

УДК 634.11:631.541.11]:581.143.6:575.2

RAPD-АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ КЛОНОВОГО ПОДВОЯ ЯБЛОНИ 54-118 ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

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

РУП «Институт плодоводства»,

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

e-mail: belhort@it.org.by

РЕЗЮМЕ

Был проведён RAPD-анализ генетической изменчивости растений подвоя 54-118, культивируемых в условиях *in vitro* в течение 5 лет, а также растений, выращиваемых в полевых условиях. Оптимизирована схема проведения ПЦР-реакции для получения максимально чёткой картины распределения амплифицированных фрагментов ДНК в геле. Из 40 олигонуклеотидных праймеров были отобраны 9, которые дали спектр хорошо различимых полос. В результате проведенных исследований была установлена 100%-ная идентичность между образцами ДНК подвоев, полученных методом клонального микроразмножения и выращенных в полевых условиях. Из 56 проанализированных полос все были мономорфными. Клональное микроразмножение подвоя 54-118 не привело к возрастанию уровня изменчивости, которую можно было бы детектировать методом RAPD.

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

ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире маточники закладываются материалом, размноженным в культуре *in vitro*. Отмечено, что с размноженных в культуре тканей маточных растений получают в 2 раза больше саженцев, причем их качество выше, чем у подвоев, полученных с материнских растений, размноженных традиционными способами. Такая тенденция сохраняется в последующие годы эксплуатации маточника. Высокое качество таких маточников оправдывает материальные затраты [1].

Однако, как известно, в культуре *in vitro* уровень генетической изменчивости размножаемых растений может возрастать [2, 3, 4]. Это объясняется наличием в среде регуляторов роста, стрессовыми условиями инициации культуры *in vitro*, нарушением организменного контроля за генотипически отличающимися от нормы клетками, а также запрограммированными в клетке процессами, индуцируемыми травмой, и приводящими к ювенилизации генома, необходимого для выживания повреждённого растения [5-10].

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].

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 [13, 14, 15]. 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 [16, 17]. С помощью RAPD-анализа выявляется значительно большее число генетических различий, нежели обнаруживается при фенотипическом и генетическом анализе соматоклонов [16].

Информация о генетической изменчивости подвоев яблони необходима для их успешного размножения в культуре *in vitro* и получения однородного материала. Исследований генетической стабильности в культуре *in vitro* клоновых подвоев яблони, районированных в Беларуси, до этого не проводилось.

Целью данной работы было оценить генетическую стабильность клонового подвоя яблони 54-118 при длительном культивировании в условиях *in vitro* методом RAPD-PCR.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследований был полукарликовый подвой яблони 54-118 селекции Плодоовощного института им. И.В. Мичурина. Зимостойкость надземной и корневой систем высокая. К парше относительно устойчив. В маточнике хорошо размножается вертикальными отводками, на дерново-подзолистых среднесуглинистых почвах даёт до 90 тыс. шт./га стандартных отводков, на которых, как правило, образуются корни вторичного строения. При размножении зелёными черенками в условиях искусственного тумана укореняется на 84-90 %. В питомнике приживается хорошо, проявляет хорошую совместимость с сортами, в среднем даёт 27-33 тыс. шт./га стандартных саженцев. По силе роста деревья на этом подвое среднерослые. В период плодоношения вступают рано, на 3-4-й год после посадки [18, 19].

Для анализа генетической стабильности выделили 6 образцов ДНК: генетический материал подвоя, культивируемого в полевых условиях (1 образец), и генетический материал подвоя, размножаемого в условиях *in vitro*, в течение 5 лет (5 образцов ДНК). 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.

Нарезку растительной ткани весом 50 мг (листья или очищенные от чешуй почки) помещали в эппендорфы объёмом 1 мл. Добавляли 200 мкл стерильной воды, растительную ткань гомогенизировали, к полученной смеси добавляли 400 мкл Lysis solution, эппендорфы помещали в термостат и инкубировали в течение 50 минут при 65 °С. Содержимое эппендорфов перемешивали переворачиванием каждые 10 минут.

Сразу после нагревания к содержимому эппендорфов добавляли 600 мкл хлороформа, содержимое аккуратно перемешивали переверачиванием (3-5 раз); эппендорфы центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 2 минут.

Рабочий раствор Precipitation solution готовили путём смешивания 720 мкл стерильной деионизированной воды с 80 мкл 10х-концентрированного раствора.

Верхнюю фазу после центрифугирования отбирали дозатором и переносили в эппендорфы, содержащие 800 мкл свежеприготовленного Precipitation solution. Аккуратно перемешивали переверачиванием в течение 1-2 минут и центрифугировали 14 минут при 10 000 об/мин.

Супернатант сливали, осадок ДНК растворяли в 100 мкл 1,2 М NaCl аккуратным встряхиванием. В раствор добавляли 300 мкл холодного 90%-ного этанола и оставляли на ночь. Затем смесь центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 14 минут. Сливали надосадочную жидкость и позволяли этанолу испариться. Промывали осадок в 70%-ном холодном этаноле. Растворяли осаждённую ДНК в 50 мкл Hydration solution.

Наличие ДНК в полученном растворе проверяли при помощи электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Полученные образцы ДНК хранили при температуре +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 объём 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 число 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. [20], а также 30 десятинуклеотидных 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 54-118.

Для дальнейшей работы были отобраны 9 праймеров (G4-70-1, G3-70-2, G2-70-2, OPA-01, OPD-20, OL15, OL16, OL17, OL27), которые дали спектр хорошо различимых полос (таблица 1).

Таблица 1 – Праймеры, отобранные для оценки генетической стабильности подвоя яблони 54-118

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Источник
G4-70-1	GCCCCTCTTG	А.В. Фортэ и др. [20]
G3-70-2	GCTCTCCGTG	
G2-70-2	GGCCTACTCG	
OPA-01	CAGGCCCTTC	
OPD-20	ACCCGGTCAC	
OL15	AGTTCCGCGA	Собственная разработка
OL16	AACCCTTCCC	
OL17	CTGCAATGGG	
OL27	GGCTGCGACA	

Оптимизация условий проведения ПЦР

Для получения однозначно интерпретируемых результатов необходимо получение максимально чёткой картины распределения амплифицированных ПЦР-фрагментов в геле. Поскольку при подборе праймеров не всегда удавалось получить картину удовлетворительного качества, была предпринята попытка модифицирования отдельных этапов RAPD-анализа.

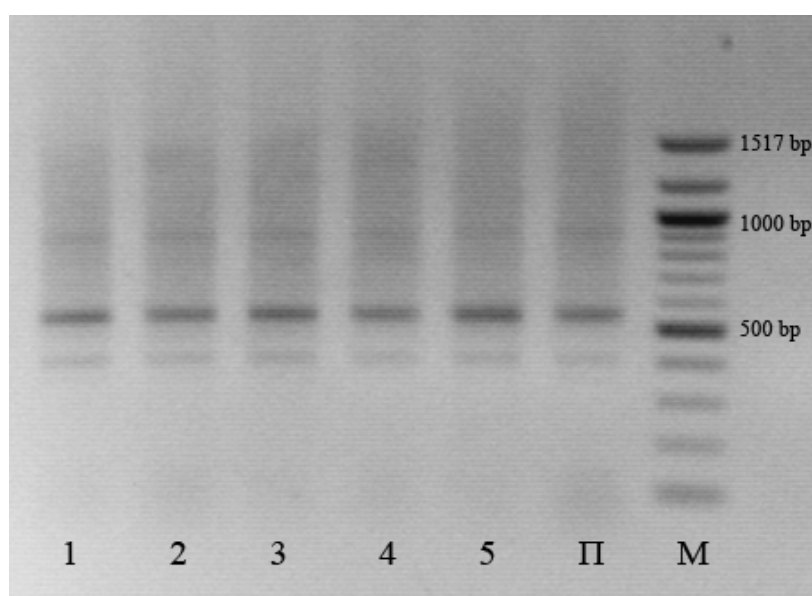
Увеличение числа циклов с 35 до 40 не привело к увеличению чёткости изображения, однако потребовало значительного увеличения времени, необходимого для ПЦР-реакции. Увеличение концентрации Taq-полимеразы не сделало картину более чёткой, напротив, изображение стало более размытым. Увеличение времени элонгации при 72 °С с 1 минуты до 1,5 минут позволило добиться большей чёткости амплифицированных фрагментов, поэтому данная модификация использовалась в дальнейших исследованиях.

Анализ генетической стабильности

RAPD-PCR проводили с использованием 9 праймеров (таблица 2). Каждый праймер генерировал продукты амплификации размером от 310 bp (OPD-20) до 1900 (OL15). Максимальное число полос в геле продемонстрировал праймер OPA-01 (11 полос), минимальное – праймер G3-70-2 (3 полосы). Суммарно было оценено 56 амплифицированных полос, все они оказались мономорфными (рисунок). Все изученные праймеры демонстрировали идентичные RAPD-профили, что указывает на отсутствие варибельности между *in vitro* и полевыми растениями.

Таблица 2 – Общее число, размер и число полиморфных полос, генерируемых праймерами на основе ДНК-матрицы подвоя 54-118, размножаемого в полевых условиях и в культуре *in vitro*

Название праймера	Число анализируемых полос	Число мономорфных полос	Число полиморфных полос	Размер амплифицированных фрагментов, bp
G2-70-2	7	7	0	400-1520
G3-70-2	3	3	0	400-900
G4-70-1	7	7	0	660-1510
OPA-01	11	11	0	270-1750
OPD-20	5	5	0	310-850
OL15	8	8	0	320-1900
OL16	4	4	0	510-1480
OL17	6	6	0	800-1350
OL27	5	5	0	500-1320



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

Рисунок – Электрофореграмма продуктов RAPD-PCR с использованием праймера G3-70-2, ДНК-матрица представлена подвоем 54-118.

Согласно данным литературных источников, культура *in vitro* способна привести к возрастанию геномной нестабильности в силу ряда факторов (воздействие внешних стрессовых факторов, индукция геномных перестроек) [8, 9, 10].

Соматональная вариабельность в условиях *in vitro* в среднем составляет от 1 до 3 %. Данная частота разительно отличается от уровня мутабельности, наблюдаемого в естественных условиях (от 1 на 100.000 до 1 на 1.000.000 для одного локуса) [21]. Однако для различных культур, форм и сортов частота соматональной вариабельности может значительно различаться.

Так, в статье R.A. Menendez *et al.* [22] указано, что изоферментный анализ продемонстрировал отличие культивируемых *in vitro* подвоев яблони EMLA7 и MAC9 от материнских клонов. Аналогично, G. Martelli *et al.* [23] были получены различающиеся изоферментные спектры внутри одних и тех же клонов у подвоев яблони M26, MM106, MM111 и M9, растущих *in vivo* и *in vitro*. O. McMeans *et al.* [24] сообщают, что у растений яблони из семьи «Gala» были обнаружены соматональные вариации по морфологическим признакам и продуктивности.

С другой стороны, в статье V. Negri и N. Tosti [25] утверждается, что RAPD-анализ не показал генетической изменчивости для культивируемых *in vitro* сортов яблони (небольшая вариабельность наблюдалась только у депонированных растений).

В том, что касается наших исследований, отсутствие полиморфных полос в геле, очевидно, свидетельствует о низком уровне мутабельности данного подвоя. Длительное (5 лет) культивирование растений подвоя 54-118 в условиях *in vitro* не оказывает негативного влияния на генетическую стабильность растений-регенерантов. Подвой 54-118 оказался генетически стабильным (он продемонстрировал 100 % идентичности между культуральными и полевыми образцами).

ВЫВОДЫ

Установлен перечень праймеров (G4-70-1, G3-70-2, G2-70-2, OPA-01, OPD-20, OL15, OL16, OL17, OL27), которые могут быть использованы для изучения соматональной вариабельности клонового подвоя яблони 54-118 методом RAPD-анализа. Оптимизирована схема проведения ПЦР-реакции для получения максимально четкой картины распределения амплифицированных фрагментов ДНК в геле.

RAPD-PCR анализ продемонстрировал 100%-ную идентичность между культуральными и полевыми образцами подвоя 54-118. Из 56 проанализированных полос все были мономорфными.

Клональное микроразмножение подвоя 54-118 не привело к возрастанию уровня изменчивости, которую можно было бы детектировать методом RAPD.

Разработанная схема RAPD-PCR позволила оценить генетическую изменчивость клонового подвоя 54-118 и может быть использована для разработки методических рекомендаций по выращиванию микропобегов в культуре *in vitro*.

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 И.В. Мичурина; редкол.: Е.П. Куминов (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 // С.-х. биол. – 1995. – № 5. – С. 57-63.
4. Высоцкий, В.А. Появление уклоняющихся форм в процессе клонального микроразмножения растений / В.А. Высоцкий // *The Biology of Plant Cells In vitro and Biotechnology*: рефераты VIII Междунар. конф., Саратов, 9-13 сент. 2003 г. / Ин-т фи-

зиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; редкол.: А.М. Носов [и др.]. – Саратов, 2003. – С. 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 // The Biology of Plant Cells *In vitro* and Biotechnology: рефераты VIII Междунар. конф., Саратов, 9-13 сент. 2003 г. / Ин-т физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; редкол.: А.М. Носов [и др.]. – Саратов, 2003 – С. 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. Муромцев, Г.С. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г.С. Муромцев [и др.]. – М.: Агропромиздат, 1990. – 384 с.

14. Налобова, Ю.М. Генетическая природа спонтанной соматической изменчивости картофеля по признаку вирусостойчивости / Ю.М. Налобова // Генетика и селекция на рубеже XXI века. – Мн., 1999. – С. 55-57.

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

16. 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.

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

18. 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 г. / БелНИИ плодоводства; редкол.: В.А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Мн., 2002. – С. 59-63.

19. Выращивание саженцев плодово-ягодных культур / А.Ф. Радюк [и др.]. – Мн.: Ураджай, 1991. – 254 с.

20. 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.

21. Skirvin, R.M. Sources and frequency of somaclonal variation / R.M. Skirvin, K.D. McPheeters, M. Norton // HortScience. – 1994. – V. 29 (11). – P. 1232-1237.
22. Menendez, R.A. Identification of apple rootstock cultivars by isozyme analysis / R.A. Menendez, F.E. Larsen, R. Jr.Fritts // J Amer Soc Hort Sci. – 1986. – № 3. – P. 251.
23. Isozymic analysis of somaclonal variation among regenerants from apple rootstock leaf tissue / G. Martelli [et al.] // Acta Hort. – 1993. – № 336. – P. 411.
24. Assessment of tissue culture-derived 'Gala' and 'Royal Gala' apples. (*Malus × domestica* Borkh.) for somaclonal variation / O. McMeans [et al.] // Euphytica. – 1998. – № 103. – P. 251.
25. Negri, V. Genetic stability of micropropagated and slow growth cultured shoots of apple genotypes / V. Negri, N. Tosti // Annali- dalla- Facolta- di- Agraria. University- deglistwadi-di-Perugia. – 2001. – № 53. – P. 71.

THE RAPD ANALYSIS OF GENETIC STABILITY OF 54-118 APPLE CLONAL ROOTSTOCK CULTIVATED IN VITRO

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

The RAPD analysis of genetic variability of apple clonal rootstock 54-118 cultivated in vitro for 5 years and in field was accomplished. The scheme of RAPD-PCR was optimized to get a clear pattern of DNA amplified fragments in gel. 9 oligonucleotide primers out of 40 tested demonstrated spectrum of discrete and clearly identifiable bands on agarose gel. 100% of genetic similarity between culture and field samples was demonstrated. All 56 analyzed bands were monomorphic. Micropropagation of 54-118 rootstock didn't result in increase of variability level which would be possible to detect by RAPD analysis.

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

Дата поступления статьи в редакцию 11.04.2012