

# АГРАРНАЯ РОССИЯ

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

№ 6

2004

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ. Часть I

### ЧИТАЙТЕ В НОМЕРЕ:

К 80-летию со дня рождения <i>Емцева Всеволода Тихоновича</i> . . . . .	2
<i>Стрельченко П. П., Митрофанова О. П., Конарев А. В.</i> Сравнение возможностей RAPD-, AFLP- и SSR-маркеров для различения местных сортов гексаплоидных пшениц . . . . .	3
<i>Митрофанова О. П., Стрельченко П. П., Конарев А. В.</i> Структура генетических взаимосвязей между местными сортами гексаплоидных пшениц по данным RAPD-, AFLP- и SSR-анализов. . . . .	10
<i>Антонова О. Ю., Швачко Н. А., Костина Л. И., Малышев Л. Л., Гавриленко Т. А.</i> Генетическая дифференциация сортов картофеля с использованием SSR-маркеров . . . . .	19
<i>Антонова О. Ю., Трускинов Э. В., Фролова Д. В., Гавриленко Т. А.</i> Анализ генетической стабильности образцов картофеля, сохраняемых в условиях <i>in vitro</i> . . . . .	25
<i>Конарев А. В., Губарева Н. К., Корнюхин Д. Л., Бернер А.</i> Анализ генетической стабильности образцов коллекции мягкой пшеницы в процессе многолетнего поддержания путем многократных репродукций. . . . .	30
<i>Сидорова В. В., Конарев А. В., Матвеева Г. В., Тимофеева Г. И.</i> Использование электрофоретического спектра зеина для прогнозирования гетерозиса у кукурузы. . . . .	34
<i>Алпатьева Н. В., Гаврилюк И. П., Леонтьева Н. А., Орешко Л. С., Красильников В. А., Барсукова Н. А., Лоскутов И. Г.</i> Проламины и целиакия. . . . .	41
<i>Зеленская Я. Г., Конарев А. В., Лоскутов И. Г., Губарева Н. К., Стрельченко П. П.</i> Характеристика старо-местных форм овса посевного ( <i>Avena sativa</i> L.) из коллекции ВИР по полиморфизму авенина . . . . .	50
Авторский указатель . . . . .	59
Указатель статей, опубликованных в 2004 г. . . . .	61

МОСКВА

ИЗДАТЕЛЬСТВО "ФОЛИУМ"

# АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ОБРАЗЦОВ КАРТОФЕЛЯ, СОХРАНЯЕМЫХ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

О. Ю. Антонова, Э. В. Трускинов, Д. В. Фролова,  
Т. А. Гавриленко

При помощи SSR- и RAPD-анализов изучена генетическая стабильность картофеля, сохраняемого в условиях *in vitro*. Материал для исследования включал 14 сортов, каждый из которых был представлен образцом, репродуцированным традиционным способом в полевых условиях, и растениями того же сорта из коллекции *in vitro*. У большинства изученных образцов SSR- и/или RAPD-спектры пробирочных растений и их полевых аналогов были идентичны. Увеличение срока хранения микрорастений в условиях *in vitro* не вызывало изменений в спектрах ДНК; не было также отмечено влияние генотипа на генетическую стабильность образцов. У трех сортов были выявлены различия между *in vitro* и *in vivo* образцами, однако в этих случаях причинами несоответствия спектров явилось либо "засорение" коллекционного образца, либо генетический полиморфизм исходного полевого материала. Результаты, полученные в настоящей работе, подтверждают надежность традиционных технологий *in vitro* хранения микрорастений картофеля.

## Введение

Сохранение генетического разнообразия культурного картофеля, имеющего важнейшее значение для селекции, является достаточно сложной задачей. Картофель невозможно репродуцировать семенами, так как половое размножение разрушает генетическую структуру сортов, представленных тетраплоидными генотипами с высоким уровнем гетерозиготности. Поэтому коллекции сортов картофеля поддерживаются в генных банках в виде вегетативных органов как традиционным способом на основе клубневых репродукций в поле, так и с использованием современных технологий *in vitro* и криохранения (микроклубни, микропобеги, почки, меристемы), обеспечивающих надежную защиту образцов от патогенов и неблагоприятных факторов среды.

Важным аспектом хранения генофонда картофеля является контроль генетической стабильности образцов длительно сохраняемых в условиях *in vitro*. Убедительные доказательства возникновения нового генетического разнообразия (соматональной изменчивости) среди растений-регенерантов получены в экспериментах по культивированию клеток и тканей [10, 15, 24]. В то же время растения, не прошедшие стадии неорганизованного роста и сохраняемые в условиях *in vitro* в виде микропобегов или микроклубней, как правило, сохраняют генетическую стабильность [3, 7, 12, 19, 23]. Изучение генетической стабильности микрорастений проводится на молекулярном, хромосомном, геномном и на организменном уровнях [3, 7, 11, 12, 17, 19 – 22]. В последние годы предпочтение отдается использованию различных ДНК-маркерных систем как наиболее точному, быстрому и информативному подходу [18].

Целью настоящей работы было изучение генетической стабильности различных сортов картофеля сохраняемых в условиях *in vitro* с использованием SSR- и RAPD-анализов.

## Методы исследования

Материал для исследования включал 14 сортов картофеля отечественной и зарубежной селекции (табл. 1), поддерживаемых традиционным способом на основе клубневых репродукций (*in vivo* образцы). Коллекция пробирочных растений сортов картофеля (*in vitro* образцы) создавалась, поддерживалась и хранилась в цикле — меристемы, микропобеги, микроклубни согласно методам, принятым в различных генных банках [2, 8, 16, 25]. В анализ включали по 3 – 5 растений каждого сорта.

ДНК выделяли фенольно-детергентным методом [27] с некоторыми модификациями. Дополнительную очистку ДНК от фенольных соединений проводили с помощью поливинилпирролидона. Анализ полиморфизма микросателлитных локусов (SSR) и RAPD-фрагментов проводили при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). В работе использовали 12 пар SSR- и до 10 RAPD-праймеров (табл. 2), отобранных ранее по способности выявлять внутривидовой полиморфизм у разных видов картофеля [1, 14, 20, 26].

**SSR-анализ.** Реакционная смесь для проведения SSR-анализа объемом 20 мкл содержала 100 нг ДНК картофеля, 1 единицу Taq-полимеразы (Silver Star, Германия), однократный реакционный буфер, предложенный фирмой-производителем фермента, 0,1 мМ каждого из дезоксинуклеотидов, 300 пкМ каждого из праймеров. ПЦР проводили по схеме: 94°C в течение 4 мин, затем 31 цикл (94°C — 45 с, Tm (отжиг) — 1,5 мин, 72°C — 2 мин) и в заключение 72°C — 5 мин. Температура отжига (Tm), специфичная для разных SSR-праймеров, указана в табл. 2. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 10% полиакриламидном геле и окрашивали нитратом серебра [5].

**RAPD-анализ.** ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 100 нг ДНК, 1 единицу Taq-полимеразы (фирма Sileks, Москва), однократный реакционный буфер, предложенный фирмой-производителем.

**Таблица 1.** Результаты RAPD- и SSR-анализов растений 14 сортов картофеля, сохраняемых в условиях *in vitro* и репродуцированных в полевых условиях

Сорт, № по каталогу ВИР	Продолжительность поддержания образцов в условиях <i>in vitro</i> , год	Праймеры, использованные в анализе генетического соответствия <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> образцов			
		RAPD-анализ		SSR-анализ	
		число праймеров	число пар праймеров	число пар праймеров	число пар праймеров
		выявляющих отличия	не выявляющих различий	выявляющих отличия	не выявляющих различий
Dorisa, к-19526	1	0	6	0	12
Early Rose, к-24035	4	3	6	5	7
Hindenburg, к-24076	7	0	6		
Paul Wagner, к-735	1	0	6		
Детскосельский, к-2902	26	0	6	0	12
Елизавета, к-11911	1	6	3		
Изора, к-11279	4	0	9		
Лорх, к-1070	6	4	4	12	0
Лошицкий, к-6857	4	0	6		
Луговской, к-11658	3	0	6	0	12
Лукьяновский, к-11750	5	0	6		
Петербургский, к-11913	2	0	9		
Рождественский, к-11906	5	0	6		
Свитанок Киевский, к-11665	5	0	6		

лем фермента, 0,2 мМ каждого из дезоксинуклеотидов, 15 пкМ праймера. ПЦР проводили по схеме: 94°C в течение 3 мин, затем 37 циклов (94°C — 1 мин, 35°C — 1,5 мин, 72°C — 2 мин) и в заключение 72°C — 5 мин. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 1,4% агарозном геле в трис-боратном буфере, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем УФ свете.

### Результаты и обсуждение

Спектры, полученные на основе анализа продуктов амплификации ДНК, выделенной из различных тканей растения (листья, проростки, кожура клубней), были идентичны, что указывает на отсутствие химерных растений в исследованном материале. Каждый сорт был представлен образцом, репродуцированным традиционным способом в полевых условиях, и растениями того же сорта из коллекции *in vitro*. Пробирочные образцы 14 изученных сортов характеризовались различной продолжительностью хранения в условиях *in vitro* — от одного до 26 лет (табл. 1). В целях оценки генетического соответствия образцов картофеля, хранящихся в коллекции *in vitro*, их полевым аналогам, был проведен молекулярный анализ данного материала с использованием двух ДНК-маркерных систем. Результаты ис-

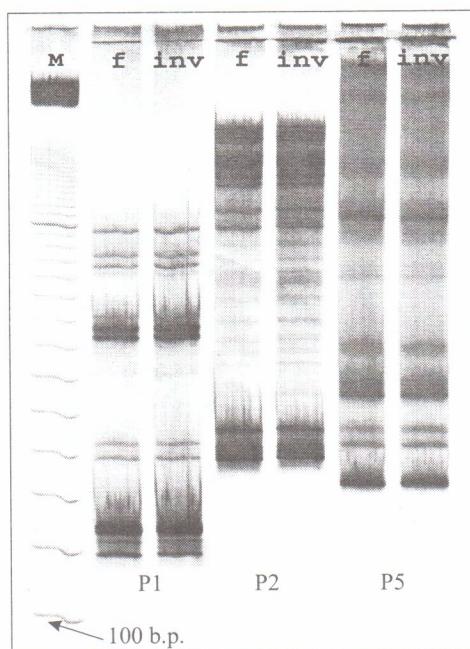
**Таблица 2.** Список SSR- и RAPD-праймеров, использованных в работе

Праймер	Мотив	Последовательность*	T <sub>m</sub> ** °C
<b>SSR</b>			
P1***	(tcac) <sub>m</sub>	F: tct ctt gac acg tgt cac tga aac R: tca ccg att aca gta ggc aag aga	60
P2***	(tcac)m.(ctt) <sub>n</sub>	F: tct ctt gac acg tgt cac tga aac R: ttg cca tgt gat gtg tgg tct aca a	60
P3***	(ctt) <sub>4</sub>	F: tga ttc tct tgc cta ctg taa tcg R: agt cag agt atg gtt cct gag tcc	55
P4***	(actc) <sub>5</sub>	F: ccc ata ata ctg tcg atg agc a R: gaa tgc agt agg gaa aca tgc atg a	60
P5**	(c)p (ct)q (at)r (g)s	F: cat gtg gtt gtt aga cac cac tag t R: ttt ggc aca agc aag ggt aga agg	60
P7***	(aag) <sub>8</sub>	F: ttc tga ttt cat gca tgt ttc c R: atg tgt ggt cta caa aaa ggg g	58
P9***	(aatt) <sub>5</sub>	F: caa cca aca agg taa atg gta cc R: tgg tct ggt gca tta gaa aaa a	55
P10***	(aga) <sub>5</sub>	F: ttc aga gac atc atg gca act t R: atc ctt cat cag agg aag aat cc	60
STINHWI	(ct) <sub>3</sub> tt(ct) <sub>8</sub> (at) <sub>9</sub>	F: gga gtc aaa gtt tgc tca cat c R: cac cct caa ccc cca tat c	55
STU 14 6SNRN	(tgg) <sub>5</sub>	F: gaa gtt tta tca gaa tcc R: atc acc tca tca gca atc	55
ST13ST 15	(at) <sub>11</sub>	F: tat tcc ccc ttc cta ctc aa R: tct tcc aca ttc cta acc tg	58
STPRINPSG	(ta) <sub>23</sub> 16	F: tgt act ggg gag cct caa ag R: aat ttt aac ctc gtg aca tgg g	55
<b>RAPD</b>			
E		accgccaagg	
H		agcgccattg	
I		gagagccac	
Opa 10		gtgategcag	
Opb 09		tgggggactc	
Opс 15		gacggatcag	
Vav 1		ggtcctcagg	
Vav 2		aatcgggctg	
P 131		gaaacagcgt	
0,3 – 2		gaggacaacggttc	

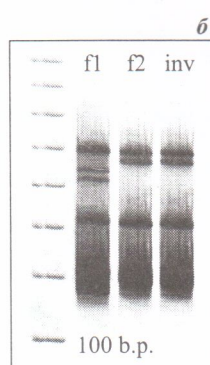
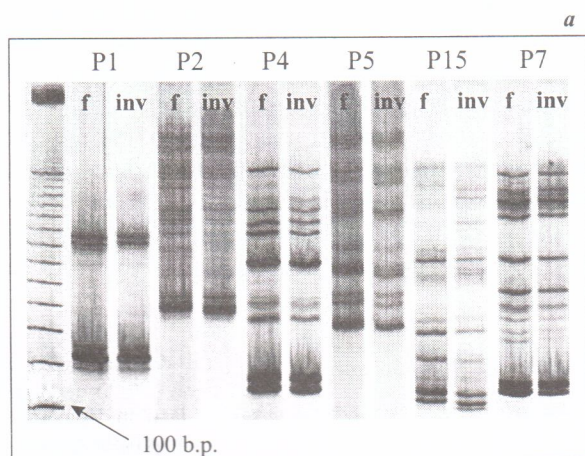
\* F и R — прямой и обратный праймер соответственно; \*\* температура отжига; \*\*\* обозначения даны в соответствии с [4].

следований показали, что SSR- и/или RAPD-спектры пробирочных растений и их полевых аналогов были идентичными у 11 сортов: Детскосельский, Изора, Луговской, Лошицкий, Лукьяновский, Петербургский, Рождественский, Свитанок Киевский, Dorisa, Hindenburg, Paul Wagner (рис. 1, табл. 1).

У трех сортов (Early Rose, Елизавета и Лорх) обнаружены несоответствия между *in vitro* растениями и их полевыми аналогами (табл. 1). Так, у изученных образцов сорта Early Rose полностью идентичные спектры получены с участием семи из двенадцати изученных пар SSR-праймеров (рис. 2а, табл. 1). Пять пар SSR-праймеров выявляли различия по минорным фрагментам между *in vitro* и *in vivo* образцами, при этом главные компоненты SSR-спектров оставались идентичными. Из девяти изученных RAPD-праймеров три выявили отличия между образцом *in vitro* сорта Early Rose и его полевым аналогом (табл. 1). Анализ большего числа



**Рис. 1.** Сравнение электрофоретических спектров продуктов амплификации ДНК, полученных с использованием праймеров P1, P2, P5, у сорта Деткосельский из полевой (f) и из *in vitro* коллекций; М — молекулярный маркер



**Рис. 2. а** — сравнение электрофоретических спектров продуктов амплификации ДНК, полученных с использованием SSR-праймеров: P1, P2, P4, P5, P7 и P15, образцов сорта Early Rose из полевой (f) и *in vitro* (inv) коллекций; М — молекулярный маркер;

**б** — внутрисортной полиморфизм полевых (f1 и f2) клонов сорта Early Rose, выявляемый при помощи пары праймеров P10; (inv) — образец из коллекции *in vitro*.

100 b.p. — молекулярный маркер

Внутрисортные генетические различия были выявлены и у сорта Елизавета. RAPD-анализ образцов этого сорта позволил выделить три группы растений, различающиеся между собой по спектрам амплификации. Причем эти три группы были обнаружены среди полевых растений коллекции ВИР, среди разных микроклонов *in vitro* коллекции, а также при оценке клубневого материала, полученного из СЗНИИКХ, где данный сорт был создан. Внутрисортная гетерогенность сорта Елизавета стабильно воспроизводилась в повторных экспериментах при независимом выделении ДНК из разных клонов этого сорта.

Образцы сорта Лорх, взятые из полевой и *in vitro* коллекций, оказались настолько разными, что не было ни одной пары SSR-праймеров, которые бы амплифицировали идентичные спектры у растений, поддерживаемых разными способами (табл. 1). Очевидно, что при поддержании сорта Лорх были допущены ошибки и произошло “засорение” данного образца.

В целях контроля генетической стабильности образцов вегетативно размножаемых культур из *ex situ* коллекций исследователи обычно сравнивают молекулярные спектры сорта, репродуцированного традиционным методом в полевых условиях, и спектры растений того же сорта, сохраняемых в условиях *in vitro* [11, 12, 17, 19, 23]. Три причины могут привести к несоответствию между пробирочными растениями и их полевыми аналогами: соматическая изменчивость, полиморфизм исходного материала, засорение коллекционных образцов. Соматическую изменчивость могут обуславливать следующие механизмы: изменения уровня пloidности и числа хромосом, структурные перестройки хромосом, точковые мутации, амплификация и редукция генов, изменения определенных классов высокоповторяющихся последовательностей, активация мобильных генетических элементов и изменения в характере метилирования ДНК культивируемых клеток растений [10, 13, 15]. Необходимо отметить, что перечисленные выше генетические изменения были экспериментально подтверждены для суспензионных, протопластных и каллусных культур растений, в то время как в программах по *in vitro* хранению генофонда, в которых соматическую изменчивость желательнее свести к минимуму, не используются технологии, основанные на прохождении клетками стадии неорганизованного роста. Поэтому при поддержании *in vitro* коллекций картофеля необходимо использовать только рекомендованные методы хранения микропобегов в условиях минимального роста и/или хранения микроклубней [2, 8, 16, 25].

Результаты, полученные в настоящей работе, подтверждают надежность технологий *in vitro* хранения микрорастений картофеля, в которых не используются методы культивирования клеток и каллусов. Пробирочные растения 11 сортов сохраняли стабильность спектров ДНК. Известно, что на уровень и частоту соматических вариантов влияют продолжительность культивирования *in vitro* и генотип исходного образца [10,

8. Dodds J. H., Huaman Z., Lizarraga R. Potato germplasm conversation: In vitro methods for conversation of plants genetic conversation / Chapman and Hall (eds.). — London, UK, 1991. — P. 93 – 109.
9. Gebhardt C., Blomendahl C., Schachtschabel U., et al. Identification of 2n breeding lines and 4n varieties of potato (*Solanum tuberosum*, ssp. *tuberosum*) with RFLP-fingerprints // Theor. Appl. Genet. — 1989. — V. 78. — P. 16 – 22.
10. Gupta P. K. Chromosomal basis of somaclonal variation in plants: Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement / Jain S. M., Brar D. S., Ahloowalia B. S. (eds.). — Dordrecht – Boston – London: Kluwer Academic Publishers, 1998. — P. 149 – 168.
11. Harding K. Molecular stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* plants recovered from slow growth and cryopreservation // Euphytica. — 1991. — V. 55. — P. 141 – 146.
12. Harding K., Benson E. E. Analysis of nuclear and chloroplast DNA in plants regenerated from cryopreserved shoot-tips of potato // CryoLetters. — 2000. — V. 21. — P. 279 – 288.
13. Jain M. S., Ahloowalia B. S., Veilleux R. E. Somaclonal variation in crop improvement: Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement / Jain M. S., Brar D. S., Ahloowalia B. S. (eds.). — Dordrecht – Boston – London: Kluwer Academic Publishers, 1998. — P. 203.
14. Kawchuk L. M., Lynch D. R., Thomas J., et al. Characterization of *Solanum tuberosum* simple sequence repeats and application to potato cultivar identification // Am. Potato J. — 1996. — V. 73. — P. 325 – 335.
15. Larkin P. J. Introduction: Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement / Jain S. M., Brar D. S., Ahloowalia B. S. (eds.). — Dordrecht – Boston – London: Kluwer Academic Publishers, 1998. — P. 3 – 13.
16. Lizarraga R., Huaman Z., Dodds J. H. In vitro conversation of the potato germplasm at the international potato center // Am. Potato J. — 1989. — V. 66. — P. 253 – 267.
17. Mandolino G., De Marco S., Faeti V., et al. Stability of fingerprints of *Solanum tuberosum* plants derived from conventional tubers and vitrotubers // Plant Breed. — 1996. — V. 115. — P. 439 – 444.
18. Milbourne D., Meyer R. C., Bradshaw J. E., et al. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato // Mol. Breed. — 1997. — V. 3. — P. 127 – 136.
19. Potter R., Jones M. G. K. An assessment of genetic stability of potato in vitro by molecular and phenotypic analysis // Plant Sci. — 1991. — V. 76. — P. 239 – 248.
20. Provan J., Powell W., Waugh R. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*) // Theor. Appl. Genet. — 1996. — V. 92. — P. 1078 – 1084.
21. Rietveld R. C., Bressan R. A., Hasegawa P. M. Somaclonal variations in tuber disc-derived populations of potato. II. Differential effect of genotype // Theor. Appl. Genet. — 1993. — V. 87. — P. 305 – 313.
22. Rietveld R. C., Hasegawa P. M., Bressan R. A. Somaclonal variation in tuber disc-derived populations of potato. I. Evidence of genetic stability across tuber generations and diverse locations // Theor. Appl. Genet. — 1991. — V. 82. — P. 430 – 440.
23. Sarkar D., Chakrabarti S. K., Naik P. S. Slow-growth conservation of potato microplants: efficacy of ancymidol for long-term storage in vitro // Euphytica. — 2001. — V. 117. — P. 133 – 142.
24. Sree Ramulu K. S. Case histories of genetic variability in vitro: potato // Cell culture and somatic cell genetics of plants. — 1986. — V. 3. — P. 449 – 473.
25. Thieme R. An in vitro potato cultivar collection: microtuberization and storage of microtubers // FAO / IBPGR Plant Genet. Res. Newslett. — 1993. — V. 88/89. — P. 17 – 19.
26. Veilleux R. E., Shen L. Y., Paz M. M. Analysis of the genetic composition of anther-derived potato by randomly amplified polymorphic DNA and simple sequence repeats // Genome. — 1995. — V. 38. — P. 1153 – 1162.
27. Wienand U., Feix Y. Zein specific restriction enzyme fragments of maize DNA // FEBS Lett. — 1980. — V. 116. — P. 14 – 16.
28. Wilkinson M. J. The partial stability of additional chromosomes in *Solanum tuberosum* cv. Torridon // Euphytica. — 1992. — V. 60. — P. 115 – 122.

Гавриленко Т. А., докт. биол. наук;

Трускинов Э. В., докт. биол. наук;

Антонова О. Ю., науч. сотр.;

Фролова Д. В., мл. науч. сотр.;

Всероссийский НИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова