

И.В. МИТРОФАНОВА¹,
А.В. ГАЛАЕВ², Ю.М. СИВОЛАП²

¹ Никитский ботанический сад, Ялта

² Южный биотехнологический центр УААН, Одесса

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ РАСТЕНИЙ КЛЕМАТИСА (*CLEMATIS* L.), ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ ОРГАНОГЕНЕЗА И СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА IN VITRO



Установлена вариабельность генома клематиса при клональном микроразмножении. Определены оптимальные концентрации БАП и зеатина в питательной среде, регулирующие процессы морфогенеза эксплантов клематиса сорта Серенада Крыма в условиях *in vitro*. Проведен молекулярно-генетический анализ растений клематиса рода *Clematis* L., полученных путем соматического эмбриогенеза и органогенеза *in vitro*. С помощью ISSR-праймеров обнаружено 105 ампликонов, из которых полиморфными оказались 6. Средний показатель гетерогенности растений клематиса составил 5,7 %.

© И.В. МИТРОФАНОВА, А.В. ГАЛАЕВ, Ю.М. СИВОЛАП, 2003

Введение. Род *Clematis* L. — ломонос принадлежит к семейству *Ranunculaceae* Juss. В Никитском ботаническом саду собрана коллекция клематисов, включающая около 200 видов, сортов и форм. Необычайная красота и привлекательность большинства видов и сортов обусловлена разнообразием окраски цветков, их обилием (до 500 цветков и более, одновременно цветущих на одном кусте), длительностью цветения (до 3 месяцев и более). Многие виды клематиса имеют большое народнохозяйственное значение, так как содержат эфирные масла, дубильные вещества, витамин С, фитонциды, а также обладают фунгицидным действием, подавляя развитие плесневых грибов. Известны виды клематиса, используемые в тибетской, китайской и монгольской медицине [1, 2].

Крупноцветковые клематисы размножают вегетативным путем, так как большинство сортов гибридного происхождения практически не завязывают семян, а выращенные сеянцы часто недостаточно декоративны и не сохраняют особенностей исходного генотипа.

Одним из способов клонального микроразмножения, позволяющим тиражировать ценные генотипы растений, является соматический эмбриогенез, представляющий собой процесс асексуального развития зародышеподобных структур из репродуктивных и соматических тканей путем, напоминающим зиготический эмбриогенез [3]. Нами впервые были разработаны способы прямого и непрямого соматического эмбриогенеза клематиса сорта Серенада Крыма (группа Ланугиноза) [4, 5].

Среди различных способов микроразмножения растений *in vitro* соматический эмбриогенез в меньшей степени приводит к генетической изменчивости. Однако у граната через соматический эмбриогенез были получены диплоидные, анеуплоидные и полиплоидные растения [6]. Длительное субкультивирование соматических зародышей декоративных растений в условиях *in vitro* приводило к соматической изменчивости [7].

Целью настоящего исследования было проведение молекулярно-генетического анализа растений клематиса, полученных путем органогенеза и соматического эмбриогенеза, и сравнение соматических клонов с донорным растением.

Материалы и методы. Экспланты клематиса сорта Серенада Крыма (высечки листа, сег-

менты микропобега, каллус) культивировали на модифицированной среде Мурасиге и Скуга [8], дополненной БАП и зеатином в концентрации 0,9–6,8 мкМ, pH 5,6. Растительный материал содержали в культуральной комнате при интенсивности освещения 2–3 клк, 16-часовом фотопериоде и температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Исследовали ДНК 13 растений клематиса: полученные путем органогенеза из каллуса (три растения); непрямого соматического эмбриогенеза (три растения); прямого соматического эмбриогенеза из листовых дисков (три растения); прямого соматического эмбриогенеза из сегментов микропобега (три растения) и контроль (взрослое растение клематиса сорта Серенада Крыма).

ДНК выделяли с помощью СТАВ-буфера [9]. Для амплификации использовали прибор «Терцик» («ДНК-Технология», Россия). Реакционная смесь для проведения ISSR — ПЦР объемом 20 мкл содержала: 50 мМ KCl, 20 мМ трис-HCl (pH 8,4 при 25°C), 2–5 мМ MgCl_2 , 0,01 % Tween 20, по 0,2 мМ каждого нуклеотида, 0,2 мкМ праймера, 20 нг ДНК и 1 ед. Taq-полимеразы. В эппендорф поверх реакционного раствора добавляли 30 мкл минерального масла. Амплификацию с семью ISSR-праймерами проводили в режиме: первая денатурация $93^\circ\text{C} - 1 \text{ мин } 30 \text{ с}$, 35 циклов — $60^\circ\text{C} - 40 \text{ с}$,

$70^\circ\text{C} - 1 \text{ мин}$, $93^\circ\text{C} - 30 \text{ с}$, последняя элонгация — $70^\circ\text{C} - 1 \text{ мин } 30 \text{ с}$. Электрофорез продуктов амплификации ДНК проводили в однократном буфере (0,045 М Трис-борат и 10 мМ ЭДТА, pH 8,0) в 2%-ном агарозном геле длиной 12 см при 100–130 В в течение 2,5 ч. Гели, предварительно окрашенные бромистым этидием, после электрофоретического разделения продуктов амплификации фотографировали в ультрафиолетовом свете на пленку «Микрат-300».

Результаты исследований и их обсуждение. При культивировании эксплантов на питательных средах с зеатином и БАП удалось получить регенеранты клематиса путем органогенеза и соматического эмбриогенеза (табл. 1). Соматический эмбриогенез наблюдали на средах, содержащих зеатин в концентрации 2,3; 4,5 и 6,8 мкМ (рис. 1, а). Соматические зародыши образовывались из сегментов микропобега, на высечках листа и в морфогенном каллусе. Морфогенный каллус формировался из листовых эксплантов и сегментов микропобега. Реализацию морфогенетических потенций экспланта через органогенез отмечали в присутствии БАП и зеатина (рис. 1, б). Концентрации зеатина 2,3 и 4,5 мкМ в питательной среде способствовали образованию большого количества соматических зародышей (20–25 шт./эксплант) и микропобегов (5 шт./эксплант).

Таблица 1

Влияние БАП и зеатина на морфогенетические процессы в культуре органов и тканей клематиса сорта Серенада Крыма

Концентрация цитокининов, мкМ	Соматический эмбриогенез	Органогенез	Время появления, сут		Среднее количество на эксплант, шт.	
			эмбрионов	микропобегов	эмбрионов	микропобегов
БАП						
0,9	—	+	0	90	0	2 ± 0,1
2,3	—	+	0	45	0	2 ± 0,1
4,5	—	+	0	30	0	3,5 ± 0,1
6,8	—	+	0	35	0	3 ± 0,1
Зеатин						
0,9	—	+	0	40	0	3 ± 0,1
2,3	+	+	55	25	25 ± 7,3	5 ± 0,2
4,5	+	+	60	18	20 ± 2,6	5,5 ± 0,2
6,8	+	+	60	15	7 ± 0,1	2,5 ± 0,1

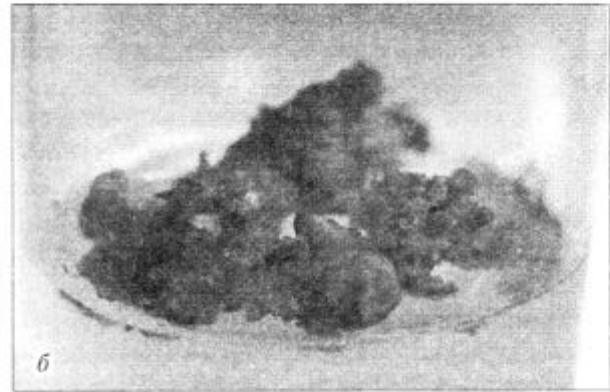


Рис. 1. Начало образования соматических зародышей на высечках листа (а) и вегетативных почек в морфогенном каллусе (б) клематиса сорта Серенада Крыма

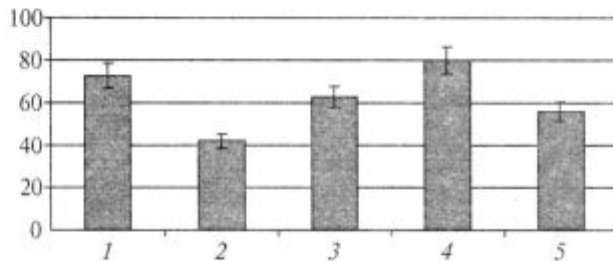


Рис. 2. Зависимость частоты регенерации растений (по вертикали) от особенности реализации морфогенетического потенциала эксплантов клематиса сорта Серенада Крыма: 1 — органогенез; 2 — непрямой соматический эмбриогенез; 3 — прямой соматический эмбриогенез из высечки листа; 4 — прямой соматический эмбриогенез из сегментов микропобега; 5 — вторичный эмбриогенез



Рис. 3. Растения клематиса сорта Серенада Крыма, полученные из соматических зародышей

В процессе исследований морфогенетический потенциал эксплантов реализовался несколькими путями: 1) органогенез в морфоген-

ном каллусе; 2) непрямой соматический эмбриогенез в морфогенном каллусе; 3) прямой соматический эмбриогенез из высечек листа; 4) прямой соматический эмбриогенез из сегментов микропобега; 5) вторичный эмбриогенез. Частота регенерации в процессе морфогенеза *in vitro* была различной и зависела от способа регенерации (рис. 2). При этом регенеранты, полученные через соматический эмбриогенез, имели более мощные корни и микропобеги по сравнению с растениями, регенерировавшими из каллуса (рис. 3).

Для проведения молекулярно-генетических исследований были отобраны растения, культивируемые в условиях *in vitro* после 6–7 пассажей. При анализе 13 индивидуальных растений клематиса с помощью 7 *inter*-SSR праймеров об-

Таблица 2
Молекулярно-генетический полиморфизм клематиса

Праймер	Количество			Полиморфизм, %
	анализированных растений	детектированных ISSR-локусов	полиморфных ISSR-локусов	
(GTG) ₇ A	13	14	0	0,0
(AG) ₉ C	13	18	4	22,2
(AGC) ₆ G	13	20	1	5,0
(GAG) ₈ C	13	10	0	0,0
(AC) ₉ G	13	10	0	0,0
(AGC) ₅ C	13	13	0	0,0
(GA) ₉ C	13	20	1	5,0
Итого		105	6	5,7

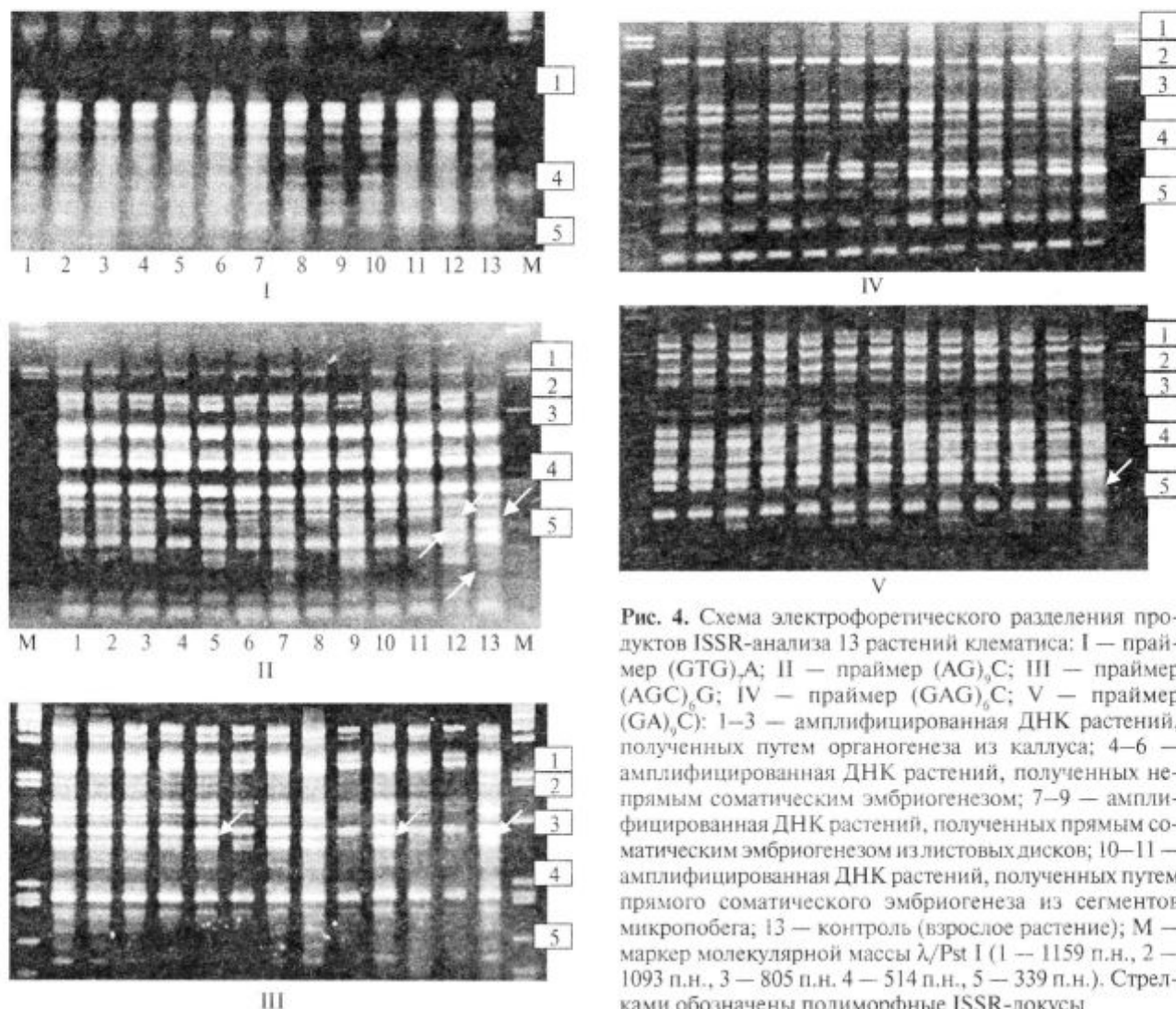


Рис. 4. Схема электрофоретического разделения продуктов ISSR-анализа 13 растений клематиса: I — праймер (GTG)₆A; II — праймер (AG)₆C; III — праймер (AGC)₆G; IV — праймер (GAG)₆C; V — праймер (GA)₆C; 1–3 — амплифицированная ДНК растений, полученных путем органогенеза из каллуса; 4–6 — амплифицированная ДНК растений, полученных непрямым соматическим эмбриогенезом; 7–9 — амплифицированная ДНК растений, полученных прямым соматическим эмбриогенезом из листовых дисков; 10–11 — амплифицированная ДНК растений, полученных путем прямого соматического эмбриогенеза из сегментов микропобега; 13 — контроль (взрослое растение); М — маркер молекулярной массы λ/Pst I (1 — 1159 п.н., 2 — 1093 п.н., 3 — 805 п.н., 4 — 514 п.н., 5 — 339 п.н.). Стрелками обозначены полиморфные ISSR-локусы

наружено 105 ампликонов, из которых полиморфными оказались 6. Средний показатель гетерогенности растений клематиса составил 5,7 % (табл. 2).

При помощи ISSR-праймеров выявлено на электрофореграммах от 10 до 20 фрагментов амплификации ДНК (рис. 4–6), при этом длина фрагментов составляла 170–2000 п.н. Из семи используемых в исследовании ISSR-праймеров три детектировали полиморфные локусы, при этом наибольшее количество полиморфных ISSR-локусов выявил праймер с молекулярной последовательностью (AG)₆C. Из шести полиморфных ISSR-локусов один с молекулярной массой 691 п.н. (ISSR-праймер (AGC)₆G) выявил полиморфизм между растениями клематиса,

полученными путем органогенеза и соматического эмбриогенеза. Остальные пять полиморфных локусов с молекулярными массами 351, 344, 335, 244 п.н. (праймер (AG)₆C) и 328 п.н. (праймер (GA)₆C) выявили гетерогенность между контролем (взрослое растение) и растениями, полученными путем органогенеза и соматического эмбриогенеза. При анализе спектров амплификации у 13 растений клематиса обнаружено уменьшение интенсивности ряда ISSR-локусов.

На основании ISSR-анализа, сравнивая ПЦР-профили исследуемых растений клематиса, определили генетические дистанции (D) между ними. Результаты ISSR-анализа обобщивали согласно Нею и Ли [10].

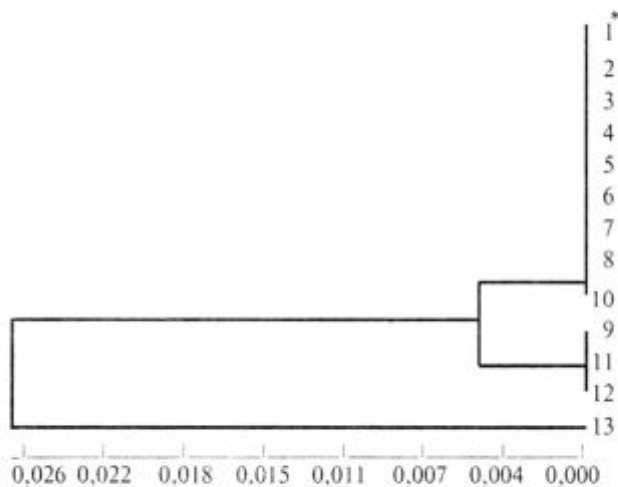


Рис. 5. Дендрограмма, отражающая взаимоотношения между 13 растениями клематиса, построенная на основании ISSR-анализа с помощью UPGMA согласно генетическим дистанциям, определенным по Нею и Ли. По вертикали указаны номера растений полученные путем: органогенеза из калуса (растения 1, 2 и 3); непрямого соматического эмбриогенеза (растения 4, 5 и 6); прямого соматического эмбриогенеза из листовых дисков (растения 7, 8 и 9); прямого соматического эмбриогенеза из сегментов микропобега (растения 10, 11 и 12); контроль (взрослое растение 13)

Размах генетических дистанций для исследуемых растений составил: минимальное значение $D = 0,000$ выявлено между растениями № 1–10 и между растениями № 9, 11 и 12, максимальное значение $D = 0,029$ наблюдалось между растениями № 13 и № 9, 11 и 12.

Для выяснения характера генетических взаимоотношений в исследуемом материале с помощью кластерного анализа генетических дистанций получена дендрограмма, отражающая генетические взаимоотношения между 13 растениями клематиса (рис. 5).

Дендрограмма построена на основании анализа 105 ISSR-локусов, выявленных с помощью семи праймеров. На UPGMA-дендрограмме 13 растений клематиса распределили в два кластера: в первый вошли девять недифференцированных на дендрограмме растений, полученных путем органогенеза из калуса (три растения), непрямого соматического эмбриогенеза (три растения), прямого соматического эмбриогенеза из листовых дисков (два растения), прямого соматического эмбриогенеза из сегментов микропобега (одно растение), и во

втором кластере находятся три недифференцированных растения, полученных путем прямого соматического эмбриогенеза из листовых дисков (одно растение), прямого соматического эмбриогенеза из сегментов микропобега (два растения). Наиболее генетически дифференцированным от остальных является контроль под номером 13, не вошедший ни в один из отобразившихся кластеров.

Таким образом, в результате изучения молекулярно-генетической гетерогенности растений клематиса установлены особенности изменчивости генома при различных способах регенерации *in vitro*.

SUMMARY. Genome variability of *in vitro* micropropagated Clematis plants was established. The optimum concentrations of BAP and zeatin in the culture medium regulating *in vitro* morphogenetic processes in clematis explants cv. Serenada Kryma were determined. Molecular-genetic analysis of Clematis plants obtained via *in vitro* somatic embryogenesis and organogenesis was carried out. Using ISSR primers 105 amplicons have been revealed, six of them were polymorphic. The mean index of heterogeneity of clematis plants was 5,7 %.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Риекстиня В.Э., Риекстиньш И.Р. Клематисы. — Л.: Агропромиздат, 1990. — 287 с.
2. Доношикина Е.А. Клематисы // Квіти України. — 1999. — № 10. — 72 с.
3. Ammirato P.U. Embryogenesis // Handbook of plant cell culture / Eds D.A. Evans et al. — New York : Macmillan, 1983. — 1. — P. 82–123.
4. Mitrofanova I., Mitrofanova O. Special features of somatic embryogenesis and plant regeneration of Clematis L. *in vitro* // Propagation of ornamental plants. — Sofia : Balkanpress, 2000. — P. 70–75.
5. Mitrofanova I.V., Yezhov V.N. Plant regeneration of Clematis L. through somatic embryogenesis *in vitro* // Bull. State Nikitsky Bot. Gardens. — 2002. — № 86. — P. 16–19.
6. Kanchan J., Mehra P.N. Morphogenesis in *Punica granatum* (Pomegranate) // Can. J. Bot. — 1986. — 64, № 8. — P. 1644–1653.
7. Mohan J.S., De Klerk G-J. Somaclonal variation in breeding and propagation of ornamental crops // Plant Tissue Cult. and Biotech. — 1998. — 4, № 2. — P. 63–75.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — 15. — P. 473–497.
9. Сиволап Ю.М. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях : Науч.-метод. руководство. — К., 1998. — 156 с.
10. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1979. — 76. — P. 5269–5273.

Поступила 31.03.03