в таблице 5, три изученных микробога были полностью генетически идентичны (образцы 1, 4 и 5) – коэффициент попарной генетической дистанции между ними составил 0 %. Микробога 2 и 3 так же были идентичны, однако отличались от образцов 1, 4 и 5 на 3,7 %. Очевидно, пять изученных образцов подвоя 62-396, культивируемого *in vitro*, были представлены двумя генетически различными клонами. Генетическая вариабельность в культуре *in vitro* была невысока и не превысила 3,7 %. В то же время все изученные микробога отличались от полевого образца (13,79-17,24 %).

Изучение генетической изменчивости клоновых подвоев яблони в условиях *in vivo*. Было предположено, что растения подвоя 62-396 демонстрируют вариабельность даже при выращивании в естественных условиях. Для подтверждения данного постулата использовали 5 праймеров. Каждый праймер генерировал продукты амплификации, варьирующие по размеру от 350 bp (G3-70-2) до 1900 bp (UBC-347). Максимальное число полос в геле продемонстрировали праймеры G4-70-1 и OPA-01 (9 полос), минимальное – праймер G2-70-2 (2 полосы). RAPD-анализ позволил получить 38 полос, из них 31 мономорфную и 7 полиморфных. Уровень полиморфизма составил 18,42 %. Праймеры G2-70-2 и G4-70-1 дали идентичные RAPD-профили для всех образцов, в то время как праймеры G3-70-2, OPA-01 и UBC-347 продемонстрировали генетические отличия между изученными образцами. Наибольшее количество полиморфных полос (4 полосы) дал праймер OPA-01 (таблица 6).

Таблица 6 – Число и размер полос, генерируемых праймерами на основе ДНК-матрицы подвоя 62-396, размножаемого *in vivo*

Название праймера	Число полос			Размер амплифицированных фрагментов, bp
	анализированных	мономорфных	полиморфных	
G2-70-2	5	5	0	540-1560
G3-70-2	8	6	2	350-1580
G4-70-1	9	9	0	400-1540
OPA-01	9	5	4	400-1750
UBC-347	7	6	1	700-1900

Полученные отличия в спектрах амплифицированных фрагментов позволяют говорить о наличии генетических отличий между растениями. Коэффициенты попарной генетической дистанции между растениями подвоя 62-396 варьировали от 0 до 0,18 (таблица 7).

Таблица 7 – Матрица генетической дистанции между размножаемыми в поле растениями подвоя 62-396

	1	2	3	4	5
1	0,000000				
2	0,000000	0,000000			
3	0,000000	0,000000	0,000000		
4	0,052632	0,052632	0,052632	0,000000	
5	0,184211	0,184211	0,184211	0,131579	0,000000

Как видно из данных, представленных в таблице 7, три изученных побега (образцы 1, 2, 3) были генетически идентичны – коэффициент попарной генетической дистанции между ними составил 0 %. Образец 4 незначительно отличался от образцов 1, 2, 3 – величина дистанции была 0,05. В то же время образец 5 продемонстрировал значительные генетические отличия от прочих изученных образцов: величина генетической дистанции между ним и группой 1, 2, 3 составила 0,18, а между ним и образцом 4 – 0,13. Очевидно, можно считать, что изученные побеги подвоя 62-396, выращиваемого на поле, были представлены тремя генетически различными клонами.

Следует отметить, что полученные нами данные позволяют судить лишь об уровне генетической вариабельности *отдельных локусов* ДНК (последовательности которых комплементарны использованным праймерам), но не являются мерой изменчивости растения в целом. Таким образом, мы можем судить, возрастает или уменьшается вариабельность в тех или иных условиях, но не можем на основании полученных данных оценить, какой процент генома подвергся изменениям.

ВЫВОДЫ

RAPD-анализ генетической изменчивости подвоя яблони 62-396, выращиваемого в культуре *in vitro* в условиях нормальной вегетации в течение 5 лет, позволил установить 17,3 % полиморфизма (праймеры G2-70-2, G3-70-2, G4-70-1, OPA-01, UBC-347; 29 полос, из них 24 мономорфных и 5 полиморфных).

Среди растений, пассажируемых на питательных средах в течение 6 месяцев, была так же обнаружена генетическая изменчивость образцов – 33,3 %. Таким образом, степень вариабельности подвоя 62-396 снижалась при длительном культивировании по сравнению с начальными этапами выращивания *in vitro*.

Уровень полиморфизма подвоя 62-396 в условиях *in vivo* (в поле) составил 18,42 %, что сопоставимо с уровнем полиморфизма после 5 лет культивирования *in vitro* (17,3 %), но значительно ниже, чем на начальных этапах культивирования *in vitro* (33,3 %).

Литература

1. Положение о производстве посадочного материала плодовых и ягодных культур в Республике Беларусь / РУП «Институт плодоводства»; сост.: В.А. Самусь, Н.В. Кухарчик. – Самохваловичи, 2007. – 32 с.
2. Высоцкий, В.А. Клональное микроразмножение плодовых растений и декоративных кустарников / В.А. Высоцкий // Микроразмножение и оздоровление растений в промышленном плодоводстве и цветоводстве: сб. науч. тр. / ВНИИ садоводства им. И.В. Мичурина; редкол.: Н.И. Савельев (гл. ред.) [и др.]. – Мичуринск, 1989. – С. 3-8.
3. Высоцкий, В.А. О генетической стабильности при клональном микроразмножении плодовых и ягодных культур / В.А. Высоцкий // Сел.-хоз. биол. – 1995. – № 5. – С. 57-63.
4. Высоцкий, В.А. Появление уклоняющихся форм в процессе клонального микроразмножения растений / В.А. Высоцкий // VII International Conference “The Biology of Plant Cells *In vitro* and Biotechnology”: ABSTRACTS (Saratov, september 9-13, 2003) / Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, Саратовский государственный университет, Общество физиологов растений России; редкол.: А.М. Носов [и др.]. – Saratov, 2003. – P. 357.

5. Кунах, В.А. Особенности культуры изолированных тканей растений как клеточной популяции в связи с перспективой применения её в генетике и селекции / В.А. Кунах // Экспериментальная генетика растений. – 1977. – С. 112-113.

6. Кунах, В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений и факторы, регулирующие этот процесс / В.А. Кунах // Цитология и генетика. – 1980. – Т. 14, № 1. – С. 73-81.

7. Кунах, В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 2. Изменчивость в природе / В.А. Кунах // Биополимеры и клетка. – 1995. – Т. 11, № 6. – С. 5-40.

8. Кунах, В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 3. Каллусообразование *in vitro* / В.А. Кунах // Биополимеры и клетка. – 1997. – Т. 13, № 5. – С. 362-371.

9. Кунах, В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 4. Изменчивость в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* / В.А. Кунах // Биополимеры и клетка. – 1998. – Т. 14, № 4. – С. 298-319.

10. Кунах, В.А. Изменчивость популяционно-генетических параметров в культуре клеток растений / В.А. Кунах // VII International Conference “The Biology of Plant Cells *In vitro* and Biotechnology”: ABSTRACTS (Saratov, september 9-13, 2003) / Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, Саратовский государственный университет, Общество физиологов растений России; редкол.: А.М. Носов [и др.]. – Saratov, 2003. – P. 169.

11. Острейко, С.А. О генетической и фенотипической стабильности при культуре растений *in vitro* / С.А. Острейко, Э.М. Дроздовский // Плодоовощное хозяйство. – 1987. – № 12. – С. 30-31.

12. Zimmerman, R.H. Orchard variation in micropropagated trees of ‘Redspur delicious’ apple / R.H. Zimmerman // HortScience. – 1997. – V. 32, No. 5. – P. 935-936.

13. Rice, R.D. Micropropagation: principles and commercial practice / R.D. Rice [et al.] // Plant biotechnology, comprehensive biotechnology, second gupplement. – 1992. – P. 129-149.

14. Муромцев, Г.С. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г.С. Муромцев [и др.]. – М.: Агропромиздат, 1990. – 384 с.

15. Налобова, Ю.М. Генетическая природа спонтанной соматической изменчивости картофеля по признаку вирусоустойчивости / Ю.М. Налобова // Генетика и селекция на рубеже XXI века: сб. работ молодых учёных / НАН Беларуси, Ин-т генетики и цитологии; отв. ред. Н.А. Картель. – Мн., 1999. – С. 55-57.

16. Семакин, В.П. Генетическая природа почковых мутаций / В.П. Семакин // Садоводство. – 1978. – № 12. – С. 34-36.

17. Гостимский, С.А. Использование молекулярных маркеров для анализа генома растений / С.А. Гостимский, З.Г. Кокаева, В.К. Боброва // Генетика. – 1999. – Т. 35, № 11. – С. 1538-1549.

18. Козыренко, М.М. Анализ генетической изменчивости каллусных культур некоторых видов рода *Iris L.* / М.М. Козыренко [и др.] // Биотехнология. – 2002. – № 4. – С. 38-48.

19. Жабровский, И.Е. Районированные и перспективные подвои яблони в Республике Беларусь / И.Е. Жабровский [и др.] // Актуальные проблемы освоения достижений науки в промышленном плодоводстве: материалы междунар. науч.-практ. конф. (пос. Самохваловичи, 21-22 августа 2002 года) / БелНИИ плодоводства; редкол.: В.А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Мн., 2002. – С. 59-63.

20. Сорты плодовых, ягодных, орехоплодных культур и винограда, включённые в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород и находящиеся на испытании в Государственной инспекции по испытанию и охране сортов растений / РУП «Институт плодоводства». – Самохваловичи, 2013. – 32 с.

21. Филогения видов яблони рода *Malus* на основе оценки морфологических признаков и молекулярного анализа ДНК / А.В. Фортэ [и др.] // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 10. – С. 1357-1369.

RAPD ANALYSIS OF GENETIC VARIABILITY OF 62-396 APPLE ROOTSTOCK AT IN VITRO AND IN VIVO CULTIVATING

A.A. Zmushko, N.N. Volosevich, N.V. Kukharchik

ABSTRACT

The research work was accomplished in the biotechnology department of the Institute for Fruit Growing in 2010-2011. The RAPD analysis of genetic variability of apple clonal rootstock 62-396 cultivated in vivo and in vitro (for 5 years and for 6 months) was accomplished. 5 oligonucleotide primers out of 40 tested demonstrated spectrum of discrete and clearly identifiable bands on agarose gel. It was established that the rootstock 62-396 at primary stages of micropropagation (6 months) had larger polymorphism rate (33.3 %) than after a cultivation in vitro for 5 years (17.3 %). Analysis of 62-396 plants cultivating in the field also demonstrated genetic variability of the studied samples (polymorphism rate made 18.42 %).

Key words: RAPD, genetic instability, somaclonal variability, clonal apple rootstock, in vitro culture, Belarus.

Дата поступления статьи в редакцию 28.03.2012