

УДК 634.734/737:631.52

Т. Н. БОЖИДАЙ, Н. Н. ВОЛОСЕВИЧ, Н. В. КУХАРЧИК

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ РАСТЕНИЙ ГОЛУБИКИ СОРТА DUKE, ПОЛУЧЕННЫХ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Институт плодородства, аг. Самохваловичи, Беларусь, e-mail: tanya_bozhidaj@mail.ru

(Поступила в редакцию 16.12.2014)

Введение. Голубика высокорослая является ценной ягодной культурой как в биологическом, так и экономическом отношении, а в результате многолетних исследований была доказана перспективность ее выращивания в условиях Беларуси.

В последнее время для получения посадочного материала голубики все большее значение приобретает использование метода культуры тканей [1, 2]. Для крупномасштабного производства эффективность используемых методов размножения имеет большое значение, однако более важным является получение генетически однородного посадочного материала. Установлено, что культивирование *in vitro* может индуцировать генетическую (соматоклональную) изменчивость у растений вследствие влияния различных факторов (типа экспланта, состава питательных сред, длительности культивирования и др.) [3–5]. Следовательно, необходимо проводить анализ генетической стабильности растений, полученных в культуре *in vitro*, с целью подтверждения качества посадочного материала.

Наиболее простым, экономичным и достаточно надежным среди целого ряда молекулярных методов, используемых для оценки генетической стабильности растений, является RAPD-анализ (*random amplified polymorphic DNA*), основанный на полимеразной цепной реакции (PCR) с использованием случайных праймеров [6–9]. При этом следует отметить, что комбинирование нескольких видов генетического анализа может использоваться для более плотного покрытия генома исследуемых растений [7, 8]. Однако окончательный выбор метода анализа определяется исходя из оснащенности лаборатории необходимым оборудованием.

Цель исследования – оценить генетическую стабильность растений голубики сорта Duke, полученных в культуре *in vitro*.

Материалы и методы исследований. Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодородства» в 2012–2014 гг. В качестве объекта исследований были выбраны растения голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum* L.) сорта Duke. Данный сорт включен в Государственный реестр сортов, допущенных к использованию на территории Республики Беларусь, в 2008 г. [10]. Для анализа генетической стабильности были выделены образцы ДНК пяти клонов голубики сорта Duke, полученных с использованием культуры тканей.

В качестве эксплантов голубики на этапе введения использовали вегетативные почки, которые культивировали в течение 4 недель на агаризованной питательной среде WPM [11] с добавлением витаминов: В₁ – 1,0 мг/л, В₆ – 0,5 мг/л, РР – 0,5 мг/л, С – 1,0 мг/л, глицина – 2,0 мг/л, мезоинозита – 100 мг/л, зеатина – 2 мг/л и сахарозы – 30 г/л. Затем регенеранты культивировали на агаризованной питательной среде по прописи Debnath и McRae [12, 13] с добавлением витаминов: В₁ – 0,6 мг/л, В₆ – 0,4 мг/л, РР – 0,4 мг/л, глицина – 1,0 мг/л, мезоинозита – 100 мг/л, 2-изопентениладенина (2-iP) – 5,0 мг/л и сахарозы – 30 г/л. Стерилизацию сред проводили при давлении 0,9 атм. в течение 15 мин после введения в нее всех необходимых витаминов и физиологически активных веществ. Условия культивирования растений *in vitro*: освещение 2,5–3 тыс. лк, тем-

температура +21...+23 °C, фотопериод – 16/8 ч. Длительность субкультивирования – 4 недели. Весь этап микроразмножения составил 6 пассажей, после которого растения-регенеранты укореняли в условиях *ex vitro* на мхе *Sphagnum* L. со слоем верхового торфа (0,5 см) в мини-парниках 450 × 200 × 70 мм (расстояние между рядами – 10–15 мм, в ряду – 7–10 мм). Условия укоренения: освещение – 2,5–3 тыс. лк, температура – +20...+22 °C, фотопериод – 16/8 ч. Длительность культивирования – 4 недели.

В качестве контроля использовали ДНК, выделенную из маточного растения.

Методика выделения ДНК из растений. Для выделения ДНК использовали коммерческий набор NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL). Выделение проводили в соответствии с методическими указаниями фирмы-производителя.

Вначале 50 мг растительного материала (листьев) растирали пестиком в ступке с жидким азотом до получения пудры. К измельченному материалу добавляли 400 мкл лизирующего буфера (PL1) и 10 мкл RNase A, продолжали растирать. Затем добавляли еще 100 мкл буфера PL1, растирали, после чего смесь переносили в микроцентрифужные пробирки (2 мл), интенсивно перемешивали при помощи Vortexer (Bio-Rad), затем инкубировали 10 мин при 65 °C.

Для удаления остатков нелизированных клеток лизат переносили на фильтрационные колонки (в 2 мл микроцентрифужных пробирках) и центрифугировали 2 мин при 10 000 об/мин.

К очищенному лизату добавляли 450 мкл буфера PC, интенсивно перемешивали при помощи Vortexer (Bio-Rad). Затем смесь переносили на поверхность связывающих колонок (в микроцентрифужных пробирках 2 мл) и центрифугировали 1 мин при 10 000 об/мин для связывания ДНК.

Далее осуществляли трехкратное промывание мембраны связывающих колонок: 1) добавляли 400 мкл буфера PW1, центрифугировали 1 мин при 10 000 об/мин; 2) добавляли 700 мкл буфера PW2, центрифугировали 1 мин при 10 000 об/мин; 3) добавляли 200 мкл буфера PW2, центрифугировали 2 мин при 10 000 об/мин. Дополнительный этап центрифугирования (1 мин при 10 000 об/мин) использовали для удаления остатков промывающего раствора с мембран колонок.

Элюирование ДНК проводили путем добавления 50 мкл буфера PE (разогретый до 65 °C), инкубирования при 65 °C в течение 5 мин и центрифугирования при 10 000 об/мин в течение 1 мин.

Качество выделения ДНК проверяли при помощи электрофореза в 1%-ном агарозном геле и 1× TAE-буфере (Bio-Rad).

Методика проведения ПЦР-анализа. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала milliQ воду, 1× Taq-буфер (Thermo Scientific), 1,5 mM MgCl₂ (Thermo Scientific), 0,2 mM смеси dNTP (Thermo Scientific), 0,2 мкМ праймера, 1,5 ед. Taq-полимеразы (Thermo Scientific), 50 нг ДНК.

PCR-реакцию проводили на амплификаторе iCycler® 3.032 (Bio-Rad) при следующих заданных параметрах: 1 цикл: 94 °C – 5 мин; 35 циклов: 94 °C – 30 с, 36 °C – 30 с, 72 °C – 2 мин; 1 цикл: 72 °C – 10 мин.

Продукты амплификации разделяли при помощи электрофореза в 1%-ном агарозном геле и 1× TAE-буфере (Bio-Rad). Результаты электрофореза анализировали с помощью аппаратного обеспечения Gel Doc™ EQ System (Bio-Rad) и пакета программ Quantity One® (Bio-Rad).

Размер и число амплифицированных фрагментов генома растений голубики анализировали после проведения полимеразной цепной реакции с RAPD-праймерами.

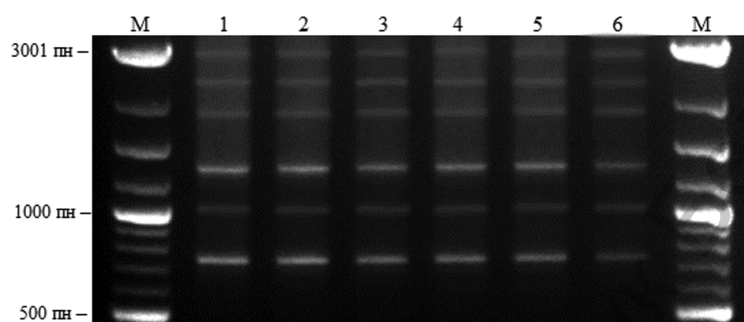
Результаты и их обсуждение. При проведении RAPD-анализа одним из основных моментов является подбор праймеров, которые будут давать стабильные наборы RAPD-спектров.

Предварительная оценка эффективности использования 54 олигонуклеотидных праймеров для амплификации фрагментов генома маточного растения голубики сорта Duke позволила отобрать 6 наиболее информативных праймеров (OPA 01, OPA 10, OPE 3, OPN 14, OL 1, OL 8), дающих максимальное количество хорошо различимых и пригодных для анализа полос (табл. 1).

Использование 6 отобранных праймеров для RAPD-анализа каждого из растений голубики сорта Duke позволило получить 40 различных полос, что составило в среднем 6,7 полосы на праймер (табл. 2). Число ампликонов в RAPD-спектрах в зависимости от используемого праймера варьировало от 6 (OPA 10, OPE 3, OL 1) до 9 (OPA 01). Анализ длины амплифицированных фрагментов генома голубики показал, что размеры продуктов амплификации варьировали от 400 пн (OPA 01) до 3000 пн (OPA 01, OPA 10, OL 1). Сравнение RAPD-спектров, генерированных

Таблица 1. Праймеры, отобранные для оценки генетической стабильности растений голубики

Название праймера	Нуклеотидная последовательность (5'–3')	Источник
OPA 01	CAGGCCCTTC	S.C. Debnath [14]
OPA 10	GTGATCGCAG	
OPE 3	CCAGATGCAC	А. В. Пикунова [15]
OPN 14	TCGTGCGGGT	
OL 1	GGCGCGTTAG	Разработка отдела
OL 8	AGACGATGGG	



RAPD-спектры маточного растения и клонов голубики сорта Duke, полученные с использованием праймера OL 1: М – маркер 2-Long DNA Ladder (BioLabs); 1 – маточное растение; 2–6 – клоны

Таблица 2. Число и размер полос, генерированных праймерами на основе ДНК-матриц маточного растения и клонов голубики сорта Duke

Название праймера	Число анализируемых полос	Общее число полос	Размер амплифицированных фрагментов, пн
OPA 01	9	54	400–3000
OPA 10	6	36	500–3000
OPE 3	6	36	500–1350
OPN 14	7	42	600–2500
OL 1	6	36	700–3000
OL 8	6	36	500–2017
Итого	40	240	–

с использованием ДНК маточного растения и его 5 клонов, полученных методом культуры тканей, показало их полную идентичность (рисунок).

Оценка генетической стабильности растений голубики сорта Duke основывалась на анализе в общей сложности 240 RAPD-полос (табл. 2), и все они оказались мономорфными. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об отсутствии генетической вариабельности при микроразмножении растений голубики сорта Duke по приведенной методике.

Представленные данные согласуются с ранее опубликованными результатами ряда исследователей по генетической стабильности растений, полученных с использованием культуры тканей. Так, грамотно подобранные условия размножения растений в культуре *in vitro* позволяют избежать возникновения генетической изменчивости и получить большое количество генетически однородного посадочного материала в сравнительно короткий срок [6–8].

Заключение. В ходе проведенных исследований оценена возможность использования 54 олигонуклеотидных праймеров для RAPD-анализа генетической стабильности растений голубики сорта Duke и отобраны 6 праймеров (OPA 01, OPA 10, OPE 3, OPN 14, OL 1, OL 8), дающие максимальное количество хорошо различимых полос.

Данные проведенного RAPD-анализа с отобранными праймерами свидетельствуют об отсутствии вариабельности между маточным растением и клонами голубики сорта Duke и о возможности использования приведенной схемы микроразмножения для получения генетически однородного посадочного материала.

Литература

1. Debnath, S. C. Propagation of *Vaccinium in vitro*: a review / S. C. Debnath // International Journal of Fruit Science. – 2006. – Vol. 6, N 2. – P. 47–71.
2. Debnath, S. C. Propagation and cultivation of *Vaccinium* species and less known small fruits / S. C. Debnath // *Vaccinium* ssp. and less known small fruit: challenges and risks: international scientific conference, Jelgava, 6–8 October 2009 / Latvia University of Agriculture; ed.: A. Adamovics [et al.]. – Jelgava, 2009. – P. 22–29.
3. Rani, V. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal / V. Rani, S. N. Raina // *In vitro* Cellular and Developmental Biology – Plant. – 2000. – Vol. 36, N 5. – P. 319–330.
4. Высоцкий, В. А. О генетической стабильности при клональном микроразмножении плодовых и ягодных культур / В. А. Высоцкий // Сельскохозяйственная биология. – 1995. – № 5. – С. 57–63.
5. Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures / M. I. Zucchi [et al.] // Genetics and Molecular Biology. – 2002. – Vol. 25. – P. 91–96.
6. Assessment of genetic stability and fidelity of some micropropagated *Vitis vinifera* L. “Feteasca neagra” clones by ampelometric and RAPD markers / R. N. Gheorghe [et al.] // Bulletin UASVM Horticulture. – 2009. – Vol. 66, N 1. – P. 51–57.
7. Evaluation of the genetic fidelity of *in vitro*-propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers / R. Bhatia [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2011. – Vol. 104, N 1. – P. 131–135.
8. Martins, M. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers reappraisal / M. Martins, D. Sarmento, M. M. Oliveira // Plant Cell Reports. – 2004. – Vol. 23, N 7. – P. 492–496.
9. Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture *in vitro* / A. Gajdosova [et al.] // Journal of Fruit and Ornamental Plant Research. – 2006. – Vol. 14. – P. 103–119.
10. Государственный реестр сортов / отв. ред.: В. А. Бейня. – Минск, 2014. – С. 83–84, 152–153.
11. Lloyd, G. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture / G. Lloyd, B. McCown // Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society. – 1980. – Vol. 30. – P. 421–427.
12. Debnath, S. C. *In vitro* culture of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.): the influence of cytokinins and media types on propagation / S. C. Debnath, K. B. McRae // Small Fruits Review. – 2001. – Vol. 1, N 3. – P. 3–19.
13. Debnath, S. C. Micropropagation of lingonberry: influence of genotype, explant orientation, and overcoming TDZ-induced inhibition of shoot elongation using zeatin / S. C. Debnath // HortScience. – 2005. – Vol. 40, N 1. – P. 185–188.
14. Debnath, S. C. An assessment of the genetic diversity within a collection of wild cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) clones with RAPD-PCR / S. C. Debnath // Genetic Resources and Crop Evolution. – 2007. – Vol. 54. – P. 509–517.
15. Пикунова, А. В. Оценка генетического разнообразия исходного и селекционного материала ягодных культур с помощью молекулярных маркеров: дис. ... канд. биол. наук: 06.01.05, 03.02.07 / А. В. Пикунова. – Орел, 2011. – 153 л.

T. N. BOZHYDAI, N. N. VOLOSEVICH, N. V. KUKHARCHIK

ANALYSIS OF THE GENETIC STABILITY OF *IN VITRO* PROPAGATED BLUEBERRY (CV. DUKE)

Summary

The efficiency of propagation methods is of great importance for large-scale production, but even more important is the genetic stability of *in vitro* propagated planting material. As a result of the research assessed is the possibility of using 54 oligonucleotide primers for the analysis of the genetic stability of *in vitro* propagated blueberry (cv. Duke) with RAPD-PCR. 6 primers (OPA 01, OPA 10, OPE 3, OPN 14, OL 1, OL 8) producing the maximum number of distinct bands has been selected. It's established that all RAPD profiles of micropropagated blueberry generated with these 6 primers are monomorphic and identical to those of the mother plant.