

отрицательный контроль, v – экспрессионный вектор, T1-T9 – независимые линии первичных трансформантов, K – контрольное растение.

Данный подход успешно апробирован на модельных объектах (трансгенные растения табака и арабидопсиса) и на коллекции трансформантов сельскохозяйственно-важных культур (картофель, томаты, свекла, салат).

Выводы

Таким образом, нами разработан подход, позволяющий за одним раунд ПЦР проводить скрининг первичных трансформантов и выявлять наличие последовательностей целевых генов, селективного гена, репортерного гена, ряда регуляторных элементов, а также оценивать качество препарата, выделенной геномной ДНК, и отсутствие контаминации агробактериями первичных трансформантов растений.

Литература

1. T. Orlikowska. Regeneration of adventitious shoots in process of genetic transformation // In: Altman A, Ziv M, Izhar S (eds). Plant biotechnology and in vitro biology in the 21st century. - 1999 - Kluwer, Dordrecht. – P. 185–188.
2. Mannerlof M., Tenning P. Screening of transgenic plants by multiplex PCR // Plant Mol. Biol. Rep. – 1997. – vol. 15. – P. 38–45.
3. Piruzian E.S., Goldenkova I.V., Mysiychuk K.A., Kobets N.S., Arman I.P., Bobrysheva I.V., Chekhuta I.F., Glazkova D. A reporter system for prokaryotic and eukaryotic cells based on the thermostable lichenase from *Clostridium thermocellum* // Mol. Genet. Genomics. – 2002. – vol. 266. - P. 778-786.

Резюме

Разработана система праймеров, их оптимальные соотношения и условия мультиплексной ПЦР для эффективного отбора и дальнейшего анализа трансгенных растений. Система успешно апробирована на модельных объектах (трансгенные растения табака и арабидопсиса) и на трансформантах сельскохозяйственно-важных культур (картофель, томаты, свекла, салат).

Set of specific primers and multiplex PCR conditions have been developed for effective selection and analysis of transgenic plants. This methodology was approved on collection of model plants (transgenic tobacco and Arabidopsis) and some transgenic crops (potato, tomato, beet and lettuce).

БУБЛИК О.М., АНДРЕЄВ І.О., СПІРІДОНОВА К.В., КУНАХ В.А.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Акад. Заболотного, 150, м. Київ, 03680, Україна, e-mail: kunakh@imb.org.ua

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ РОСЛИН-РЕГЕНЕРАНТІВ *UNGERNIA VICTORIS*

Унгернія Віктора (*Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko, *Amaryllidaceae*) – ендемічна рослина Таджикистану та Узбекистану, препарати ізохінолінових алкалоїдів та біологічно активних полісахаридів якої застосовують для лікування широкого спектру захворювань м'язової, травної та дихальної систем [1]. Активна експлуатація природних ресурсів цього рідкісного виду створює небезпеку скорочення його чисельності та зменшення генетичного різноманіття. Це зумовлює актуальність розробки шляхів прискореного розмноження та збереження генофонду виду. На сьогодні розроблено умови мікроклонального розмноження *U. victoris* як шляхом прямої регенерації із фрагментів лусок цибулин, так і шляхом індукції регенерації із

калюсних тканин, що тривалий час вирощували *in vitro*. Підбрано умови мультиплікації та вирощування *in vitro* отриманих мікроцибулин-регенерантів. Розрахунково розроблений спосіб мікроклонального розмноження дозволяє отримати за 1 рік до 1 млн. мікроцибулин й інтенсифікувати їх розвиток: за 1,5-2 роки вирощування *in vitro* цибулини досягають стадії розвитку 5-7 річних рослин у природі [2].

З огляду на явище соматклональної мінливості в культурі рослинних тканин [3], з метою перевірки можливості застосування розроблених методик для збереження генофонду виду було проведено оцінку генетичної ідентичності рослин, отриманих шляхом прямої та непрямой регенерації. Дослідження проводили з використанням RAPD-аналізу.

Матеріали та методи

Матеріалом для дослідження були рослина *U. victoris* та чотири регенеранти, одержані від неї шляхом прямої регенерації із фрагментів лусок цибулини, а також група калюсних ліній *U. victoris*, отриманих від однієї рослини на різних живильних середовищах віком близько 9 років (№ 2, № 3, № 5, № 6, № 7, № 9а) (див. схему отримання ліній у склад живильних середовищ в [2,4]) і чотири цибулинки, що були отримані шляхом непрямой регенерації від лінії № 3 після 6-7 років культивування. Всі рослини-регенеранти були отримані на середовищі 5СЗН, після отримання їх вирощували в культурі *in vitro* ще протягом близько двох років.

Виділення ДНК та полімеразну ланцюгову реакцію з довільними праймерами (RAPD-ПЛР) проводили за описаними раніше методиками [5]. В аналізі враховували чітко розрізнявані, відтворювані в трьох дослідах амплікони. Для кількісної оцінки RAPD-поліморфізму дані представляли у вигляді бінарної матриці, у якій наявність або відсутність, а також значні відмінності за інтенсивністю (більш, ніж в 4-5 разів), ампліконів однакового розміру позначали відповідно як стан "1" або "0". На підставі отриманої матриці з використанням комп'ютерної програми POPGENE 1.32 були визначені генетичні відстані за методом Нея [6].

Результати та обговорення

Для оцінки генетичної ідентичності рослинного матеріалу *U. victoris*, отриманого з використанням культури тканин, проводили аналіз двох груп рослин-регенерантів, а саме, отриманих шляхом прямої та непрямой регенерації. У першому випадку оцінювали відмінності між регенерованими рослинами та рослиною-донором експлантів, у другому, де для регенерації використовували тривало-культивовані калюсні лінії, регенеранти порівнювали з лінією, від якої вони походять. Крім того, для більш повної характеристики соматклональної мінливості провели дослідження гетерогенності рослин-регенерантів у кожній з груп, а також тривалокультивованих калюсних ліній спільного походження.

У молекулярно-генетичному аналізі використали 24 десятичленних довільних праймери. Загалом для першої групи об'єктів врахували 244 амплікони, а для другої групи споріднених клітинних ліній та регенерантів, отриманих від однієї із них, було враховано 240 RAPD-фрагментів. Кількість ампліфікованих фрагментів залежно від праймера коливалася від 4 до 17 (у середньому 10 фрагментів на праймер), їхні розміри варіювали в межах 280 – 1990 п.н.

У двох із чотирьох досліджених «прямих» регенерантів при порівнянні з материнською рослиною спостерігали генетичні відмінності, що полягали у значному збільшенні інтенсивності флуоресценції двох фрагментів (0,82 % від загальної кількості ампліконів). RAPD-спектри інших двох регенерантів мали ідентичні спектри з рослиною-донором експлантів.

У групі клітинних ліній варіабельними були 9 ампліконів (3,75 %). Більшість із них (сім фрагментів), мали кількісну мінливість, а саме значні відмінності за

інтенсивністю (рис. 1), решта (два фрагменти), характеризувалися якісною мінливістю – були присутні у RAPD-спектрах окремих калюсних ліній.

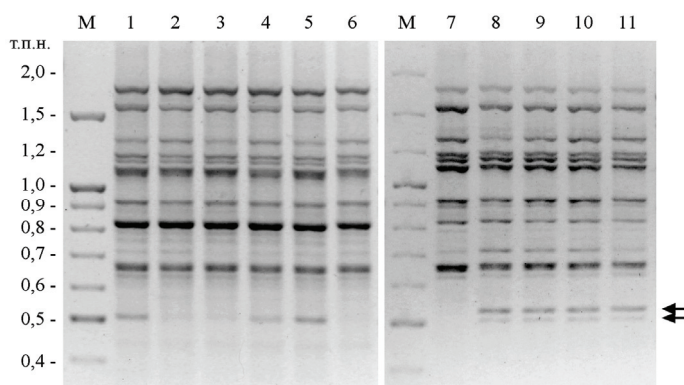


Рис. 1. Генетичний поліморфізм тривалокультивованих калюсних культур та рослин-регенерантів *U. victoris*.

RAPD-профілі, отримані з праймером A11: 1 – 6 – калюсні лінії № 2, № 3, № 5, № 6, № 7 та № 9, відповідно; 7 – лінія № 3; 8 – 11 – регенеранти, отримані від лінії № 3. М – маркер молекулярної маси. Стрілками позначено поліморфні амплікони.

Від вихідної клітинної лінії № 3 групу регенерантів відрізняли 7 ампліконів (2,92 %), з них 4 фрагменти з якісною мінливістю, і 3 – з кількісною (рис. 1). Між рослинами-регенерантами також виявлено відмінності, які полягали в якісному та кількісному поліморфізмі RAPD-профілів за трьома ампліконами (1,25 %). У всіх регенерантів, отриманих з тривало культивованої калюсної культури, відмічено появу амплікону (~530 п.н., праймер A11), який не спостерігали в спектрах досліджених калюсних ліній (рис. 1). Така однотипна зміна спектрів ампліфікації може бути зумовлена як існуванням у геномі *U. victoris* ділянок із підвищеною схильністю до мінливості, так і закономірними змінами в геномі, що, очевидно, відбуваються в процесі диференціювання клітин під час регенерації.

За результатами RAPD-аналізу були розраховані генетичні відстані за Неєм [6]. Відмінності рослин, отриманих шляхом прямої регенерації, від вихідної рослини склали від 0 до 0,82 % (в середньому 0,4 %), відстані між окремими регенерантами становили від 0 до 0,82 % (в середньому 0,5 %). Відмінності рослин, отриманих шляхом непрямой регенерації, від вихідної культури тканин склали від 2,11 до 2,96 % (в середньому 2,53 %), а генетичні дистанції між регенерантами цієї групи – від 0 до 1,26 % (в середньому 0,70 %). Значення генетичних відстаней між калюсними лініями варіювали в діапазоні від 0,84 до 2,96 % (в середньому 1,74 %). Для порівняння слід відмітити, що значення генетичних відстаней за Неєм між рослинами із природної популяції становили від 29,6 до 47 % (в середньому 39,8 %) [5].

Аналіз наведених вище числових даних (рис. 2) свідчить про те, що умови прямої регенерації забезпечують ефективну відтворюваність геному – рослини-регенеранти характеризуються високим ступенем подібності до вихідної рослини. Тривале культивування калюсних тканин призводить до збільшення соматональних відмінностей, які виявляються при порівнянні як окремих калюсних ліній між собою, так і рослин, отриманих шляхом непрямой регенерації, з вихідною культурою тканин. Разом з тим, генетичні відстані між окремими «непрямими» регенерантами виявилися в 2-3 рази нижчими за відмінності від вихідної культури і за міжлінійний поліморфізм. Це дозволяє припустити, що в регенерації беруть участь клітини з найменш зміненим геномом.

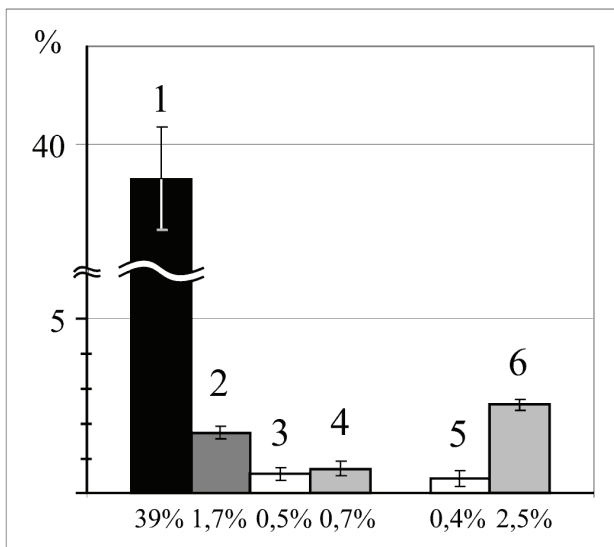


Рис. 2. Рівень внутрішньовидового поліморфізму і соматоклональної мінливості *U. victoris* за даними RAPD-аналізу.

Поліморфізм всередині груп об'єктів: 1 – рослини з природної популяції; 2 – клітинні лінії; 3 – рослини, отримані шляхом прямої регенерації; 4 – рослини, отримані шляхом непрямой регенерації.

Відмінності від вихідного геному: 5 – рослини, отримані шляхом прямої регенерації; 6 – рослини, отримані шляхом непрямой регенерації.

Висновки

Результати дослідження мінливості рослин-регенерантів *U. victoris* свідчать про відносно високу стабільність геному виду за прямої регенерації *in vitro* та регенерації із тривалокультивованих калюсних тканин. Розроблені методики мікроклонального розмноження забезпечують генетичну подібність отриманих рослин до вихідного матеріалу і можуть бути застосовані для прискореного розмноження виду з метою збереження його генофонду. При цьому, у разі необхідності одержання найбільш генетично однорідних рослин, слід надавати перевагу прямій регенерації із тканин експланта. Разом з тим і калюсні тканини, навіть при тривалому культивуванні в підібраних умовах, мають низький рівень генетичної мінливості та зберігають здатність до регенерації, і можуть бути використані для відтворення рослин *U. victoris*.

Література

1. Хамидходжаев С.А. Лекарственные растения рода унгерния в Средней Азии. – Ташкент: «Фан», 1982. – 148 с.
2. Кунах В.А., Можилевська Л.П., Бублик О.М., Колоніна І.В., Музика В.І. Мікроклональне розмноження унгернії Віктора (*Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko) // Біотехнологія. – 2008. – Т. 1, № 4. – С. 57-63.
3. Larkin P. J., Scowcroft W. R. Somaclonal Variation - a Novel Source of Variability From Cell Cultures for Plant Improvement // Theor. Appl. Genet. – 1981. – vol. 60, № 4. – P. 197-214.
4. Бублик О. М., Андрєєв І. О., Спірідонова К. В., Можилевська Л. П., Кунах В. А. Вивчення геномної мінливості культури тканин *Ungernia victoris* за допомогою RAPD-маркерів // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2006. – Т. 4, № 1. – С. 3 -11.
5. Бублик О. М., Андрєєв І. О., Спірідонова К. В., Музика В. І., Колоніна І. В., Кунах В. А. Генетична гетерогенність рідкісного ендемічного виду *Ungernia victoris* (*Amaryllidaceae*): RAPD-аналіз // Укр. бот. журнал. – 2008. – Т. 65, № 3. – С. 445-452.
6. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. – 1978. – vol. 89. – P. 583-590.

Резюме

Проведено перевірку можливості застосування розроблених раніше методик мікроклонального розмноження *U. victoris* для збереження генофонду цієї рідкісної лікарської рослини. Результати RAPD-аналізу свідчать про високу стабільність геному виду за умов прямої регенерації та регенерації із тривалокультивованих калюсних тканин.

Проведена проверка возможности применения разработанных ранее методик микрклонального размножения *U. victoris* для сохранения генофонда этого редкого лекарственного растения. Результаты RAPD-анализа свидетельствуют о высокой стабильности генома вида при прямой регенерации и регенерации из длительно-культивируемых каллусных тканей.

This study tests an opportunity for application of developed earlier *U. victoris* micro-propagation techniques for protection of this rare medicinal plant genetic resources. The RAPD-analysis results suggest the high genetic stability of the species under conditions of direct regeneration and regeneration from long-term cultured callus.

ВОЛЫНКИН В.А., ЗЛЕНКО В.А., ПОЛУЛЯХ А.А., ЛИХОВСКОЙ В.В.

Национальный институт винограда и вина «Магарач» УААН

Украина, 98600, АР Крым, г. Ялта, ул. Курова, 31, e-mail: select_magarach@ukr.net

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АЛЛОПОЛИПЛОИДИИ И КУЛЬТУРЫ ЗАРОДЫШЕЙ *IN VITRO* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МЕЖРОДОВЫХ ГИБРИДОВ У ВИНОГРАДА (СЕМЕЙСТВО *VITACEAE*)

Эволюция у представителей родов семейства *Vitaceae* происходила на разных континентах под воздействием специфических биотических и абиотических факторов, влияющих на процесс естественного отбора. Так у дикорастущего винограда Европы *Vitis vinifera ssp. silvestris* Gmel., и у окультуренных сортов, относящихся к *Vitis vinifera ssp. sativa* L., не сформировались признаки устойчивости к филлоксере, возбудителю милдью, поскольку эти патогены впервые появились в Европе только в XIX веке. Они были завезены с американского континента, на котором на протяжении длительного времени проходила их сопряженная эволюция с формами винограда, происходящими также с американского континента.

Сохранение виноградарства в Европе на основе селекции осуществлялось в двух радикальных кардинально отличающихся направлениях: 1) создание филлоксероустойчивых подвоев (привитая культура винограда) и 2) выведение устойчивых с высокой продуктивностью и высоким качеством урожая сортов путем скрещивания американских видов с сортами *V. vinifera*. Однако если виды подрода *Euvtitis* легко скрещиваются между собой, то получить гибриды между видом *V. vinifera* (подрод *Euvtitis*, 38 хромосом) с видом *V. rotundifolia* Michaux (подрод *Muscadinia*, 40 хромосом) удалось с большим трудом [11]. Фертильности таких гибридных семян удалось достичь лишь только после их полиплоидизации (аллотетраплоидии) [12].

В 1922-1924 гг. Г.Д. Карпеченко экспериментально доказал возможность получения фертильных межродовых гибридов редьки и капусты методом аллоплоидии (аллотетраплоидии) [4,5]. Но получение межродовых гибридов, применяя методы аллополиплоидии и культуры *in vitro* изолированных из семян зародышей, даже у культур растений, роды которых представлены широким спектром полиплоидных рядов, связано с большими трудностями из-за несовместимости различных родов, принадлежащих к одному семейству растений на генетическом (генетически нестабильных) и физиолого-биохимическом уровнях [6,8]. Также генетически нестабильными являются межродовые соматические гибриды, полученные в результате слияния протопластов в культуре *in vitro* [2].

Межродовые гибриды у семейства *Vitaceae* пока не получены. Создание же межродовых гибридов у винограда (хотя бы с частичным присутствием генов различных родов из-за возможной элиминации хромосом одного из них) позволит