

УДК 575.22: 582.923.1 + 576.5

RAPD- ТА ISSR-АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОЇ МІНЛИВОСТІ У КУЛЬТУРІ ТКАНИН ТА ОРГАНІВ ТИРЛИЧУ ЗВИЧАЙНОГО (*GENTIANA PNEUMONANTHE L.*)

І.І. КОНВАЛЮК¹, В.М. МЕЛЬНИК¹, Н.М. ДРОБИК², Н.Б. КРАВЕЦЬ²,
М.О. ТВАРДОВСЬКА¹, В.А. КУНАХ¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150
e-mail: kunakh@imbg.org.ua

²Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка
Україна 46027, м. Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2
e-mail: drobyk.n@gmail.com

*Досліджено соматоклональну мінливість у культурі тканин і органів *G. pneumonanthe* з використанням RAPD- та ISSR-маркерів. Виявлено вплив тривалості культивування, типу росту та способу регенерації на мінливість у культурі *in vitro*. Встановлено, що соматоклональна варіабельність була значно меншою за внутрішньопопуляційний поліморфізм у природі. Рівень генетичних змін був найменшим у регенерантах і найбільшим – у тривало культивованих калюсних тканинах та швидкоростучій культурі ізольованих коренів. Отримані результати свідчать про відносну генетичну стабільність геному цього виду при вирощуванні *in vitro*.*

*Ключові слова: *Gentiana pneumonanthe L.*, культура тканин і органів, рослини-регенеранти, соматоклональна мінливість, RAPD- та ISSR-ПЛР, генетична відстань.*

Вступ. Процес калюсоутворення та умови подальшого вирощування рослинних клітин і тканин *in vitro* є стресовими чинниками, що здійснюють суттєвий вплив на стабільність геному та експресію генів. Соматоклональна мінливість, яка виникає при цьому, обумовлена дією декількох чинників: генетичною неоднорідністю клітин вихідного експланта, впливом компонентів живильних середовищ (перш за все, фітогормонів), умовами та тривалістю культивування [1–5]. Генетичні зміни виявлені не лише в культурі клітин і тканин *in vitro*, але і в отриманих із них рослинах-регенерантах [1, 6, 7].

Для оцінки рівня мінливості використовують молекулярно-генетичні підходи, серед яких найпоширенішими є методи на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [6, 8–10]. Достовірніші дані вдається отримати при одночасному використанні кількох типів генетичних маркерів, що дозволяє порівняти різні ділянки геному та виявити генетичну відмінність досліджуваних зразків за ними [3, 9–11]. За допомогою RAPD-ПЛР нами було показано мінливість у культурі тканин трьох представників роду *Gentiana L.* (*G. acaulis*, *G. punctata*, *G. cruciata*) – цінних лікарських рідкісних рослин [12]. Встановлено, що для цих видів рівень генетичної гетерогенності в культурі *in vitro* залежав від видової приналежності.

Серед вивчених тирличів, у культурі *in vitro* великий морфогенний потенціал має *G. pneumonanthe*, для якого розроблено протоколи регенерації, а також отримано різні за походженням, тривалістю вирощування та типом росту культури тканин [13, 14]. Дослідження особливостей мінливості в процесі неорганізованого росту та регенерації цього виду в умовах *in vitro* й було метою даної роботи.

Матеріали і методи

Матеріалом для вивчення слугували зразки *G. pneumonanthe* з двох популяцій: Корюківського лісництва (Чернігівська обл.) і с. Вигода (Івано-Франківська обл.). Досліджували рослини з природної популяції Корюківського лісництва; асептичні рослини, вирощені з насіння в стерильних умовах, які використовували для отримання культури *in vitro* (рослини-донори); неморфогенні культури тканин кореневого походження різної тривалості вирощування; морфогенні калюси із зачатками коренів і пагонів, отримані з неморфогенних; регенеранти, одержані шляхом прямого та непрямого органогенезу, а також культуру ізольованих коренів [13–15].

«Прямі» регенеранти стеблового походження отримали від асептичних рослин вигодської популяції при використанні живильного середовища Мурасіге-Скуга (МС), доповненого 10 мг/л тидіазурону і 1 мг/л гіберелової кислоти (ГК₃). Для отримання регенерантів шляхом непрямого органогенезу однорічний морфогенний калюс вирощували протягом року на середовищі МС, доповненому 0,1–0,2 мг/л 6-бензиламінопурину та 1,0 мг/л ГК₃.

Вивчали п'ять генотипів рослин *G. pneumonanthe* з Корюківського лісництва: три дикорослі рослини з природної популяції; дві рослини-донори (К₁ і К₂) та отримані від них культури тканин (рис. 1). На основі порівняння цих генотипів визначали межі внутрішньопопуляційної мінли-

вості. У роботі використовували неморфогенний калюс різної тривалості вирощування – 6 місяців, 3 та 4 років, отриманий з рослини-донора К₁ (рис. 1, а). Генотип К₂, окрім рослини-донора, був представлений неморфогенним піврічним калюсом кореневого походження та одержаними від нього 1-річними морфогенними, 1- та 2-річними неморфогенними культурами; «непрямим» регенерантом, отриманим з 1-річного морфогенного калюсу; культуру ізольованих коренів (рис. 1, б). Зразки *G. pneumonanthe* з вигодської популяції (генотип В) представлені рослиною-донором та отриманими від неї культурами тканин і органів. Для аналізу використовували: 3-місячний калюс та одержані від нього 1- і 1,5-річні морфогенні та 1-, 1,5- і 3-річні неморфогенні калюси; культуру ізольованих коренів; регенерант стеблового походження, отриманий шляхом прямої регенерації (рис. 1, в).

Виділення ДНК та гель-електрофорез продуктів ампліфікації проводили за підібраними раніше методиками [16]. Для дослідження обрали довільні послідовності (RAPD-аналіз) та ділянки геному, фланковані інвертованими повторами мікросателітних локусів (ISSR-аналіз). 17 із 27 протестованих RAPD-праймерів забезпечували синтез чітких відтворюваних ампліконів і були відібрані для подальших досліджень. Умови проведення полімеразної ланцюгової реакції з праймерами довільної послідовності (RAPD-ПЛР) та нуклеотидні послідовності використаних праймерів наведено у роботі [16]. Також у роботі використано 13 ISSR-праймерів (табл.) [17], з яких 10 давали чіткі відтворювані спектри ПЛР-продуктів і були відібрані для подальших досліджень. Для ампліфікації фрагментів застосовували наступний температурний режим: 95 °С – 2 хв, 35 × (94 °С – 30 с, 53 °С – 30 с, 72 °С – 1 хв 30 с), 72 °С – 5 хв. Склад реакційної суміші від-

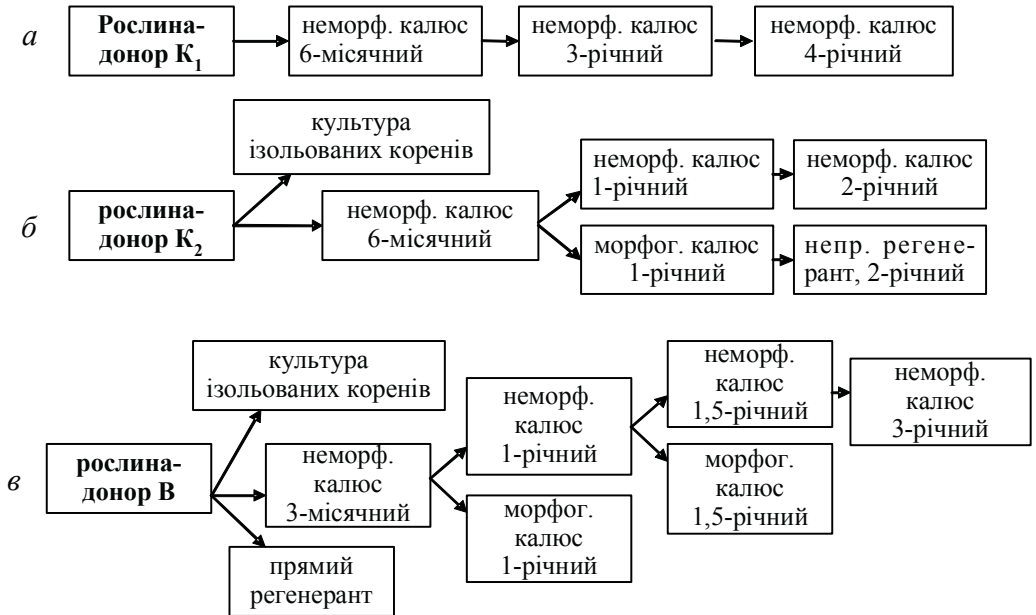


Рис. 1. Схема отримання досліджених зразків культури тканин та органів, а також регенерантів, які використовували у молекулярно-генетичному аналізі: а – від рослини-донора К₁ (корюківська популяція); б – від рослини-донора К₂ (корюківська популяція); в – від рослини-донора В (вигодська популяція)

Таблиця. Нуклеотидні послідовності ISSR-праймерів

| № | Праймер | Нуклеотидна послідовність (5'– 3') |
|----|----------------|--------------------------------------|
| 1 | UBC#807 | 5' AGA GAG AGA GAG AGA GT 3' |
| 2 | UBC#809 | 5' AGA GAG AGA GAG AGA GG 3' |
| 3 | UBC#810 | 5' GAG AGA GAG AGA GAG AT 3' |
| 4 | UBC#811 | 5' GAG AGA GAG AGA GAG AC 3' |
| 5 | UBC#827 | 5' ACA CAC ACA CAC ACA CG 3' |
| 6 | UBC#835 | 5' AGA GAG AGA GAG AGA GYC 3' |
| 7 | UBC#836 | 5' AGA GAG AGA GAG AGA GYA 3' |
| 8 | UBC#840 | 5' GAG AGA GAG AGA GAG AYT 3' |
| 9 | UBC#841 | 5' GAG AGA GAG AGA GAG AYC 3 |
| 10 | UBC#842 | 5' GAG AGA GAG AGA GAG AYG 3' |
| 11 | UBC#857 | 5' ACA CAC ACA CAC ACA CYG 3' |
| 12 | UBC#880 | 5' GGA GAG GAG AGG AGA 3' |
| 13 | UBC#889 | 5' DBD ACA CAC ACA CAC AC 3' |

Пр и м і т ка. Виділені жирним шрифтом три ISSR-праймери не давали чітких спектрів ПЛП-продуктів

повідав такому ж, як і при проведенні RAPD-аналізу [16].

Враховували чітко розрізнявані, відтворювані амплікони. Результати обробки електорофореграм RAPD- та ISSR-продуктів були представлені у вигляді бі-

нарної матриці, у якій наявність чи відсутність однакових за розміром ампліконів позначено відповідно «1» або «0». На основі отриманої матриці за допомогою програми FAMD 1.21 beta розраховано генетичні відстані Жакарда (D_j) [18] та побудо-

вано дендрограму генетичної подібності досліджених зразків *G. pneumonanthe*.

Для позначення амплікона використовували назву праймера, за допомогою якого він був отриманий, і його розмір у парах нуклеотидів (п.н.).

Результати і обговорення

Загальна кількість ампліконів у випадку RAPD-аналізу складала 226 (13,3 на праймер), з яких 77 (34,1 %) виявилися моно-

морфними для усіх об'єктів; для ISSR-аналізу – 136 (13,6 на праймер), з яких 46 (33,09 %) – спільні. RAPD-праймери забезпечували ампліфікацію фрагментів у межах 274 – 2612 п.н., ISSR-праймери – від 295 до 2768 п.н.

Як видно з наведених на рис. 2 типових RAPD- та ISSR-спектрів, різні генотипи *G. pneumonanthe* були подібними між собою за основним набором отриманих ампліконів. Детальний аналіз отриманих елек-

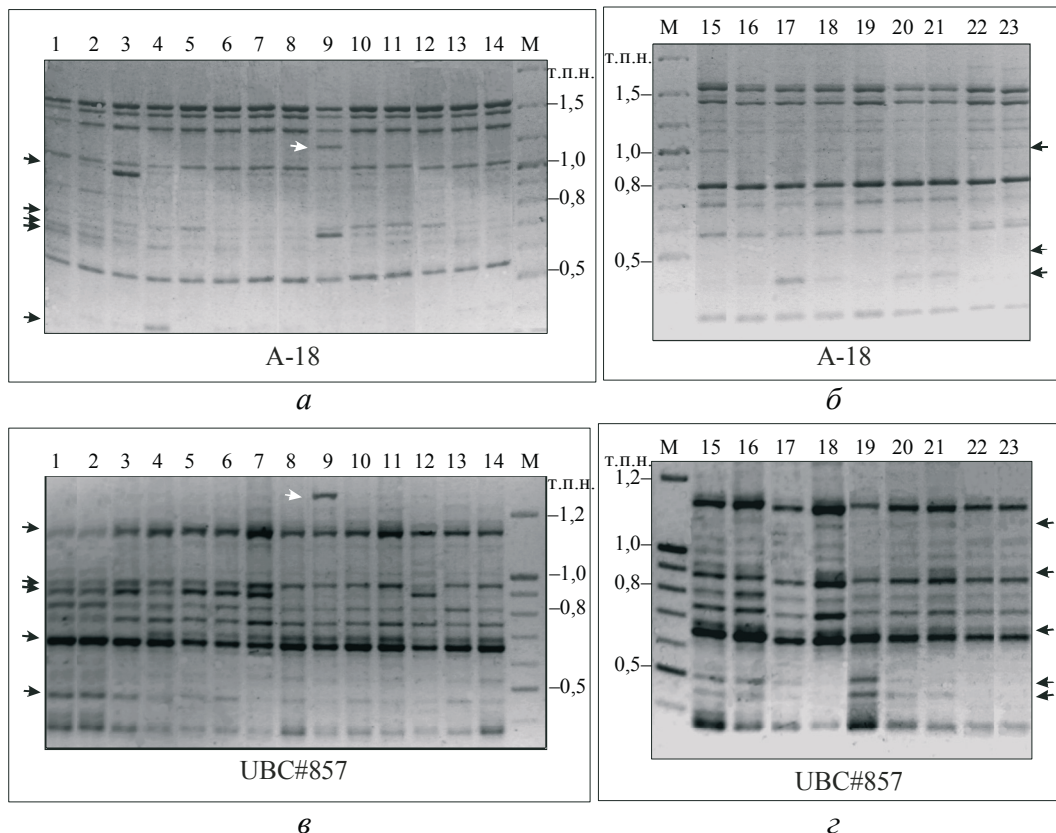


Рис. 2. RAPD-спектри (а, б) та ISSR-спектри (в, г) ДНК досліджених зразків *G. pneumonanthe*: а, в – зразки корюківської популяції: 1–3–рослини з природної популяції; 4– рослина-донор K_1 ; 5, 6, 7 – 6-місячний, 3- та 4-річні неморфогенні калюси відповідно, отримані від K_1 ; 8 – рослина-донор K_2 ; 9 – культура ізольованих коренів від K_2 ; 10, 11, 12 – 6-місячний, 1- та 2-річні неморфогенні калюси відповідно, одержані з K_2 ; 13 – 1-річний морфогенний калюс від K_2 ; 14 – «непрямий» регенерант від генотипу K_2 ; б, г – зразки вигодської популяції: 15 – рослина-донор В, з якої отримано: 16 – «прямий регенерант»; 17 – культуру ізольованих коренів, 18, 19, 20, 21 – неморфогенні калюси 3-місячного, 1-, 1,5- та 3-річного віку відповідно; 22, 23 – 1- та 1,5-річні морфогенні культури. М – маркер молекулярних мас. Стрілками позначені поліморфні амплікони та унікальний фрагмент (стрілки білого кольору). Назви використаних праймерів вказано під електрофореграмами

трофореграм дозволив виявити фрагменти, за якими вдалося відокремити не лише зразки з двох локалітетів, але й різні генотипи в межах однієї популяції. Загалом, профілі регенерантів і культивованих тканин та органів були подібними до таких рослин-донорів. Проте, як видно із поданих спектрів, у досліджених зразках наявні амплікони (позначені на рис. стрілками), що за розміром відрізнялися від фрагментів вихідної рослини. Деякі з цих ампліконів були унікальними. Наприклад, у випадку культури ізольованих коренів, отриманої від генотипу K_2 , виявлено фрагменти A18–1176 та UBC#857–1271, яких немає ні у рослини-донора, ні в калюсних культур і регенерантів (рис. 2, а, в).

За результатами RAPD- та ISSR-аналізу на основі генетичних відстаней методом UPGMA побудовано дендрограму генетичних подібностей досліджених зразків *G. pneumonanthe* (рис. 3). Розподіл

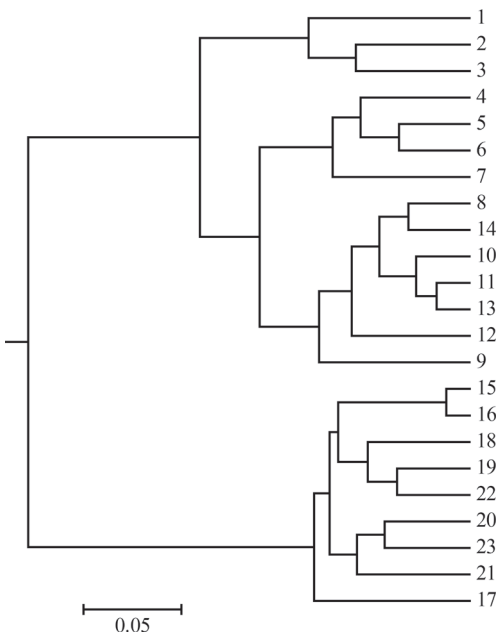


Рис. 3. Дендрограма генетичної подібності зразків *G. pneumonanthe*, побудована за відстанями Жакарда на основі результатів RAPD- та ISSR-аналізу. Розшифрування номерів зразків таке ж, як на рис. 2

зразків на дендрограмі відповідав їхній популяційній та генотиповій приналежності.

Як видно з наведеної дендрограми (рис. 3), об'єкти згрупувалися у 2 кластери відповідно до місць зростання рослин. У межах першого кластера, утвореного зразками з Корюківського лісництва, можна виділити 2 субкластери. До першого входили дикорослі рослини, які на дендрограмах за двома типами маркерів об'єднувалися в один субкластер. Середнє значення генетичних відстаней між трьома дикорослими рослинами становило: за результатами RAPD-аналізу – 0,190, ISSR-аналізу – 0,084. Другий субкластер поділявся на дві групи відповідно до вихідних генотипів (K_1 і K_2). У першу групу об'єднувалися рослина-донор (K_1) та отримані від неї неморфогенні калюси різної тривалості культивування. Найближчим до вихідної рослини був 6-місячний калюс. Генетичні відстані (D_j) між цими зразками за результатами RAPD- та ISSR-аналізу становили 0,134 та 0,046 відповідно. Тривало культивовані калюси (4-річний) був генетично віддаленим як від рослини-донора ($D_j=0,196$ за RAPD- та 0,119 за ISSR-аналізом), так і від калюсів раніших пасажів ($D_j=0,166$ і 0,124 за RAPD- та 0,058 і 0,093 за ISSR-ПЛР).

У другій групі зразків до рослини-донора K_2 генетично найближчим був регенерант, отриманий шляхом непрямого органогенезу із 1-річної морфогенної культури тканин ($D_j=0,072$ і 0,050 за RAPD- та ISSR-аналізом відповідно). Проте значення генетичних відстаней між ним і 2-річним неморфогенним калюсом, якому за віком відповідає цей регенерант, порівняно великі: 0,148 (RAPD-ПЛР) та 0,104 (ISSR-ПЛР). Серед калюсних культур найменші генетичні відстані були між 1-річними неморфогенним і морфогенним калюсами і становили за RAPD-аналізом – 0,030, за ISSR-ПЛР – 0,039. Із зростанням тривалості вирощування неморфогенного калю-

су від півроку до 2 років генетична відстань між ним і рослиною-донором поступово зростала до 0,184 за RAPD- та до 0,123 за ISSR-аналізом. Генетично найвіддаленішою від інших зразків була культура ізольованих коренів ($D_J=0,142-0,185$ за RAPD-ПЛР; $0,089-0,152$ за ISSR-ПЛР).

Другий кластер сформований зразками з вигодської популяції: рослиною-донором, регенерантом і культурами тканин та органів (генотип В). До рослини-донора найбільш генетично подібним був регенерант, отриманий з її стеблових експлантів шляхом прямого органогенезу ($D_J=0,020$ та $0,029$ за RAPD- та ISSR-аналізом відповідно). Морфогенні та неморфогенні калюси об'єдналися у групи відповідно до тривалості культивування. Як і в випадку генотипу K_2 , культура ізольованих коренів генотипу В є генетично найвіддаленішою як від рослини-донора, так і від культури тканин і рослини-регенеранта ($D_J=0,113-0,205$ за RAPD-ПЛР; $0,136-0,212$ за ISSR-ПЛР).

У загальній вибірці зразків (генотипи K_1 , K_2 , В) найподібнішими були RAPD- та ISSR-спектри рослини-донора генотипу В та отриманого від неї шляхом прямого органогенезу регенеранта. Культура ізольованих коренів в обох випадках була генетично найвіддаленішою як від рослини-донора, так і від усіх інших культур цього ж генотипу.

На основі аналізу генетичних дистанцій між зразками у групах «рослина-донор – культури *in vitro* і регенеранти» та їхнього розташування на дендрограмі, нами встановлено певні закономірності геномної мінливості *G. pneumonanthe*: 1) залежність від тривалості культивування; 2) залежність від типу росту культури; 3) залежність від способу регенерації.

Залежність від тривалості культивування полягала у тому, що генетичні зміни у калюсних тканинах виникали на ранніх етапах культивування і накопичувалися із

збільшенням його тривалості. Зокрема, при порівнянні рослин-донорів K_1 , K_2 і В та отриманих від них калюсів різного віку виявлено, що вже на ранніх етапах (до 6 місяців) у культурах відбуваються порівняно значні зміни, про що свідчать генетичні відстані за результатами обох аналізів. Із збільшенням тривалості культивування до 1–1,5 та 2–4 років зміни накопичувалися, але меншими темпами. На дендрограмі калюси на триваліших пасажах формують у межах кластерів окремі групи, що свідчить про їхню генетичну спорідненість між собою та віддаленість від інших зразків (рис. 3). У цілому, отримані нами результати узгоджуються із наявними літературними даними, за якими більшість перебудов геному відбуваються у процесі дедиференціації та на ранніх етапах культивування під час формування клітинних популяцій [1–3, 19, 20]. Збільшення кількості пасажів та їхньої тривалості підвищує швидкість виникнення та рівень соматональних змін у клітинних суспензіях та калюсних культурах [5]. За іншими даними, рівень змін у культурі тканин на ранніх етапах є невисоким і зростає із збільшенням тривалості вирощування. Наприклад, за допомогою RAPD- та ISSR-ПЛР показано, що тривале культивування *in vitro* *Ungernia victoris* призводить до збільшення генетичних відстаней між рослиною-донором та калюсними тканинами, а також дивергенції останніх між собою [4, 19].

Залежність від типу росту культури – генетична відстань між морфогенними і неморфогенними калюсами одного генотипу і віку є невеликою, на дендрограмі вони формували одну групу зразків, тоді як культури ізольованих коренів є генетично віддаленими як від рослини-донора, так і від культури тканин та рослин-регенерантів цього ж генотипу. Нами показано невеликі генетичні дистанції між морфогенними і неморфогенними культурами тканин від однієї рослини-донора (генотип K_2 і В) за

однакової тривалості вирощування, але у різних умовах.

У той же час, зміни, що відбуваються в швидкоростущій культурі ізольованих коренів за 4–6 тижнів вирощування, за своїм розмахом співрозмірні зі змінами у дво-три-річних неморфогенних калюсах. Відомо, що для ефективного культивування ізольованих коренів визначальним чинником є наявність у живильному середовищі ауксинів (зокрема НОК), які стимулюють швидке наростання бічних корінців та збільшення біомаси. Поряд із цим, є дані, що швидкий ріст тканин може впливати на генетичну стабільність культур і призводити до соматональної мінливості [5]. Можна припустити, що у випадку культури ізольованих коренів *G. pneumonanthe* інтенсивний темп поділу її клітин, спричинений використанням як вихідних експлантів апікальних відрізків коренів і живильного середовища з порівняно високим вмістом фітогормонів (у першу чергу ауксину), а також швидка зміна умов вирощування, у комплексі, могли спричинити значні варіації геному.

Залежність від способу регенерації. Генетичні зміни, виявлені у «прямої» і «непрямої» регенерантах за своїм рівнем були незначними. Незалежно від способу регенерації рослина-донор та регенерант формували на дендрограмі одну групу. При цьому генетична дистанція від вихідного генотипу до «прямої» регенеранта була у 3,6 та 1,7 меншою (за RAPD- та ISSR-аналізом відповідно) порівняно з «непрямої» регенерантом.

Відомо, що для рослин-регенерантів, отриманих шляхом прямого органогенезу, властива менша генетична варіабельність, ніж для рослин, одержаних через культуру тканин [2]. Зокрема, RAPD- та ISSR-аналіз отриманих *in vitro* клонів *Gerbera jamesonii* Bolus [21], *Swertia chirayita* [8], *Allium ampeloprasum* L. [22] показав ідентичність профілів «прямих» регенерантів до мате-

ринської рослини. Інколи у результаті молекулярно-біологічних досліджень одержаних мікроклонів соматональні зміни все ж таки вдається виявити. Так, наприклад, генетична спорідненість «прямих» регенерантів із рослинами-донорами *Lilium tsingtauense* становила за результатами RAPD- та ISSR-ПЛР 70,8 % і 73,7 % відповідно [23]. За допомогою RAPD-аналізу відмінності знайдено у семи (32 %) із 22 досліджених регенерантів *U. victoris* [24].

Згідно більшості літературних даних, рівень геномної мінливості регенерантів, отриманих шляхом непрямого органогенезу, є значно вищим [3, 11]. Основною причиною зростання рівня соматональної мінливості при непрямій регенерації вважають підвищення генетичної гетерогенності культивованих клітин, пов'язане з накопиченням у них геномних змін внаслідок тривалого культивування *in vitro* [2, 24]. Поряд із цим, існує припущення, що зміни у регенерантах стосуються в основному некодуючих послідовностей ДНК, оскільки клітини із значними генетичними порушеннями в кодуючій ділянці втрачають здатність до регенерації. Типові для вихідного генотипу клітини мають перевагу при регенерації, а для більшості крайніх варіантів цей процес неможливий. Тому тільки частина генетичних змін, присутніх у калюсних тканинах, реалізується у рослинах-регенерантах [1–3]. Отримані нами результати підтверджують таке припущення – значення генетичної відстані від «непрямої» регенеранта (генотип K_2) до однорічної морфогенної культури, з якої він отриманий, було дещо більшим, порівняно із відстанню до рослини-донора.

Аналіз отриманих результатів показав, що зміни у культурі *in vitro* не виходили за межі внутрішньовидового поліморфізму, визначеного на основі порівняння шести генотипів рослин *G. pneumonanthe* з двох географічно віддалених популяцій. Окрім

того, соматоклональна мінливість культур генотипів K_1 і K_2 була у 1,5–2 рази меншою за внутрішньопопуляційну варіабельність, встановлену для зразків з Корюківського лісництва. Подібні дані отримані для *Iris pseudacorus* L. – генетичні дистанції між рослиною-донором та регенерантами, отриманими шляхом непрямого органогенезу, були в 1,5 рази меншими за рівень внутрішньовидових відмінностей [25]. Рівень соматоклональної мінливості (за результатами RAPD-аналізу) в культурі тканин трьох інших видів тирличів – *G. acaulis*, *G. cruciata* і *G. punctata*, був подібним до генетичних дистанцій між рослинами цих видів всередині популяцій [12].

Висновки

За допомогою RAPD- та ISSR-аналізу досліджено геномну варіабельність культури тканин і органів, а також рослин-регенерантів *G. pneumonanthe*. Виявлено залежність соматоклональної мінливості від тривалості культивування, типу росту культури, способу регенерації. Показано, що рівень геномної варіабельності в культурі *in vitro* не виходив за межі внутрішньопопуляційного поліморфізму. Найвищий рівень соматоклональної мінливості встановлено для тривало культивованих неморфогенних калюсів та швидкоростучої культури ізольованих коренів. Суттєвих змін геному у процесі як прямої, так і непрямої регенерації *G. pneumonanthe* не виявлено. Низький рівень мінливості дає підстави для використання отриманих культур *in vitro* з метою збереження генофонду цього виду.

Перелік літератури

1. Кунах В. А. Механізми та деякі закономірності соматоклональної мінливості рослин // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2003. – № 1. – С. 101–106.
2. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 724 с.

3. Кузнецова О.И., Аш О.А., Хартина Г.А., Гостимский С.А. Исследование растений-регенерантов гороха (*Pisum sativum* L.) с помощью молекулярных RAPD- и ISSR-маркеров // Генетика. – 2005. – Т.41, №1. – С. 71–77.
4. Бублик О.М., Андреев І.О., Спірідонова К.В., Кунах В.А. Мінливість міжмікросателітних ділянок геному (ISSR) у культурі тканин *Ungernia victoris* // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. К.: Логос, 2010. – Т. 9. – С. 8–12.
5. Bairu M. W., Aremu A. O., Staden J. V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods // Plant Growth Regul. – 2011. – Vol. 63. – P. 147–173.
6. Orbović V., Čalović M., Vilorija Z., Nielsen B., Gmitter Jr. F. G., Castle W. S., Grosser J. W. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry // Euphytica – 2008. – Vol. 161. – P. 329–335.
7. Verma N., Koche V., Tiwari K. L., Mishra S. K. Random amplified polymorphic DNA analysis detects variation in a micropropagated clone of *Trichodesma indicum* (L.) R. Br. // African Journal of Biotechnology. – 2010. – Vol. 9, №28. – P. 4322–4325.
8. Joshi P., Dhawan V. Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita* plantlets by ISSR marker assay // Biol. plantarum. – 2007. – Vol. 51, №1. – P. 22–26.
9. Ray T., Dutta I., Saha P., Das S., Roy S.C. Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers // Plant Cell, Tissue and Organ Culture – 2006. – Vol. 85. – P. 11–21.
10. Hu J., Gao X., Liu J., Xie C., Li J. Plant regeneration from petiole callus of *Amorphophallus albus* and analysis of somaclonal variation of regenerated plants by RAPD and ISSR markers // Botanical Studies – 2008. – Vol. 49. – P. 189–197.
11. Guo W. L., Gong L., Ding Z. F. et al. Genomic instability in phenotypically normal regenerants of medicinal plant *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f., as revealed by ISSR and RAPD markers // Plant Cell Rep. – 2006. – Vol. 25. – P. 896–906.
12. Твардовська М.О., Дробик Н.М., Мельник В.М., Конвалюк І.І., Кунах В.А. Геномна мінливість деяких видів роду *Gentiana* L. у природі та в культурі *in vitro*: RAPD-аналіз // Biopolym.Cell. – 2010. – Vol. 26, №6. – P. 499–507.
13. Страшний Н.М., Твардовська М.О., Мельник В.М. Введення в культуру *in vitro* видів тирличу хрещатого (*Gentiana cruciata* L.) та тирличу звичайного (*Gentiana pneumonanthe* L.) // Наук. зап. Терноп.

- нац. пед. ун-ту. Сер. Біол. – 2006. – №3–4 (26). – С. 100–107.
14. Страшнюк Н.М., Кравець Н.Б., Конвалюк І.І., Мельник В.М. Органогенез у культурі тканин видів роду Тирлич (*Gentiana L.*) // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. К.: Логос, 2009. – Т.7. – С. 184–189.
15. Страшнюк Н.М., Грицак Л.Р., Мельник В.М., Твардовська М.О., Конвалюк І.І., Кунах В.А. Спосіб отримання нетрансгенної культури ізольованих коренів тирличів (*Gentiana L.*) // Патент України на корисну модель №36436 від 27. 10.2008, Бюл. №20.
16. Твардовська М.О., Страшнюк Н.М., Мельник В.М., Конвалюк І.І., Кунах В.А. RAPD-аналіз геномного поліморфізму деяких видів роду *Gentiana L.* флори України // Доповіді Національної академії наук України. – 2009. – №5. – С. 200–204.
17. Zhang X.-L., Yuan Y.-M., Ge X.-J. Genetic structure and differentiation of *Gentiana atuntsiensis* W. Smith and *G. striolata* T. N. Ho (*Gentianaceae*) as revealed by ISSR markers // Botanical Journal of the Linnean Society. – 2007 – Vol. 154 – P. 225–232.
18. Schluter P. M., Harris S. A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data // Molecular Ecology Notes. – 2006. – Vol. 6. – P. 569–572.
19. Бублик О.М., Андреев І.О., Спіридонова К.В., 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.
20. Андреев І.О., Спіридонова Е.В., Майданюк Д.Н., Кунах В.А. Генетические эффекты культивирования *in vitro* тканей кукурузы // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41, № 6. – С. 487–495.
21. Bhatia R., Singh K. P., Sharma T. R., Tripta Jhang Evaluation of the genetic fidelity of *in vitro*-propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2011. – Vol. 104. – P. 131–135.
22. Gantait S., Mandal N., Bhattacharyya S., Das P.K. Determination of genetic integrity in long-term micropropagated plantlets of *Allium ampeloprasum* L. using ISSR markers // Biotechnology. – 2010. – Vol. 9, № 2. – P. 218–223.
23. Yang W.R., Zhang Q.-X., Pan H.-T., Sun M. *In vitro* regeneration of *Lilium tsingtauense* Gilg. and analysis of genetic variability in micropropagated plants using RAPD and ISSR techniques // Propagation of Ornamental Plants. – 2010. – Vol.10, № 2. – P. 59–66.
24. Бублик О.М., Андреев І.О., Спіридонова К.В., Кунах В.А. Молекулярно-генетичний аналіз рослин-регенерантів *Ungernia victoris* // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. К.: Логос, 2009. – Т. 7. – С. 208–212.
25. Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Болтенков Е.В., Лауве Л.С. Сомаклональная изменчивость *Iris pseudacorus* L. по данным RAPD- и цитогенетического анализа // Биотехнология. – 2004. – № 2. – С. 13–23.

Представлено М.В. Кучуком
Надійшла 28.03.2011

RAPD- И ISSR-АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ ГОРЕЧАВКИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*GENTIANA PNEUMONANTHE L.*)

И.И. Конвалюк¹, В.Н. Мельник¹, Н.М. Дробык², Н.Б. Кравец², М.О. Твардовская¹, В.А. Кунах¹

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Украина, 03680, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150
e-mail: kunakh@imbg.org.ua
²Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка
Украина, 46027, г. Тернополь, ул. М. Кривоноса, 2
e-mail: drobyk.n@gmail.com

Исследована соматоклональная изменчивость в культуре тканей и органов *G. pneumonanthe* с использованием RAPD- и ISSR-маркеров. Обнаружено влияние продолжительности культивирования, типа роста и способа регенерации на изменчивость в культуре *in vitro*. Установлено, что соматоклональная вариабельность была значительно меньшей по сравнению с внутривидовым полиморфизмом в природе. Уровень генетических изменений был наименьшим в регенерантах, и наибольшим – в длительно культивированных каллусных тканях и быстрорастущей культуре изолированных корней. Полученные результаты свидетельствуют об относительной генетической стабильности генома этого вида при выращивании *in vitro*.

Ключевые слова: *Gentiana pneumonanthe* L., культура тканей и органов, растения-регенеранты, соматоклональная изменчивость, RAPD- и ISSR-ПЦР, генетическое состояние.

RAPD- AND ISSR-ANALYSIS OF GENETIC VARIATION IN *GENTIANA PNEUMONANTHE* L. TISSUE AND ORGAN CULTURE

*I.I. Konvalyuk*¹, *V.M. Mel'nyk*¹, *N.M. Drobyk*²,
*N.B. Kravets*², *M.O. Twardovska*¹, *V.A. Kunakh*¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine

Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnyi str., 150

e-mail: kunakh@imbg.org.ua

² Ternopil National Volodymyr Hnatiuk Pedagogical University

Ukraine, 46027, Ternopil', M. Kryvonis str.,2

e-mail: drobyk.n@gmail.com

Somaclonal variation in *G. pneumonanthe* tissue and organ culture has been studied using RAPD- and ISSR-markers. Duration

of cultivation, growth habit and the way of regeneration were found to affect variability in culture *in vitro*. Somaclonal variation appeared to be considerably lesser as compared with intrapopulation polymorphism in nature. The lowest level of genetic changes showed the regenerants while long-term cultured calli and rapidly growing cultures of isolated roots exhibited the highest rate. The results obtained suggest the relative genome genetic stability of the species involved upon its maintenance *in vitro*.

Key words: *Gentiana pneumonanthe* L., tissue and organ culture, regenerants, somaclonal variation, RAPD- and ISSR-PCR, genetic distances.