

УДК 634.8:631.524.6.01

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ ВИНОГРАДА, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ РАЗЛИЧНОМ СВЕТОДИОДНОМ ОСВЕЩЕНИИ

Т. В. НИКОНОВИЧ, И. Е. ЗАЙЦЕВА

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»,
г. Горки, Республика Беларусь, 213407, e-mail: tvnikonovich@gmail.com

А. В. КИЛЬЧЕВСКИЙ

Президиум Национальной академии наук Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь, 220072, e-mail: a.kilchevsky@igc.bas-net.by

П. Ю. КОЛМАКОВ

Витебский государственный университет имени П. М. Машерова,
г. Витебск, Республика Беларусь, 210038, e-mail: pavel_kolmakov@list.ru

Ю. В. ТРОФИМОВ

РНПУП «Центр Светодиодных и оптоэлектронных технологий Национальной академии наук Беларуси»,
г. Минск, Республика Беларусь, 220090, e-mail: Trofimo119@gmail.com

(Поступила в редакцию 18.02.2019)

Использованы биотехнологические методы получения посадочного материала винограда в условиях *in vitro* при различном светодиодном освещении. Молекулярные исследования проводились для обнаружения различий между генотипами, между растениями одного генотипа на уровне ДНК.

В результате изучения влияния различного светодиодного освещения на генетический полиморфизм сортов винограда, выращенных в культуре *in vitro*, была модифицирована методика выделения тотальной ДНК из живого растительного материала на основе фенольного метода экстракции. Оптимизирована концентрация выделенной из растений-регенерантов тотальной ДНК. Подобраны условия амплификации с использованием неканонических праймеров из группы ОРА. Выполнена детекция полученных ампликонов с использованием геле-электрофореза для оценки степени генетической гетерогенности образцов. Экспериментальным путем доказано влияние спектров светодиодного освещения на геном растений различных сортов винограда культивируемых в условиях *in vitro*. Это влияние приводит к следующим изменениям в геноме: единичные замены оснований в геноме; выпадение сайтов праймирования; вставки участков, делающие сайты праймирования слишком удаленными и поэтому амплификация таких участков невозможна; инсерции, изменяющие размер амплифицирующегося участка. Значительное воздействие на геном оказывали варианты освещения, диапазон спектров у которых находится в следующих пределах: Blue, Red (470 нм, 625 нм), а также высокая плотность потока фотонов, составляющая $88,2 \pm 13,4$ мкмоль / (м²·с).

Использование праймера ОРА 01 выявляет генетический полиморфизм (% полиморфных локусов составляет 66,7 %) сорта Маршал Фош, а для сортов Маркетт, Бианка, Алaddin и Чарли характерно его отсутствие.

Ключевые слова: виноград, генетический полиморфизм, светодиодное освещение, ДНК.

We have used biotechnological methods for obtaining planting material of grapes *in vitro* with various LED lighting. Molecular studies were conducted to detect differences between genotypes and between plants of the same genotype at the DNA level.

As a result of studying the effect of different LED lighting on the genetic polymorphism of grapes grown *in vitro*, the method for isolating total DNA from living plant material based on the phenol extraction method was modified. The concentration of total DNA extracted from regenerated plants has been optimized. We have selected amplification conditions using non-canonical primers from the OPA group. The detection of the obtained amplicons was performed using gel electrophoresis to assess the degree of genetic heterogeneity of the samples. We have experimentally proved the influence of the spectra of LED lighting on the genome of plants of various grape varieties cultivated *in vitro*. This influence leads to the following changes in the genome: single substitutions of bases in the genome; loss of priming sites; plot inserts that make the priming sites too remote and therefore amplification of such plots is impossible; inserts that change the size of the amplified plot. A significant impact on the genome was made by the variants of lighting, the range of spectra of which is within the following limits: Blue, Red (470 nm, 625 nm), as well as a high photon flux density of 88.2 ± 13.4 $\mu\text{mol} / (\text{m}^2 \cdot \text{s})$.

The use of primer OPA 01 reveals a genetic polymorphism (% of polymorphic loci is 66.7%) of the Marshal Fosh variety, and its absence is characteristic of the Marquette, Bianca, Aladdin and Charlie varieties.

Key words: grapes, genetic polymorphism, LED lighting, DNA.

Введение

Развитие промышленного виноградарства стало перспективным направлением в условиях Беларуси. Это обусловлено в первую очередь отсутствием карантинных

вредителей и болезней, невысокой вредоносностью основных патогенов винограда. Возникает необходимость, используя современные биотехнологические методы, получать качественный посадочный материал. Для снижения его себестоимости в культуре *in vitro* перспективным направлением является использование установок на основе света искусственных диодов. Обладая низким энергопотреблением, светодиодные светильники позволяют сокращать расходы на освещение. Опыт использования света различного спектрального состава для выращивания растений показал неоднозначность влияния спектра на регенерационные процессы. Следовательно, оптимизация освещения для успешного формирования растений винограда в условиях *in vitro* требует тщательных исследований [1].

Известно, что при выращивании растений в условиях *in vitro* возможно проявление самоклональной изменчивости, нежелательного явления для получения однородного посадочного материала. Молекулярные методы способны выявить различия между генотипами и между растениями одного генотипа на уровне ДНК. Обнаружение полиморфизма возможно только на уровне ДНК, так как фенотипически он недостаточно проявляется. Использование молекулярного метода позволяет установить генетические отклонения на любой стадии развития растения, сокращая при этом время идентификации сортов, что особенно важно для многолетних культур [2].

Для изучения геномов растений и их маркирования широко применяются методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) с произвольными праймерами. С их помощью можно сравнивать различные геномы, не прибегая к необходимости получать информацию о нуклеотидной последовательности их конкретных участков. Благодаря методу ПЦР стало возможным получать любые интересующие последовательности ДНК в большом количестве копий. Существует несколько модификаций с произвольными праймерами. Техника множественного случайного ампликона (*Multiple Arbitrary Amplicon Profiling –MAAP*) базируется на трех основных методах. 1. Метод произвольно амплифицированной полиморфной ДНК (*Random Amplified Polymorphic DNA –RAPD*) [3]. 2. ПЦР с произвольным праймером (*Arbitrarily Primed PCR– AP-PCR*) [6]. 3. Фингерпринт амплифицированной ДНК (*DNA Amplification Fingerprinting –DAF*) [4, 5].

Уровень генетического полиморфизма природных популяций и культурных растений целесообразно определять при помощи *RAPD* и *ISSR*-маркеров. Для создания данных маркеров не требуется предварительного знания нуклеотидной последовательности исследуемой ДНК.

В ходе праймирования происходит ассоциация коротких олигонуклеотидов (*RAPD*-праймеров) с несколькими сайтами матричной ДНК, распределенных по всему геному. При *RAPD*-ПЦР каждый образец ДНК, в зависимости от праймера, дает 3–10 и более фрагментов, или полос на электрофореграмме, формирующей *RAPD*-профиль, или *RAPD*-паттерн. ДНК-фингерпринт – это уникальный для данного индивида набор варьируемых полос электрофореграммы, получаемый молекулярным маркированием.

Светогеномика – это новое направление, изучающее влияние различных спектров, их длины волн на генетический аппарат живых организмов. Известно, что развитие растительных объектов в условиях *in vitro* значительно отличается в зависимости от их культивирования при различном светодиодном освещении. Что происходит с генетическим аппаратом таких объектов и как это в дальнейшем влияет на физиологическое развитие растений неизвестно. Приблизиться к ответу на данный вопрос возможно при изучении генетического полиморфизма растений с использованием *RAPD*-маркеров и оценки влияния различного спектрального состава света на образование ДНК-фингерпринтов.

Целью наших исследований являлось изучение влияния различного светодиодного освещения на генетический полиморфизм сортов винограда, выращенных в культуре *in vitro*.

Основная часть

Материалом для исследований являлась выделенная тотальная ДНК из растений-регенерантов винограда сортов Маркетт, Маршал Фош, Бианка, Чарли и Аладдин, которые культивировались на искусственной питательной среде Мурасиге-Скуга при различном светодиодном освещении.

В качестве экспериментальных источников освещения использовались следующие варианты: 1–10 светодиодные ленты с моно- и смешанными спектрами *Red, Green, White, Blue, Yellow* в различных соотношениях; 11 светодиодный светильник, в качестве основных источников света, содержащий три типа светодиодов: *Blue, Red, Green*; 12–21 модельный ряд светодиодных светильников серии «Светодар» производства Государственного предприятия «ЦСОР НАН Беларуси». В качестве контроля применялась люминесцентная лампа марки *OSRAM L 36W/765 Cool Daylight*.

Исследования выполнялись при финансовой поддержке Фонда Фундаментальных Исследований Республики Беларусь в рамках проекта №Б17-155. Получение и культивирование растений-регенерантов при различном светодиодном освещении проводилось на кафедре сельскохозяйственной биотехнологии, экологии и радиологии БГСХА, молекулярно-генетический анализ с использованием *RAPD*-техники выполнялся в генетических лабораториях БГСХА и ВГУ имени П. М. Машерова. В результате научных экспериментов была модифицирована методика выделения тотальной ДНК из живого материала образцов винограда на основе фенольного метода экстракции ДНК. Определены стадии выделения ДНК: 1) навеску растительного материала гомогенизировать до однородного состояния, затем прилить в ступку 500 мкл экстракционного буфера и перелить экстракт в микроцентрифужную пробирку типа *Eppendorf* на 1,5 мл. Содержимое перемешать на вортексе; 2) поместить микроцентрифужные пробирки в термостат на 30–40 минут при температуре 40 °С. Перемешивать на вортексе каждые 10 минут; 3) поместить образцы в ледяную баню; 4) прилить к образцам 500 мкл фенол-хлороформа (1:1), перемешать на вортексе 2–3 минуты или энергичными встряхиваниями рукой. Центрифугировать 10 минут при 10000 об/мин. Отобрать верхнюю фазу в новую пробирку; 5) прилить 500 мкл хлороформ-изоамилового спирта (1:24). Интенсивно перемешать переворачиванием 2–3 минуты. Центрифугировать 10 минут при 10000 об/мин. Отобрать верхнюю фазу; 6) добавить двойной объем 96 % этилового спирта. Центрифугировать 5 минут на 6000 об/мин; 7) отобрать надосадочную жидкость. Прилить 500 мкл 70 % этилового спирта. Перемешать на вортексе. Центрифугировать 5 минут на 6000 об/мин.; 8) слить надосадочную жидкость. Высушить ДНК в термостате при 30 °С. Растворить осадок тотальной ДНК в ТЕ буфере [6].

Важным условием для получения *RAPD*-паттернов ДНК является очистка полученной ДНК от примесей РНК. Очищали ДНК рабочим раствором РНК-азы (100 мкл тотальной ДНК на 1 мкл РНК-азы), после чего хлороформ-изоамиловой смесью (1:24) и спиртом. На последней стадии полученный материал растворяли в ТЕ-буфере и хранили при температуре – 20 °С.

Проверку чистоты ДНК, свободной от РНК, проводили путем измерения оптической плотности раствора при длинах волн 260, 280 и 235 нм, то есть на максимумах поглощения растворов ДНК, белков и полисахаридов соответственно. Для определения полиморфизма использовали праймеры-декамеры, разработанные компанией *Operon Biotechnologies, Inc.* (США).

Для приготовления мастермикса рекомендуем использовать 5 нг/мкл тотальной ДНК (нами была определена экспериментальным путем), X10 буфер А, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM DNTPs, 0,3 μM праймера ОРА 01, 1,2 U Taq-полимеразы. Нуклеотидная последовательность праймера: 5'-CAGGCCCTTC-3'.

Реакция амплификации осуществлялась при следующих условиях: первичная денатурация 5 мин при 94 °С; денатурация 10 сек при 94 °С, отжиг 30 сек при 36 °С, элонгация 1 мин при 72 °С, 35 циклов; заключительная элонгация 5 мин при 72 °С.

Одна из основных особенностей проведения электрофореза – это разгонка ампликонов вначале на 80 V в течение пяти минут, для лучшего их внедрения в агарозный гель, а затем при 40 V в течение 5–6 часов. Использование низкого напряжения позволило более эффективно произвести разделение фрагментов ДНК и образовать RAPD-профили, пригодные для статистического анализа.

Анализ RAPD-паттернов осуществлялся на основании бинарной системы учета: 0 – отсутствие фрагмента ДНК, 1 – наличие фрагмента ДНК.

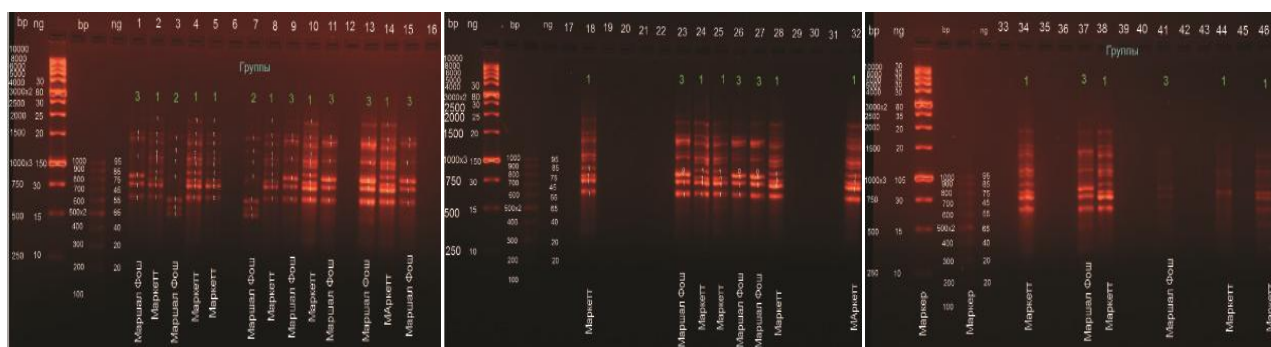
RAPD-анализ с праймером OPA 01 позволил обнаружить наличие или отсутствие генетического полиморфизма у растений-регенерантов исследуемых сортов винограда (табл. 1). С используемым праймером было выявлено от 4 до 11 фрагментов ДНК размером от 400 до 2000 п. н.

Для каждого сорта был получен уникальный RAPD-спектр. Растения сорта Маркетт являются генетически однородными – группа № 1 (рис. 1А, Б, В). Они характеризовались всего лишь одним типом RAPD-профиля с четко конкретными повторяющимися полосами. Все полученные паттерны идентичны по основным профилям.

Таблица 1. Число полиморфных локусов и воспроизводимых RAPD-фрагментов, полученных из различных сортов винограда с использованием праймера OPA 01

Сорт винограда	F	P, %
Аладдин	5	0
Бианка	4	0
Маркетт	11	0
Маршал Фош	7	66,7
Чарли	6	0

Примечание. F – число воспроизводимых RAPD-фрагментов, P – число полиморфных локусов, %.



А – образцы 1-16

Б – образцы 17-32

В – образцы 33-45

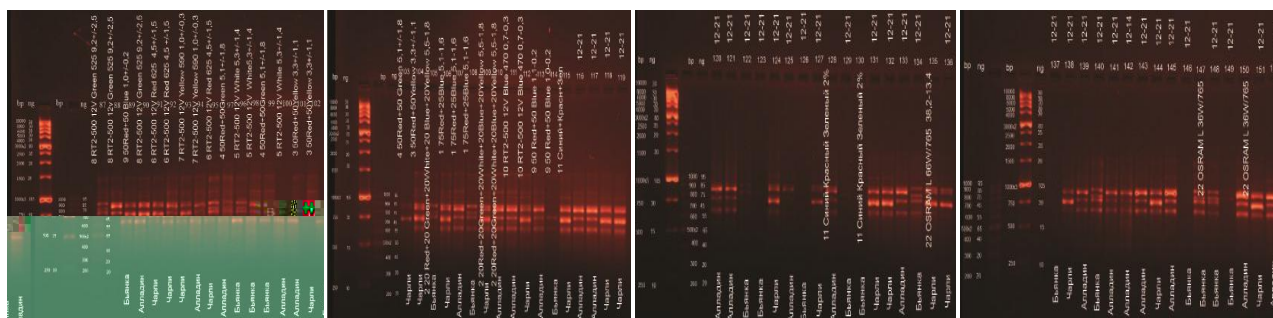
Рис. 1. RAPD-профили амплифицированной ДНК растений-регенерантов Маршал Фош и Маркетт при различном светодиодном освещении (образцы 1–45)

Растения сорта Маршал Фош генетически гетерогенны и выделились в две генетические группы: группа № 2 и № 3 (рис. 1А, Б, В). Между ними не выявлено переходных форм по всему объему выборки. Существуют только четко выделенные группы, что характерно для культурных сортов, выведенных искусственным методом отбора. Генетически неоднородные сорта характеризуются несколькими четко различимыми группами RAPD-паттернов. В таких условиях группировка данных может быть качественной и количественной.

Растения сортов Бианка, Чарли и Аладдин не отличались генетическим полиморфизмом и формировали идентичные RAPD-профили в пределах каждого сорта (рис. 2 А, Б, В, Г).

Анализ паттернов показал, что существует две ситуации, которые можно охарактеризовать как «все или ничего». В случае с четкими паттернами: праймер хорошо и четко садился на сайты узнавания. Во втором случае: праймер таких участков не находил. Это объясняется тем, что при некоторых вариантах освещения происходит «выключение» определенных участков геномной ДНК: сайты узнавания попали на такие участки и реакция амплификации не прошла. Если бы сложившаяся ситуация зависела от накопившихся в биоматериале полифенольных соединений, тормозивших реакцию

амплификации, то существовали бы «переходные» формы по яркости паттернов в ультрафиолете, но таких форм получено не было. Следовательно, кардинальных изменений в геноме у растений винограда не происходит. Установлено «выключение» отдельных участков ДНК из работы при определенных спектрах света.



А – образцы 87-102

Б – образцы 103-119

В – образцы 120-136

Г – образцы 137-152

Рис. 2. RAPD-профили амплифицированной ДНК растений-регенерантов сортов Аладдин, Бианка, Чарли при различном светодиодном освещении (образцы 87–152)

В Институте генетики и цитологии НАН Беларуси проводилась пробная реакция секвенирования по Сенгеру. Использовались неканонические праймеры: *rbcL* и *matK*. В отношении образцов винограда особенность этих праймеров в том, что сайты узнавания могут находиться в разных местах генома, что и определяет различия между образцами. Примененные праймеры показали только отличие в пределах рода и не могут быть использованы в определении внутривидовой генетической гетерогенности. Практикой была доказана эффективность использования методики RAPD маркирования, поскольку в экспериментах задействован весь геном образцов. RAPD маркирование чувствительно к малейшим внутривидовым изменениям генома, что, в данном случае, и требовалось выявить.

Заключение

Экспериментальным путем доказано влияние спектров светодиодного освещения на геном различных сортов винограда, культивируемых в условиях *in vitro*. Это влияние приводит к следующим изменениям в геноме: единичные замены оснований в геноме; выпадение сайтов праймирования; вставки участков, делающие сайты праймирования слишком удаленными и поэтому амплификация таких участков невозможна; инсерции, изменяющие размер амплифицирующегося участка.

Значительное воздействие на геном оказывали варианты освещения, диапазон спектров у которых лежал в пределах: *Blue*, *Red* (470 нм, 625 нм), а также плотность потока фотонов составляла $88,2 \pm 13,4$ мкмоль / (м²·с). В данных случаях реакция амплификации не происходила. Частичное воздействие на геном оказывали варианты освещения со значительным наличием зеленого спектра. Чем больший процент *Blue*, *Red* спектров в вариантах освещения и при этом более высокий поток фотонов, тем сильнее воздействие, оказываемое на геном. Важными параметрами, определяющими цитогенетические эффекты, являются также плотность потока фотонов и длина волны светодиодного освещения.

Использование праймера ОРА 01 позволило выявить генетический полиморфизм у сорта Маршал Фош. Процент генетического полиморфизма составил 66,7 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никонович, Т. В. Влияние спектрального состава света на рост и развитие растений-регенерантов винограда в период адаптации к условиям *in vivo* / Т. В. Никонович, А. В. Левый, В. В. Французенок // Вестник БГСХА. – 2012. – № 2. – С. 70–75.
2. Использование ISSR-анализа для изучения внутри-и межвидового генетического полиморфизма различных таксонов высших растений / З. Е. Грушецкая, Т. В. Никитинская, С. В. Кубрак [др.] // Вестник БГУ. Сер.2, биол. географ. и хим. науки. – 2013, – № 3. – С. 50–56.
3. Williams, J. G. K. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers / J. G. K. Williams, A. R. Kubelik, K. J. Livak // Nucl. Acids Res, 1990. – V.18. – P 6531–6535.
4. Welsh, J. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers / J. Welsh, M. McClelland // Nucl. Acids Res, 1991. – V.18. – P. 7213–7218.

5. Coetano-Anolles, G. Amplifying DNA with Arbitrary Oligonucleotide Primers / G. Coetano-Anolles // PCR Methods and Applications, 1993. – V.4. – P.85–94.
6. Никонович, Т. В. Особенности экстракции ДНК из растений винограда, культивируемых в условиях *in vitro* при различном светодиодном освещении / Т. В. Никонович, П. Ю. Колмаков, И. Е. Зайцева, Г. Г. Пирханов, А. Ю. Леонов // Международный симпозиум по геномике, приуроченному к Году Науки в Республике Беларусь. Тезисы докладов. – Минск, 2017. – С. 146–147.