

ВИКОРИСТАННЯ IRAP МАРКЕРІВ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ГЕНЕТИЧНОЇ СТАБІЛЬНОСТІ ЕКСПЛАНТІВ ПІДЩЕПИ ГІЗЕЛА 6 ПІСЛЯ ХЕМОТЕРАПІЇ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

**Тряпичина Н.В., Кисельов Д.О., Медведсва Т.В.,
Васильєв Р.О.**

Інститут садівництва НААН,
вул. Садова, 23, Новосілки, Київ-27, 03027
E-mail: tryapic@ukr.net

У роботі показано використання IRAP маркерів для ідентифікації підщепи Гізела 6 та виявлення генетичної однорідності in vitro рослин, оброблених Аміксином® ІС та саліциловою кислотою в різних концентраціях для хемотерапії.

Ключові слова: підщепна Гізела 6, вірус скручування листя черешні, хемотерапія, Аміксин® ІС, саліцилова кислота, експланти, генетична однорідність.

Культивування вишні та черешні за інтенсивною технологією потребує якісних змін в культурі садівництва, зокрема використання лише здорового садивного матеріалу. Вивчення клонових підщеп типу Гізела (*P. cerasus*×*P. canescens*) в умовах інтродукції у вітчизняних насадженнях свідчать про досить високу їх чутливість до інфікування вірусом скручування листя черешні (*Cherry leaf roll virus*, ВСЛЧ) [1]. Вірус викликає деформацію і скручування листя черешні та вишні, прижилкову мозаїчність, затримку у рості та відмирання окремих гілок або і всього дерева.

Відомо, що НЕПО-віруси, до яких належить і ВСЛЧ, мають здатність колонізувати меристемні тканини, тим самим знижуючи терапевтичний ефект методу культури тканин. Тому для оздоровлення інфікованих рослин метод культури тканин поєднують з термо- чи хемотерапією. Для хемотерапії найефективнішими є синтетичні аналоги пуринових і піримідинових основ, ферменти рибонуклеази тощо. Але через їх мутагенність та високу вартість виникла потреба пошуку інших препаратів з антивірусною активністю, які б не створювали ризиків генетичної дестабілізації мериклонів.

Метою наших досліджень був контроль генетичної стабільності експлантів підщепи Гізела 6, оброблених такими

антивірусними препаратами, як саліцилова кислота (СК) та Аміксин® ІС, на фоні різної за силою хемотерапевтичної дії цих сполук.

Матеріали і методи. Роботу виконували у відділі вірусології, оздоровлення та розмноження плодкових і ягідних культур Інституту садівництва НААН протягом 2009–2011 рр. Об'єктом дослідження слугувала напівкарликова підщепа Гізела 6.

Культивування *in vitro* і хемотерапія. Для ініціювання культури *in vitro* використовували верхівкові та пазушні бруньки. Як стерилізуючий агент застосовували сулему (0,1 % HgCl_2) і 70 %-й етанол. Експозиція стерилізації складала 1–3 хвилини. На етапі введення в культуру та проліферації використовували модифіковане живильне середовище Мурасіге–Скуга з додаванням вітамінів та фітогормонів, рН 5,5–5,7. Експланти культивували при 16-годинному світловому дні з освітленням 2000–2500 лк при $t^\circ=23\text{--}25$ °С і вологості повітря 50–60 %. Інфіковані лінії розмножених пагонів були використані як вихідний матеріал для хемотерапії *in vitro*.

Саліцилову кислоту (10,15 і 20 мг/л) та препарат Аміксин® ІС (100,150 і 200 мг/л) (ОАО ІнтерХім, Одеса), які використовували як віроциди, стерилізували через мембранний фільтр ($d=0,22$ μm) і додавали в середовище після автоклавування. У контролі антивірусних препаратів не додавали. Тривалість пасажу складала 30 днів. На кожен варіант було використано по десять мікропагонів.

Ідентифікація вірусу. Для оцінки впливу різних концентрацій віроцидів на вміст ВСЛЧ в експлантах підщепи ідентифікацію вірусу проводили методом напівкількісного ІФА з використанням поліклональних антитіл виробництва Loewe Phytodiagnostica (Німеччина) [2]. При тестуванні матеріалу з культури *in vitro* відбирали частину експланту, не занурену в середовище. Розведення проби в гомогенаті складало 1:100. Контрольні зразки підщепи проходили ті ж самі етапи культивування, що й експериментальні, але без внесення в середовище антивірусних препаратів.

Оцінка змін концентрацій вірусу в експлантах. Зміни у концентрації вірусів оцінювали як відношення різниці між показниками оптичної густини експериментального інфікованого та контрольного здорового зразка до різниці між оптичною густиною контрольного інфікованого зразка та контрольного здорового

зразка:

$$A = \frac{OD_{\text{exp}} - OD_{\text{contr neg}}}{OD_{\text{contr pos}} - OD_{\text{contr neg}}} \%,$$

де $OD_{\text{contr pos}}$ – значення оптичної густини контрольного інфікованого зразка, $OD_{\text{contr neg}}$ – значення оптичної густини контрольного здорового вірус-негативного зразка, OD_{exp} – значення оптичної густини експериментального зразка.

Оцінка генетичної стабільності експлантів. ДНК виділяли з молодих свіжих листків за використання гексадецилтриметил амоніум броміду (ЦТАБ).

Для проведення IRAP-ПЛР використовували праймер до консервативної ділянки довгих кінцевих повторів (LTRs) соєвого ретротранспозону SIRE-1 з нуклеотидною послідовністю: 5'-GCA-CTT-ATG-CAA-GTG-GGA-TCA-GC-3'.

Ампліфікацію проводили в 15 мкл реакційної суміші, що складалася з 10 mM TRIS-HCl; 50 mM KCl; 2,2 mM хлориду магнію ($MgCl_2$); 2 mM кожного з чотирьох дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP); 0,2 мкМ праймера, 1 од. акт. Taq ДНК полімерази та 100–120 нг геномної ДНК. Умови ПЛР включали початкову денатурацію 95 °C – 5 хв і 35 послідовних циклів: 95 °C – 30 с, 58 °C – 30 с, 72 °C – 2 хв 30 с. Кінцева елонгація 72 °C – 7 хв. ПЛР із кожним зразком проводили в трьохкратній повторності.

Продукти ампліфікації геномної ДНК експлантів та маточних польових рослин аналізували за допомогою електрофорезу в агарозному 2,0 % гелі з додаванням 0,5 мкг/мл бромистого етидію в Трис-ацетатному буфері при напрузі електричного поля 2 В/см протягом 7–8 годин.

Опрацювання результатів електрофорезу проводили за допомогою пакету програмного забезпечення TotalLab v2.01. При цьому кожен ампліфікаційний фрагмент, або молекулярно-генетичний IRAP-маркер, який є анонімною геномною послідовністю, фланкованою інвертованими фрагментами довгих кінцевих повторів соєвого ретротранспозону SIRE-1, вважали домінантним алелем окремого локусу. Ампліфікаційні фрагменти однакової молекулярної маси, які відтворювалися в спектрах різних зразків, оцінювали як ідентичні. Відсутність ампліфікаційного фрагменту

розцінювалася як рецесивний алель відповідного локусу.

Статистичну обробку результатів проводили за використання програм EXEL та MiniTab.

Результати та обговорення. Контроль генетичної стабільності експлантів при масовому розмноженні рослин методом культури *in vitro* сьогодні є невід'ємною складовою процесу. В цілому можна виділити дві основні форми можливих змін: генетичні та епігенетичні. Відрізнити генетичні зміни від морфозів виключно за візуальними оцінками непросто. Крім того, генетичні мутації не обов'язково призводять до видимих фенотипових змін у рослини, але згодом потомство такої рослини вже не буде у повній мірі відповідати стандартам певного сорту. Частота появи таких змін може суттєво варіювати в залежності від їх типу та виду рослини, а також від способу розмноження та від додавання до живильного середовища мутагенних компонентів, якими є більшість антивірусних агентів.

У відомій нам науковій літературі не виявлено інформації щодо використання аміксину для елімінації вірусів рослин та про його можливий вплив на генетичну стабільність експлантів. Діючою речовиною препарату аміксин є тилорон – дигідрохлорид 2,7-біс-[2-(диетиламіно)етокси]–флуорен-9-он, синтетична низькомолекулярна сполука, механізм антивірусної дії якої у людини пов'язують із здатністю стимулювати утворення інтерферонів. У рослин це питання поки що не вивчалось. Нами показано відсутність негативного впливу аміксину в досліджуваних концентраціях на розвиток експлантів підщепи. Після культивування мікропагонів підщепи Гізела 6 на середовищі з аміксином методом ІФА виявлено падіння концентрація ВСЛЧ від 83,21 % до 100 % в залежності від вмісту аміксину. Причому достовірна різниця між концентрацією вірусу в експлантах мала місце лише між варіантами I і III – 100 мг/л і 200 мг/л, відповідно. Достовірної кореляції між вмістом аміксину у середовищі та концентрацією вірусу в експлантах не виявлено ($\text{corr} = -0,845292$, $p \geq 0,05$).

При додаванні саліцилової кислоти в середовище для культивування мікропагонів підщепи Гізела 6, інфікованих вірусом скручування листя черешні, виявлено негативну достовірну кореляцію між вмістом СК в середовищі та оптичною густиною експериментальних зразків, яка пропорційна концентрації вірусу в експлантах ($-0,948596$, $p < 0,05$) (табл. 1). При цьому достовірної

різниці між концентраціями вірусу в сусідніх варіантах (а саме: варіанти I та II, II та III) не виявлено. Достовірна різниця мала місце лише між варіантами I і III. При всіх досліджених нами концентраціях саліцилової кислоти повної елімінації вірусу не досягнуто. Не відмічали також негативного впливу СК в цих концентраціях на ріст і розвиток мікропагонів підщепи.

Коефіцієнти детермінації (R^2) за лінійними рівняннями, які описують падіння концентрації вірусів в експлантах із збільшенням вмісту віроцидів свідчать, що вклад СК у падіння концентрації вірусу становить 89,98 %, а аміксину – значно менше, 71,45 % (рис. 1). У той же час елімінація ВСЛЧ за даними імуноферментного аналізу була ефективнішою саме під впливом аміксину. Це може свідчити про можливість існування синергічного впливу компонентів живильного середовища на дію аміксину. Чи є БАП тим чинником, що посилює антивірусну дію аміксину, ще має бути досліджено. Можливим механізмом дії аміксину може бути або прямий вплив на обмеження реплікації вірусу в рослині або індукція сигнальних процесів для запуску внутрішньоклітинних захисних реакцій.

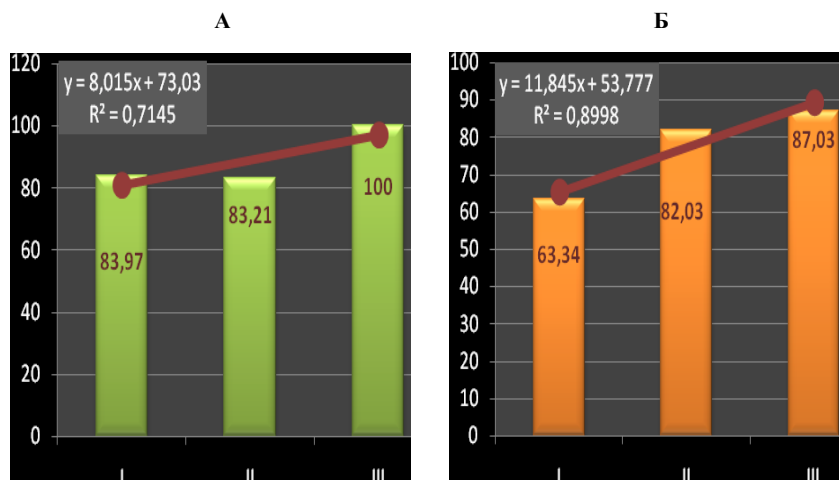


Рис. 1. Зміна концентрації вірусу СЛЧ (%) в експлантах підщепи Гізела 6 при різних концентраціях у живильному середовищі аміксину (А) та саліцилової кислоти (Б)

Нами не виявлено пригнічення проліферації та коренеутворення мікропагонів у відповідь на дію як аміксину, так і СК (рис. 2). Не відмічено також достовірної різниці між коефіцієнтами

розмноження на різних пасажах між експлантами, обробленими за різними схемами хемотерапії. Для підтвердження відсутності змін на генетичному рівні було проведено підбір оптимізованих молекулярних маркерів з високими дискримінаційними характеристиками для оцінки генетичного поліморфізму експлантів підщепи Гізела 6 після хемотерапії, проведеної за різними схемами з використанням різних антивірусних агентів.

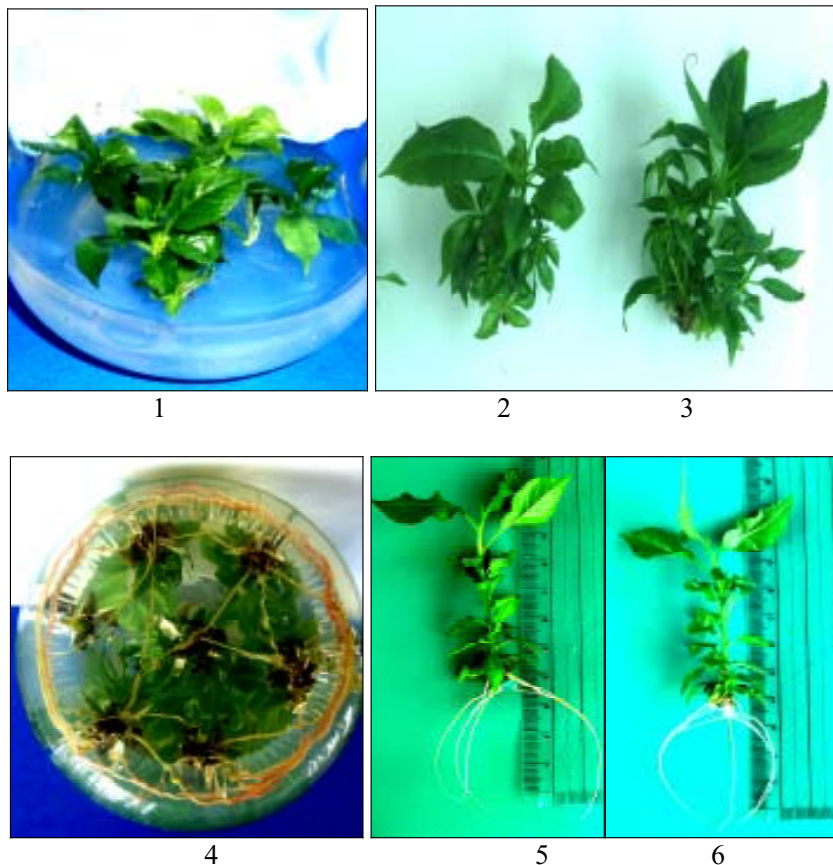


Рис. 2. Проліферація (V пасаж) та коренеутворення мікропагонів підщепи Гізела 6:

1 – проліферація мікропагонів, оброблених аміксином у концентрації 200 мг/л; 2 – мікропагон, оброблений аміксином; 3 – мікропагон, оброблений СК; 4 – коренеутворення у рослин, оброблених СК; 5 – коренеутворення у експланта, обробленого аміксином; 6 – коренеутворення у експланта, обробленого СК.

Для оцінки генетичної стабільності експлантів при мікроклональному розмноженні плодових та ягідних культур все більшого поширення набувають молекулярно-генетичні маркери, отримання яких базується на використанні полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Велика кількість модифікацій цього методу надає широкі можливості щодо маркування геномів у залежності від цілей дослідження. В цьому контексті зручними маркерними системами є такі, що дозволяють отримувати полілокусні ампліфікаційні спектри анонімної геномної ДНК, фланкованої інвертованими повторюваними послідовностями. Для рослин такі методи особливо перспективні з огляду на широку представленість у рослинних геномах повторюваних послідовностей різних класів.

Однією з таких модифікацій ПЛР є метод виявлення поліморфізму ампліфікованих міжтранспозонних послідовностей – IRAP (inter retrotransposon amplified polymorphism) [3]. Найчастіше для нього використовують ретротранспозони, які мають довгі кінцеві повтори – LTR (long terminal repeats) – ділянки, які є найбільш консервативними та зручними для підбору праймерних послідовностей. Саме до такого класу, зокрема *Ty1/Copia-like* ретротранспозонів, відноситься соєвий ретротранспозон SIRE-1 [4], який було використано у нашій роботі. Ретротранспозони, або мобільні елементи є відносно молодими елементами еукаріотичних геномів, їх здатність до копіювання та розповсюдження в геномі робить їх зручною моделлю для отримання молекулярно-генетичних маркерів, які дозволяють диференціювати саме найближчі генетичні події в геномах рослин. Перевагами цього методу є високий рівень поліморфізму IRAP-маркерів, завдяки великій копійності таких послідовностей, висока відтворюваність спектрів ампліфікації, яка дозволяє стандартизувати цей метод та створює можливість міжлабораторних порівнянь, а також високі дискримінаційні можливості методу для виявлення як міжвидового, так і внутрішньовидового поліморфізму.

Застосування праймеру до довгих кінцевих повторів соєвого ретротранспозону SIRE-1 в сумі дозволило отримати 18 мономорфних IRAP-маркерів (рис. 3). Не було зафіксовано проблем з відтворенням спектрів ампліфікації, відповідно загальний рівень відтворюваності спектрів ампліфікації в проведеному експерименті склав 100 %. Було проведено порівняння генетичних профілів експлантів, оброблених різними концентраціями віроцидів, а

також профілів польових маточних рослин, від яких брали матеріал для введення в культуру. Зокрема було перевірено інфікований та здоровий маточний куці. Всі перевірені зразки характеризувалися однаковими генетичними профілями, що свідчить про генетичну ідентичність мериклонів за виявленими IRAP-маркерами.

У подальшому планується провести хемотерапію експлантів підщепи Гізела 6 з підвищеними концентраціями аміксіну та СК з відповідним контролем їх генетичної стабільності.

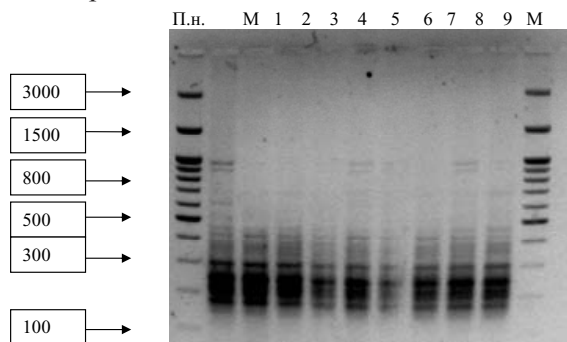


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації геномної ДНК маточних куці та експлантів підщепи Гізела 6 на *V* пасажі, оброблених віроцидами у різних концентраціях:

М – маркер молекулярних мас, 1 – позитивний контроль (інфікований маточний куці, від якого відбирали матеріал для введення), 2 – негативний контроль (здоровий маточний куці), 3 – СК 10 мг/л, 4 – СК 15 мг/л, 5 – СК 20 мг/л, 6 – аміксин 100 мг/л, 7 – аміксин 150 мг/л, 8 – аміксин 200 мг/л), 9 – *in vitro* рослина (інфікована) без хемотерапії.

Таким чином, у ході досліджень не виявлено негативного впливу аміксіну та СК в досліджуваних концентраціях на ріст і розвиток експлантів підщепи Гізела 6.

Застосування молекулярно-генетичних IRAP-маркерів не дозволило виявити генетичного поліморфізму в експлантах підщепи Гізела 6, оброблених аміксіном у концентраціях 100, 150 і 200 мг/л та саліциловою кислотою у концентраціях 10, 15 і 20 мг/л у порівнянні з маточним куцем, від якого відібрано матеріал для введення в культуру.

Доцільно повторити дослід з використанням аміксіну та саліцилової кислоти з більш високими концентраціями та з більшими інтервалами між ними.

1. Тряпичина Н.В. Оцінка клонових підщеп вишнево-черешневої групи за інфікованістю вірусами плодових /Тряпичина Н.В., Васюта С.О. //Вісник аграрної науки. – 2010. – № 10. – С. 22–24.

2. Clark M.F. Characteristics of the microplate method of the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus /M.F. Clark, A.N. Adams //J.Gen.Virol. – 1977. – Vol. 34, № 3. – P. 475–483.

3. Kalendar R. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting /Kalendar R., Schulman A.H. //Nature Protocols. – 2006. – Vol. 1, № 5. – P. 2478–2484.

4. Laten H.M. SIRE1, an endogenous retrovirus family from *Glycine max*, is highly homogeneous and evolutionarily young /Laten H.M., Havecker E.R., Farmer L.M., Voytas D.F. //Mol. Biol. Evol. – 2003. – № 20 (8). – P. 1222–1230.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ IRAP МАРКЕРОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ЭКСПЛАНТОВ ПОДВОЯ ГИЗЕЛА 6 ПОСЛЕ ХЕМОТЕРАПИИ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

**Тряпичина Н.В., Киселев Д.А., Медведева Т.В.,
Васильев Р.О.**

Институт садоводства НААН, г. Киев

В работе использованы IRAP маркеры для идентификации подвоя Гизела 6 и выявления генетической однородности in vitro растений, обработанных Амиксином® IC и салициловой кислотой в разных концентрациях для химиотерапии.

Ключевые слова: подвой Гизела 6, вирус скручивания листьев черешни, химиотерапия, Амиксин® IC, салициловая кислота, экспланты, генетическая однородность.

USE OF IRAP MARKERS FOR CONTROL OF GENETIC STABILITY OF GISELA 6 ROOTSTOCKS *IN VITRO* AFTER CHEMOTHERAPY

**Trypitsyna N.V., Kyselyov D.O., Medvedyeva T.V.,
Vasyliiev R.O.**

Institute of Horticulture NAAS, Kyiv

Present study covers the use of IRAP markers for identification of Gisela-6 rootstocks and detection of genetic uniformity of in vitro plants treated with different concentrations of Amixin® IC and SA (salicylic acid) for chemotherapeutic purpose.

Key words: rootstock Gisela-6, Cherry leaf roll virus, chemotherapy, Amixin® IC, salicylic acid, explants, genetic uniformity.