

УДК 575.224: 630*165.7

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛИНИЙ СОМАКЛОНАЛЬНЫХ ГЕНОТИПОВ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ И БЕРЕЗЫ ГИБРИДНОЙ

© 2014 г. А. В. Константинов, С. В. Пантелеев

Институт леса Национальной академии наук Беларуси

Республика Беларусь, 246001, Гомель, Пролетарская, 71

E-mail: avkonstantinof@mail.ru, stasikdesu@mail.ru

Поступила в редакцию 31.07.2014 г.

Сомаклональная изменчивость, возникающая в процессе культивирования микрорастений древесных растений *in vitro*, является потенциальным источником расширения генетического разнообразия. Для исследования отобраны 20 линий регенерантов клонов березы повислой и гибридной, отличающихся рядом морфологических особенностей и интенсивностью органогенеза. Для подтверждения сомаклональной природы изменчивости и составления генетических паспортов линий березы использовали набор из пяти праймеров. Среди образцов, полученных на основе клона гибридной березы (№ 52-84/8), изменения RAPD-спектров обнаружены по праймерам UBC-106 и UBC-254. Линии клона березы повислой (№ 6-161/3) различались по праймерам UBC-268 и UBC-154. По праймеру UBC-203 различий не выявлено.

Ключевые слова: сомаклональная изменчивость, береза повислая, береза гибридная, RAPD-анализ, генетический паспорт.

Традиционные методы лесной селекции заключаются в отборе перспективных форм древесных растений в естественных популяциях с последующим скрещиванием и испытанием полученного потомства. Они имеют ряд ограничений, связанных в основном с длительностью жизненного цикла и сложностью селекции по различным признакам (Любавская, 2007). Значительное повышение продуктивности создаваемых плантаций обеспечивается отбором материала для получения микрোকлональных культур в высокобонитетных насаждениях и сортоиспытательных участках, что позволяет реализовать возможность использования индуцированного мутагенеза для получения сомаклональных вариантов на основе клонов высокопродуктивных форм.

Частным случаем указанного метода является индукция сомаклональной вариативности растений-регенерантов генетической или эпигенетической природы, возникающая в процессе культивирования растительных тканей *in vitro* (Larkin, Scowcroft, 1981). Основными причинами указанного процесса

могут быть: источник эксплантов, его генотип, гормональный состав среды, продолжительность и физические условия культивирования. Вероятность образования сомаклональных вариантов существенно повышается в случае наличия стадии каллусогенеза в процессе культивирования (Лебедев и др., 2012). Выделяют следующие основные причины сомаклональной изменчивости: 1) реализация гетерогенности исходного материала (донорных эксплантов); 2) влияние условий культивирования; 3) клеточный отбор (Лутова, 2003).

Сохранение признака на протяжении ряда пассажей обуславливается генетической причиной какого-либо изменения в растениях, размножаемых в культуре тканей. Основными методами обнаружения сомаклональных изменений служат морфологическая оценка, цитологические исследования (кариотипирование, проточная цитометрия) и анализы с использованием молекулярных маркеров.

Цель работы – изучение регенерантов березы, полученных способом непрямого мор-

фогенеза молекулярно-генетическими методами и соматоклональной изменчивости в культурах тканей берез.

Для получения культур тканей березы повислой (клон № 6/161-3) и березы гибридной (клон № 52-84/8) применяли среду MS, дополненную фитогормонами 6-бензиламинопурином (6-БАП) в концентрации 5 мг·л⁻¹ и зеатином в концентрации 5 мг·л⁻¹, в качестве ауксина добавляли α-индолилмасляную кислоту (ИМК) – 0,4 мг·л⁻¹. Культивирование проводили при (23±1) °С в темноте на протяжении 2 нед., а затем на свету (около 2500 лк) для индукции морфогенетических процессов.

Растения изучаемых клонов, полученные в результате регенерации в разных каллусных культурах, отделяли и поддерживали в качестве отдельных линий с присвоением соответствующих номеров. В результате анализа морфометрических показателей и особенностей развития растений из 114 линий выделили 20 (по 10 для каждого клона), характеризующихся выраженной изменчивостью биоморфологических признаков, таких как скорость роста, интенсивность укоренения, характер закладки боковых побегов, степень развития листьев, образование базального каллуса и склонность к витрификации.

Для подтверждения соматоклональной природы выявленной изменчивости и ее характеристики выбран метод RAPD (произвольно амплифицированная полиморфная ДНК), состоящий из следующих этапов: выделения суммарной ДНК из растительных тканей модифицированным СТАВ-методом (Падутов и др., 2007); проведения ПЦР с использованием смеси (Fermentas, Литва) и набора праймеров согласно протоколу изготовителя. Электрофоретическое разделение продуктов полимеразной цепной реакции проводили в 1,4%-м агарозном геле. Для молекулярно-генетического анализа подобран набор из пяти олигонуклеотидных праймеров, ранее использовавшихся для анализа полиморфизма видов *Betula* spp. В табл. 1 представлены нуклеотидные последовательности праймеров («Oregon», США).

Визуализация продуктов электрофореза достигалась окрашиванием гелевых пластинок

Таблица 1. Структура RAPD-праймеров

№ п/п	Праймер	Структура праймера (5'-3')	Температура отжига, °С
1	UBC-106	CGTCTGCCCCG	43.0
2	UBC-154	TCCATGCCCGT	37.5
3	UBC-203	CACGGCGAGT	37.3
4	UBC-254	CGCCCCCATTT	44.9
5	UBC-268	AGGCCGCTTA	37.0

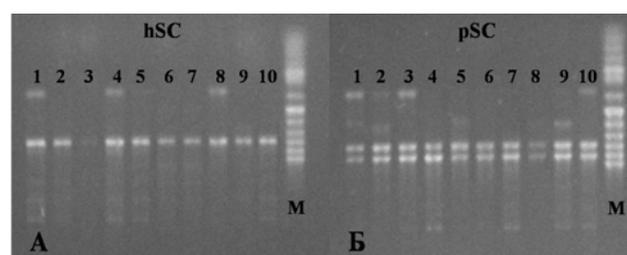
в растворе бромистого этидия. Фотодokumentирование продуктов электрофореза достигалось за счет видеосканирования в УФ-свете специальной системой Image Master («Amersham Pharmacia Biotech») (Westermeier, 2001). Расчет размеров электрофоретических фракций проводился при помощи программного обеспечения Quantity One («Bio-rad», США). Пример электрофоретических спектров линий соматоклональных вариантов изученных клонов представлен на рисунке.

По данным, полученным в результате анализа, составлены многолокусные генетические паспорта, представленные в табл. 2 и 3.

Линии соматоклональных регенерантов, полученных на основе клона гибридной березы № 52-84/8, характеризуются структурными перестройками, выраженными образованием дополнительных маркерных регионов либо элиминацией отдельных регионов, происходящей вследствие мутаций.

При анализе регенерантов линии рSC 2 клона № 6/161-3 по праймеру UBC-254 отмечена инсерция, в связи с чем маркерный регион, у исходного образца имеющий размер 590 п. н., увеличился до 610 п. н.

По праймеру UBC-268 выявлена мономорфность, однако в геномах растений линий рSC 1 – рSC 3 специфические RAPD-ло-



RAPD-спектр образцов березы по праймеру UBC-254. А – клон № 52-84/8 (линии hSC); Б – клон № 6/161-3 (линии pSC); м – маркер относительной молекулярной массы.

Таблица 2. Мультилокусный генетический паспорт исследуемых линий клона № 52-84/8 гибридной березы на основе анализа RAPD-спектров

Праймер	Зона, п. н.	№ линии соматоклональных вариантов									
		hSC 1	hSC 2	hSC 3	hSC 4	hSC 5	hSC 6	hSC 7	hSC 8	hSC 9	hSC 10
UBC-106	310	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	430	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	980	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
UBC-154	550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
UBC-203	330	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	620	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
UBC-254	350	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
	790	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
UBC-268	820	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	910	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Таблица 3. Мультилокусный генетический паспорт исследуемых линий клона № 6-161/3 березы повислой на основе анализа RAPD-спектров

Праймер	Зона, п. н.	№ линии соматоклональных вариантов									
		pSC 1	pSC 2	pSC 3	pSC 4	pSC 5	pSC 6	pSC 7	pSC 8	pSC 9	pSC 10
UBC-106	670	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	990	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
UBC-154	415	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	590	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	890	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
UBC-203	330	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	490	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
UBC-254	380	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
	590	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
	790	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
UBC-268	940	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

кусы в диапазоне 500–550 п. н. выражены ярче, а в линиях pSC 4 – pSC 10 – слабее, что может быть связано с различной копийностью изучаемых последовательностей.

Таким образом, в результате проведенной работы с помощью анализа произвольно амплифицированной полиморфной ДНК показана возможность повышения генетического разнообразия плюсовых генотипов березы повислой и гибридной в культуре *in vitro* и

выявлены линии соматоклональных регенерантов, для которых будет проведена оценка устойчивости к абиотическим стрессам с использованием селективных сред.

Анализ электрофоретических фракций RAPD-локусов выявил мономорфные внутривидовые маркерные регионы для линий клона гибридного генотипа № 52-84/8 (по праймерам UBC-154, UBC-203, UBC-268) и линий клона плюсового генотипа березы по-

вислой № 6-161/3 (по праймерам UBC-106 и UBC-203).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Лебедев В. Г., Азарова А. Б., Шестибратов К. А., Деменко В. И. Проявление соматоклональной изменчивости у микроразмноженных и трансгенных растений // Известия ТСХА. 2012. Вып. 1. С. 153–163.
Лутова Л. А. Биотехнология высших растений. СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2003. 227 с.

Любавская А. Я. Лесная селекция и генетика. Конспект лекций. М.: ГОУ ВПО МГУЛ, 2007. 270 с.

Падутов В. Е., Баранов О. Ю., Воронаев Е. В. Методы молекулярно-генетического анализа. Минск: Юнипол, 2007. 176 с.

Larkin P. J., Scowcroft W. R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // Theor. Appl. Genet. 1981. V. 60. P. 197–214.

Westermeier R. Electrophoresis in practice. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2001. 349 p.

Molecular Genetic Analysis of Somaclonal Lines Genotypes of Silver Birch and Hybrid Birch

A. V. Konstantinov, S. V. Panteleev

*Institute of Forest, National Academy of Sciences of Belarus
Proletarskaya str., 71, Gomel, 246001 Republic of Belarus
E-mail: avkonstantinof@mail.ru, stasikdesu@mail.ru*

Enrichment of genetic diversity by means of somaclonal variation can allow selection of individuals with increased adaptability to various unfavorable conditions. Twenty shoot cultures differing in organogenesis and morphological features were selected for two studied clones. Multilocus genetic passports of somaclonal lines were developed according to RAPD analysis. Among the samples derived from clone № 52-84/8 shoot cultures the changes in RAPD-spectra were detected over primers UBC-106 and UBC-254. In the case of clone № 6-161/3 the same changes were detected over primers UBC-268 and UBC-154. UBC-203 primer didn't show any variation.

Keywords: *somaclonal variation, silver birch, hybrid birch, RAPD-analysis, genetic passport.*