

Сомаклональна мінливість *Ungernia victoris*: необхідність комплексного генетичного аналізу

О. М. Бублик, І. О. Андрєєв, К. В. Спірідінова, В. А. Кунах

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна
kunakh@imbg.org.ua

Аналіз п'яти клітинних ліній U. victoris спільного походження, вироштованих протягом 10 років, виявив міксоплоїдію, значний ступінь поліплоїдизації клітин, кількісні і якісні зміни окремих RAPD-фрагментів. Закономірностей при групуванні клітинних ліній залежно від складу середовища або історії вирощування не спостерігалось. Оскільки зміни рівня плоідності не завжди супроводжуються появою RAPD-поліморфізму і навпаки, щоб надійніше і повніше визначити соматоклональні зміни, рекомендується одночасне застосування цитогенетичного та молекулярно-генетичного методів.

Ключові слова: соматоклональна мінливість, *Ungernia victoris*, RAPD-аналіз, цитогенетичний аналіз.

Вступ. Культуру рослинних тканин і клітин *in vitro* на сьогодні широко використовують у біотехнологічних дослідженнях. До числа головних напрямків застосування культури рослинних тканин, зокрема, входять мікроклональне розмноження та оздоровлення рослин, отримання біологічно активних речовин рослинного походження, мутагенез і селекція клітин із заданими властивостями, кріоконсервація та інші способи збереження генофонду. У більшості випадків практичного застосування культури тканин суттєве значення має контроль генетичної стабільності рослинного матеріалу, оскільки відомо, що культивування рослинних тканин і клітин *in vitro* супроводжується різноманітними змінами геному [1, 2]. Для цього найчастіше використовують методи молекулярно-генетичного аналізу, серед яких одним із найпоширеніших є полімеразна ланцюгова реакція з

довільними праймерами (RAPD-ПЛР) [3–7]. Разом з тим, мало що відомо про те, наскільки подібний підхід дозволяє адекватно оцінити генетичну стабільність культивованих тканин, адже мінливість у культурі *in vitro* може бути представлена не лише змінами на рівні послідовності ДНК, але й перебудовами на рівні каріотипу.

Метою даної роботи було порівняння результатів оцінки генетичної стабільності культивованих рослинних тканин, одержаних за допомогою цитогенетичного та RAPD-аналізу. Зокрема, представлені результати вивчення групи тривало культивованих клітинних ліній унгернії Віктора (*U. victoris* Vved. ex Artjushenko, родина *Amaryllidaceae*) – рідкісної лікарської рослини, ендеміка Паміро-Алаю. Усі проаналізовані лінії отримано від однієї цибулини та вирощувалися на агаризованих живильних середовищах різного складу.

Матеріали і методи. Проаналізовано п'ять ліній культивованих клітин *U. victoris*, одержаних

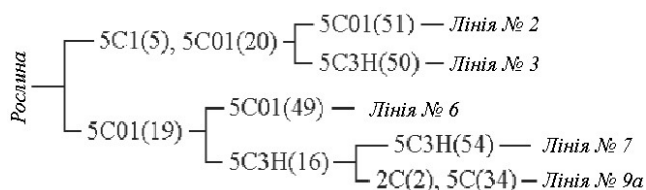


Рис. 1. Історія вирощування клітинних ліній *U. victoris*: застосовані живильні середовища і кількість пасажів (у дужках)

від однієї рослини з природної популяції (Таджикистан), які впродовж 10 років вирощували на живильних середовищах з різним вмістом макроелементів, сахарози і біологічно активних добавок [8].

Цитогенетичний аналіз проводили, підраховуючи число хромосом у метафазних пластинках на препаратах, виготовлених з різних ділянок калюсної тканини за модифікованим методом давлених ацетоорсеїнових препаратів [9]. Калюсні тканини відбирали на 5, 8 і 13-ту добу пасажу, а саме – в період високої мітотичної активності клітин, в один і той самий час доби. Дані підрахунку кількості хромосом у трьох пробах об'єднували в загальний пул.

Зважаючи на значну довжину хромосом угернії Віктора, точність підрахунку залежала від їхньої кількості. Метафази з числом хромосом до $3n$ підраховані з точністю до однієї хромосоми, від $4n$ до $6n$ – з точністю до двох хромосом, понад $6n$ – до трьох–чотирьох хромосом. Для зручності статистичної обробки результатів отриманий у дослідженні ряд хромосомних чисел розбивали на класи: біягаплоїдний (до 17 хромосом), біядиплоїдний (17–27 хромосом), біятриплоїдний (28–38 хромосом), біятетраплоїдний (39–49 хромосом), біяпентаплоїдний (50–60 хромосом), біягексаплоїдний (61–71 хромосома), біягептаплоїдний (72–82 хромосоми) і біяоктаплоїдний (83–93 хромосоми) і т. д.

Достовірність відмінностей отриманих даних визначали за t -критерієм Стьюдента.

Виділення ДНК з калюсів і RAPD-ПЛР проводили за описаними раніше методиками; використано 24 десятичленних праймери довільної послідовності, підібрані раніше [10]. ПЛР проводили щонайменше у двох повторностях, враховували лише

добре помітні і відтворювані у повторних реакціях амплікони. Кількісні відмінності в спектрах ампліконів враховували при щонайменше триразовій відтворюваній різниці в інтенсивності флуоресценції.

Для кількісної оцінки RAPD-поліморфізму дані представляли у вигляді бінарної матриці, в якій наявність або відсутність фрагмента певного розміру у спектрі позначали відповідно «1» або «0». На підставі отриманої матриці за методом Нея [11] визначали генетичні відстані і проводили кластерний аналіз незваженим парногруповим методом з арифметичним усередненням (UPGMA). Для обчислень використано програму PopGen [12].

Результати і обговорення. У ході дослідження підраховано хромосоми п'яти ліній культивованих тканин *U. victoris* спільного походження віком близько 10 років, які росли на різних за складом живильних середовищах (рис. 1).

Згідно з літературними даними, диплоїдне число хромосом *U. victoris* становить $2n = 22$ [13]. Проведений аналіз виявив, що вивчені калюсні лінії – це міксоплоїдні клітинні популяції. Кількість хромосом в окремих клітинах коливалася від гаплоїдного до гіпероктаплоїдного наборів (рис. 2), за винятком лінії № 9a, у якій максимальна кількість хромосом сягала лише біятетраплоїдного набору. Значну частку популяції становили анеуплоїдні клітини всіх рівнів плоїдності, їхня відносна кількість в усіх лініях дорівнювала 50 %.

Встановлено суттєві відмінності в структурі клітинних популяцій окремих ліній *U. victoris*, отриманих від однієї цибулини (рис. 3). В лініях № 2 і № 9a більшість клітин мала ди- і біядиплоїдний набір хромосом (82,3 і 85,4 % відповідно) і лінії достовірно не відрізнялися між собою за розподілом числа хромосом. Лінії № 6 і № 7 були гетерогеннішими за складом, до модального класу в них входили тетра- і біятетраплоїдні клітини (57,8 і 49,5 % відповідно). Крім того, вони відрізнялися за розміром біядиплоїдних, біятриплоїдних і біяпентаплоїдних класів. Найгетерогеннішою виявилася лінія № 3, клітини якої представлено трьома основними класами: ди- і біядиплоїдні клітини (41,5 %), три- і біятриплоїдні (32,1 %), тетра- і біятетраплоїдні (17,9 %).

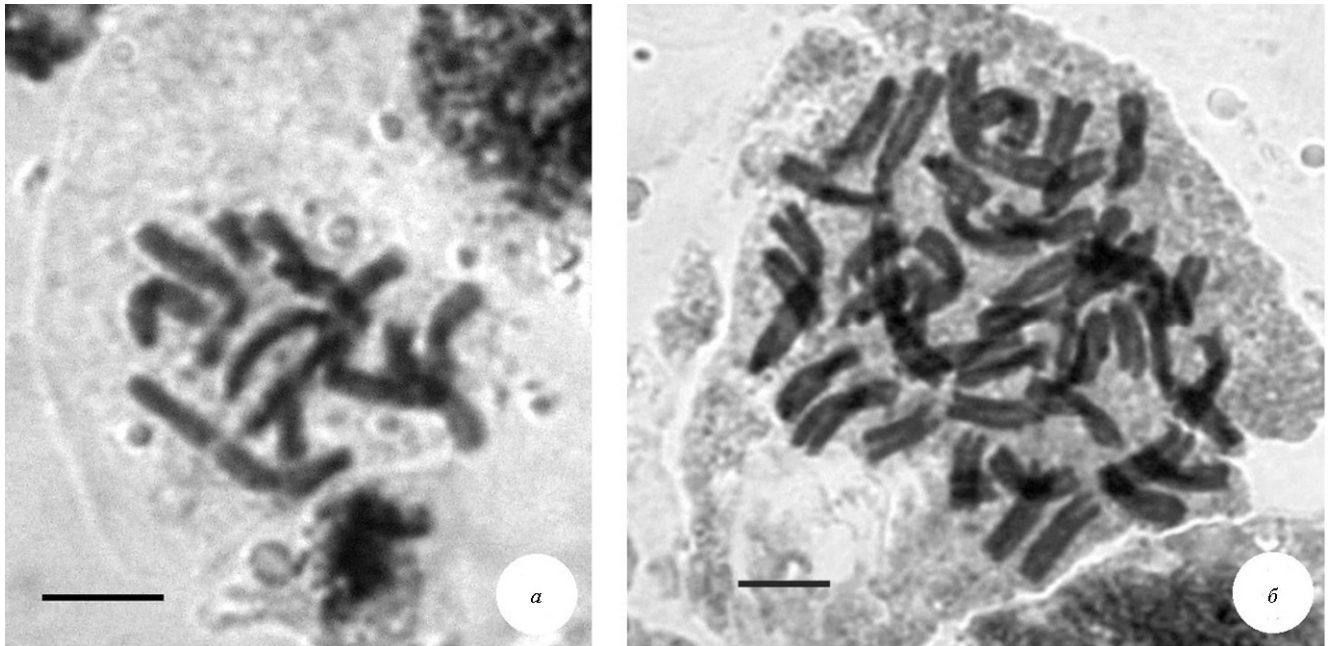


Рис. 2. Метафази з різним числом хромосом у культурі тканин *U. victoris* ($2n = 22$): а – 11 хромосом; б – близько 44 хромосом. Лінійка – 10 мкм

За структурою клітинних популяцій лінії можна розділити на три групи: лінії № 2 і № 9а, в яких більшість клітин мала ди- та біядиплоїдний набір хромосом; лінії № 6 і № 7 з переважанням тетра- та біятетраплоїдних клітин та лінія № 3, представлена переважно біядиплоїдним і біятриплоїдним класами. Зв'язку між таким розподілом ліній та історією їхнього вирощування не спостерігається.

Окрім цього, здійснено молекулярно-генетичний аналіз культивованих тканин досліджуваних ліній *U. victoris* (рис. 4) методом RAPD-ПЛР. Для аналізу використали 24 декануклеотидних праймери, кількість ампліфікованих фрагментів залежно від праймера коливалася від 4 до 16 (у середньому 9,9 на праймер), а розміри – в межах 280–1990 п. н. Загальна кількість врахованих ампліконів дорівнювала 238, з яких відмінності між калюсними лініями виявили дев'ять (3,8 %) фрагментів із спектрів дев'яти праймерів. Кількість поліморфних фрагментів, що демонстрували відмінності між окремими парами ліній, варіювала від двох до семи. При цьому поліморфізм RAPD-продуктів проявлявся переважно у кількісній варіабельності ампліконів, а саме – у змінах інтенсивності флуо-

ресценції (рис. 4), лише для двох ампліконів спостерігали розбіжності за наявністю у спектрах ампліфікації ДНК різних об'єктів.

За результатами RAPD-аналізу розраховано генетичні відстані між калюсними лініями (таблиця), їхні значення варіювали в діапазоні від 0,84 до 2,99 % (середнє значення – 1,84 %).

Дендрограма генетичної подібності, побудована методом UPGMA за генетичними відстанями, в групі клітинних ліній виявила два кластери, до першого з яких увійшли лінії № 2, № 6 і № 7, а до другого – лінії № 3 і № 9а (рис. 5). Отримані дані вказують на відсутність залежності групування ліній від історії вирощування. Зв'язку між характером змін окремих фрагментів і умовами культивування також не спостерігалось.

Таким чином, результати цитогенетичного та молекулярно-генетичного аналізу п'яти калюсних ліній *U. victoris*, отриманих від однієї рослини, показали, що впродовж 10 років вирощування на різних за складом середовищах відбулася їхня дивергенція. Досліджені лінії представлені гетерогенною сумішшю клітин різного рівня плоїдності у різних співвідношеннях, частина ліній має вираже-

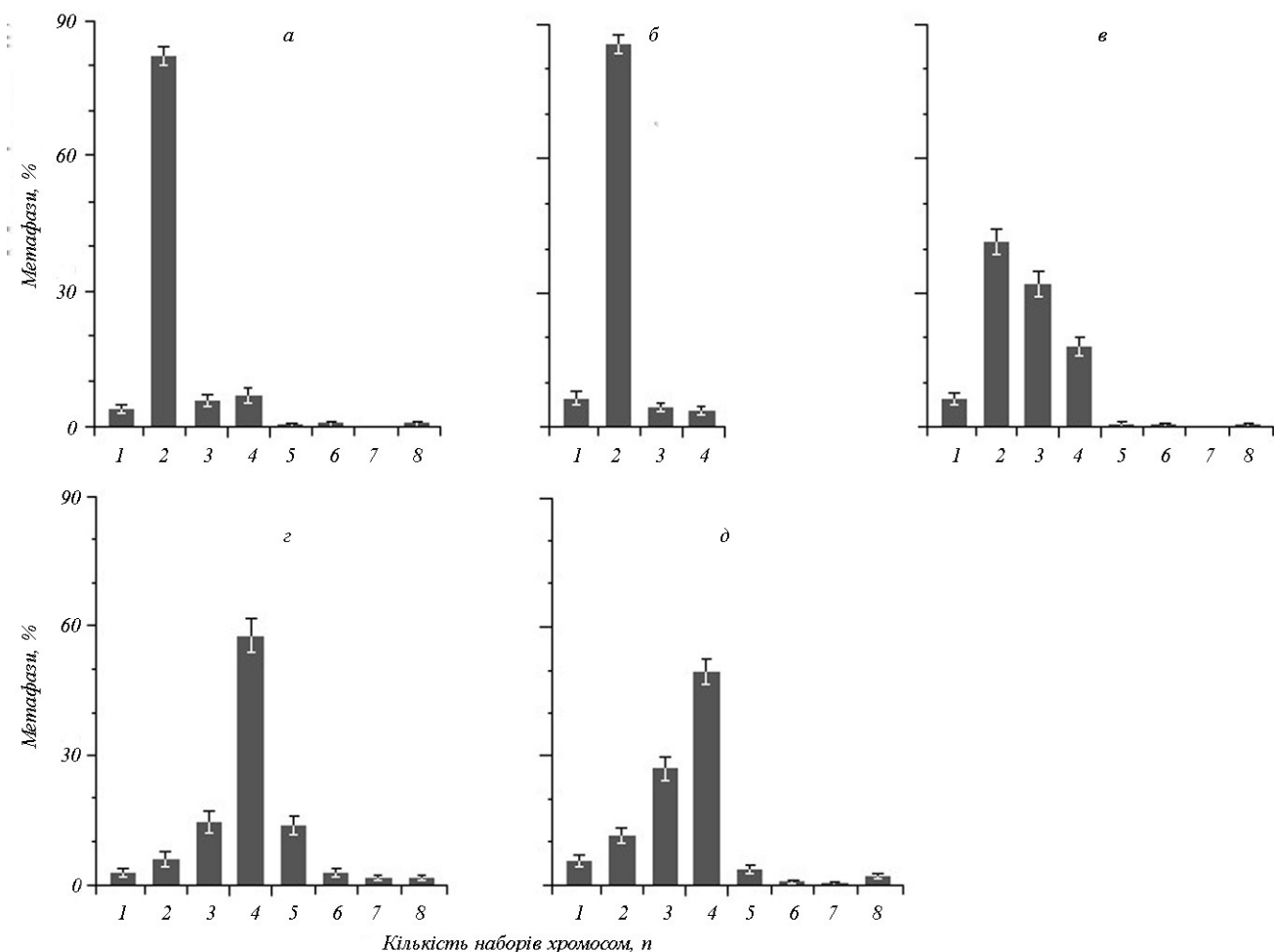


Рис. 3. Розподіл метафаз за кількістю наборів хромосом у клітинних ліній *U. victoris*: а – № 2, N = 328; б – № 9a, N = 281; в – № 3, N = 340; г – № 6, N = 192; д – № 7, N = 279 (N – кількість вивчених метафаз)

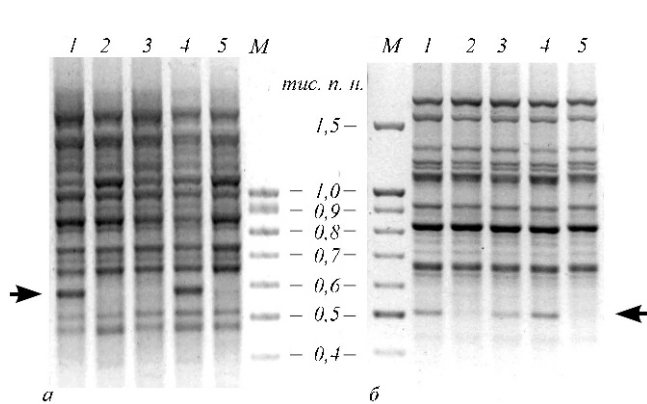


Рис. 4. Кількісний (а) та якісний (б) поліморфізм фрагментів в RAPD-спектрах клітинних ліній *U. victoris* (праймери A16 та A11 відповідно): 1–5 – лінії № 2; № 3; № 6; № 7 та № 9a відповідно; М – маркер молекулярної маси. Стрілками позначено поліморфні амплікони

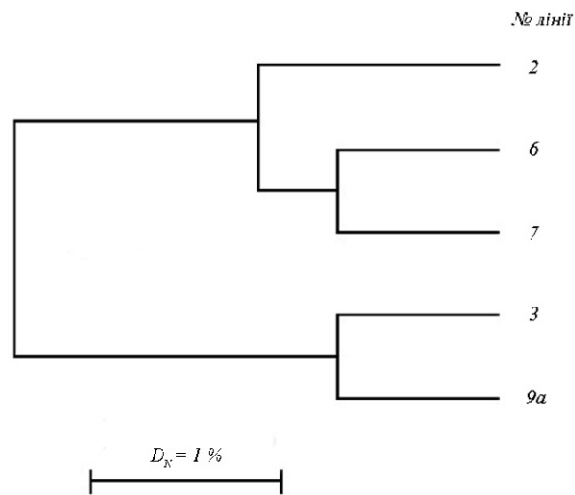


Рис. 5. Дендрограма генетичної подібності калусних ліній *U. victoris*, отриманих від однієї рослини, побудована UPGMA-методом за генетичними відстанями Нея

Генетичні відстані за Несм між калюсними лініями *U. victoris*, розраховані на підставі результатів RAPD-аналізу

№ Калюсної лінії	Генетичні відстані, %				
	Калюсна лінія № 2	Калюсна лінія № 3	Калюсна лінія № 6	Калюсна лінія № 7	Калюсна лінія № 9a
2	–	–	–	–	–
3	2,55	–	–	–	–
6	1,27	2,12	–	–	–
7	1,27	2,99	0,84	–	–
9a	2,55	0,84	2,99	2,99	–

ний модальний клас диплоїдних або тетраплоїдних клітин, тоді як у решті окремого модального класу виділити не вдається.

Міжлінійні відмінності, знайдені за допомогою RAPD-аналізу, полягають, головним чином, у варіабельності кількісної представленості ампліконів і лише в окремих випадках – їхньої наявності/відсутності у спектрах ампліфікації ДНК. На нашу думку, найвірогіднішою причиною кількісних варіацій окремих фрагментів в RAPD-спектрах у даному разі є зміна співвідношення різних класів клітин у складі клітинної популяції, одні з яких містять даний фрагмент, інші – ні. Частка мінливих ділянок геному серед проаналізованих випадкових ділянок становила 3,8 %, генетичні відстані між окремими лініями дорівнювали від 0,84 до 2,99 %.

Закономірностей групування клітинних ліній як за результатами цитогенетичного, так і RAPD-аналізу залежно від складу середовища або історії вирощування не спостерігалось. Ці результати не узгоджуються з даними досліджень, у яких показано вплив фітогормонального складу живильного середовища на плоїдність культивованих тканин [14, 15] та формування специфічних RAPD-профілів [16, 17]. Очевидно, у нашому випадку виникнення змін геному як на рівні хромосом, так і на рівні ДНК не модулювалося компонентами живильних середовищ, у тому числі наявністю, концентрацією і співвідношенням фітогормонів, і мало випадковий характер.

Не вдалося виявити взаємозв'язку між геномними змінами калюсних ліній *U. victoris*, визначеними за допомогою цитогенетичного та молекулярно-генетичного аналізу (рис. 2, 3). А саме – за винятком

ліній № 6 і № 7, лінії, які мали подібні RAPD-профілі, відрізнялися між собою значною мірою за співвідношенням класів клітин із різним числом хромосом. І, навпаки, лінії, подібні за цитогенетичною структурою клітинних популяцій, були генетично віддаленими за результатами RAPD-аналізу.

Результати наших досліджень поряд з експериментальними даними інших авторів свідчать про те, що культивування рослинних тканин *in vitro* індукує зміни геному, які позначаються як на каріотипі, так і на послідовностях ДНК. Разом з тим, зміни кількості хромосом та варіабельність послідовностей ДНК у культурі тканин можуть відбуватися окремо одне від одного.

Аналіз експериментальних робіт, у яких для дослідження соматоклональної мінливості застосували цитогенетичні та молекулярно-генетичні методи, показав, що зазначені вище типи мінливості детектувати одночасно вдається лише в окремих випадках. Наприклад, одночасну появу змін на хромосомному та молекулярному рівнях в культурі *in vitro* спостерігали у рослин-регенерантів [1, 2]. З іншого боку, існують повідомлення, які вказують на те, що варіювання плоїдності калюсних культур [5, 7, 18, 19] та рослин-регенерантів [3–7], а також структурні перебудови хромосом [6, 7] можуть не супроводжуватися змінами молекулярних маркерів. Лише в одній з робіт відмічено протилежну ситуацію – поряд з високою хромосомною стабільністю у регенерантів мелії персидської (*Melia azedarach*) спостерігали високий рівень RAPD-поліморфізму [20].

Чим можна пояснити такі відмінності в результатах, отриманих різними дослідниками, та які на-

слідки вони можуть мати для біотехнологічної практики? Перш за все, це, безумовно, пов'язано з можливостями обох методів аналізу та особливостями змін, які вони дозволяють детектувати. Зокрема, каріотипічна мінливість, яка проявляється у зміні кількості хромосом, не супроводжується змінами послідовностей ДНК. З іншого боку, точкові мутації, мікрodelеції, інверсії тощо навряд чи можна виявити за допомогою рутинного цитогенетичного аналізу. Останній дозволяє оцінити гетерогенність клітинної популяції та проаналізувати її структуру, тоді як молекулярно-генетичний аналіз виявляє зміни на рівні ДНК, що торкаються більшої частини клітинної популяції, і залишає поза увагою появу і зникнення мінорних класів клітин з перебудованим геномом. Отже, ці методи характеризують різні аспекти мінливості геному, які можуть істотно впливати на ознаки культивованих тканин та рослин-регенерантів. Очевидно, що для коректної та надійної оцінки генетичної стабільності рослинного матеріалу, отриманого із застосуванням культури тканин *in vitro*, необхідне одночасне застосування кількох підходів.

Висновки. Тривале вирощування культури тканин *U. victoris* супроводжується міксоплоїдією, значним ступенем поліплоїдизації клітин, дивергенцією генетичних структур клітинних популяцій калюсних ліній, отриманих від однієї цибулини, а також кількісними і якісними змінами поодиноких RAPD-фрагментів. Виникнення певних варіацій геному як на рівні числа хромосом, так і на рівні ДНК не залежить від концентрації та співвідношення фітогормонів і, очевидно, має стохастичний характер. Оскільки зміни рівня плідності не завжди супроводжуються появою RAPD-поліморфізму і навпаки, щоб надійніше і повніше визначити соматональні зміни, рекомендується паралельне застосування цитогенетичного та молекулярно-генетичного методів.

O. M. Bublyk, I. O. Andreev, E. V. Spiridonova, V. A. Kunakh

Somaclonal variability of *Ungernia victoris*: the necessity of comprehensive genetic analysis

Summary

An analysis of five 10-year-old *U. victoris* cell lines of common origin revealed mixoploidy, significant level of cell

polyploidization, quantitative and qualitative changes in individual RAPD-fragments. No regularity was observed in the lines clustering depending on the nutrient medium phytohormone composition or genealogy of the lines. The cytogenetic, molecular and genetic approaches are recommended to ensure reliable determination of somaclonal changes, because the variations in ploidy levels do not always result in the RAPD-polymorphism

Keywords: somaclonal variation, *Ungernia victoris*, RAPD-analysis, cytogenetic analysis.

E. H. Бублик, И. О. Андреев, Е. В. Спиридонова, В. А. Кунах

Соматональная изменчивость *Ungernia victoris*: необходимость комплексного генетического анализа

Резюме

Анализ пяти клеточных линий *U. victoris* общего происхождения, выращиваемых в течение 10 лет, обнаружил миксоплоидию, значительную полиплоидизацию клеток, количественные и качественные изменения отдельных RAPD-фрагментов. Закономерностей группирования клеточных линий в зависимости от состава среды или истории выращивания не наблюдалось. Поскольку изменения уровня плоидности не всегда сопровождаются возникновением RAPD-поліморфізма и наоборот, для надежной оценки соматональных изменений рекомендуется параллельное применение цитогенетического и молекулярно-генетического методов.

Ключевые слова: соматональная изменчивость, *U. victoris*, RAPD-анализ, цитогенетический анализ.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Pontaroli A. C., Camadro E. L. Somaclonal variation in *Asparagus officinalis* plants regenerated by organogenesis from long-term callus cultures // Genet. and Mol. Biol.—2005.—**28**.—P. 423–430.
2. Al-Zahim M. A., Ford-Lloyd B. V., Newbury H. J. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis // Plant Cell Rep.—1999.—**18**.—P. 473–477.
3. Jazdzewska E., Sadoch Z., Niklas A., Majewska-Sawka A. Plant regeneration from sugar beet leaf protoplasts: analysis of shoots by DNA fingerprinting and restriction fragment length polymorphism // Can. J. Bot.—2000.—**78**.—P. 10–18.
4. Raimondi J. P., Masuelli R. W., Camadro E. L. Assessment of somaclonal variation in asparagus by RAPD fingerprinting and cytogenetic analyses // Sci. Hortic.—2001.—**90**.—P. 19–29.
5. Fourre J. L., Berger P., Niquet L., Andre P. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches // Theor. and Appl. Genet.—1997.—**94**.—P. 159–169.
6. Gavrilenko T., Thieme R., Tiemann H. Assessment of genetic and phenotypic variation among intraspecific somatic hybrids of potato, *Solanum tuberosum* L. // Plant Breeding.—1999.—**118**.—P. 205–213.
7. Hao Y.-J., Deng X.-X. Occurrence of chromosomal variations and plant regeneration from long-term-cultured citrus callus // In Vitro Cell. and Develop. Biol. — Plant.—2002.—**38**.—P. 472–476.

8. Бублик Е. Н., Адонин В. И., Кунах В. А. Цитогенетическая изменчивость клеточных линий *Ungernia victoris* при выращивании на питательных средах различного состава // Цитология и генетика.—2008.—**42**, № 1.—С. 29–36.
9. Кунах В. А., Левенко Б. А. Модификация метода давленных препаратов для изучения хромосом в клетках культуры тканей растений // Цитология и генетика.—1975.—**9**, № 1.—С. 56–58.
10. Бублик О. М., Андреев 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. журн.—2008.—**65**, № 3.—С. 445–451.
11. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics.—1978.—**89**.—P. 583–590.
12. Yeh F. C., Boyle T. J. B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits // Belg. J. Bot.—1997.—**129**.—P. 157.
13. Агапова Н. Д., Архарова К. Б., Вахтина Л. И., Земскова Е. А., Тарвис Л. В. Числа хромосом цветковых растений флоры СССР: семейства *Aceraceae-Menyanthaceae*.—Ленинград: Наука, 1990.— 48 с.
14. Mishiba K., Okamoto T., Mii M. Increasing ploidy level in cell suspension cultures of *Doritaenopsis* by exogenous application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid // Physiol. Plant.—2001.—**112**.—P. 142–148.
15. Mishiba K.-I., Tawada K.-I., Mii M. Ploidy distribution in the explant tissue and the calluses induced during the initial stage of internode segment culture of *Asparagus officinalis* L. // In Vitro Cell. and Develop. Biol. — Plant.—2006.—**42**.—P. 83–88.
16. Bogani P., Simoni A., Lio P., Germinario A., Buiatti M. Molecular variation in plant cell populations evolving *in vitro* in different physiological context // Genome.—2001.—**44**.—P. 549–558.
17. Mangolin C., Ottoboni L., Machado M. RAPD markers to evaluate callus tissue of *Cereus peruvianus* Mill. (*Cactaceae*) maintained in different growth regulator combinations // Biochem. Genet.—2002.—**40**.—P. 351–358.
18. Wilhelm E. Somatic embryogenesis in oak (*Quercus* spp.) // In Vitro Cell. and Develop. Biol. — Plant.—2000.—**36**.—P. 349–357.
19. Hao Y.-J., Wen X. -P., Deng X.-X. Genetic and epigenetic evaluations of citrus calluses recovered from slow-growth culture // J. Plant Physiol.—2004.—**161**.—P. 479–484.
20. Olmos S. E., Lavia G., Di renzo M., Mroginski L., Echenique V. Genetic analysis of variation in micropropagated plants of *Melia azedarach* L. // In Vitro Cell. and Develop. Biol. — Plant.—2002.—**38**.—P. 617–622.

УДК (575.22 + 576.5) 582.573.21

Надійшла до редакції 08.05.08