

Отработка системы клеточной селекции для индукции соматических мутаций и формирования соматоклональных вариантов при различном спектральном составе света светодиодных источников

Т.В. Никонович¹, А.В. Константинов², М.Я. Острикова²,
И.Е. Баева¹, Т.В. Кардус¹

¹Белорусская государственная сельскохозяйственная академия

²Институт леса НАН Беларуси

e-mail: tvnikonovich@gmail.com

The objective of this study was to establish the physical conditions of cultivation, for their further use as selective, affecting the stability of the hereditary apparatus of lilac regenerant plants in vitro.

Variants of the spectral composition of light from LED sources with a photon emission efficiency of 1.85-2.03 $\mu\text{mol} / \text{s}\cdot\text{W}$ are determined as promising for the development of a system of cell selection of regenerants, induction of somatic mutations and obtaining genetic diversity of cultivated material on their basis.

Культура клеток высших растений является уникальной биологической системой и может рассматриваться в качестве инструмента для физиолого-биохимических, генетических и биотехнологических исследований. Популяции растительных клеток, в регулируемых условиях, характеризуются рядом специфических особенностей, за счет которых изолированные клеточные культуры представляют собой удобную экспериментальную модель. Отличия культивируемых клеток от клеток организма часто специально усиливают путем воздействия на них биохимических и физических мутагенов, включая светодиодное освещение различной интенсивности и спектрального состава.

Клеточная и тканевая селекция регенерантов *in vitro*, полученных способом непрямого морфогенеза за счет процессов индуцированного мутагенеза и соматоклональной изменчивости позволяет расширять спектр генетического разнообразия исходного материала без внедрения чужеродных генов.

Задачей настоящего исследования являлось установление физических условий культивирования, для дальнейшего использования их в качестве селективных, влияющих на стабильность наследственного аппарата растений-регенерантов сирени *in vitro*.

В качестве экспериментального использовали материал *in vitro* трех сортов сирени *Buffon*, *Franc Paterson* и *Лунный свет* культивируемых при светодиодном освещении различного спектрального состава. Всего 14 источников искусственного света *LED*, отличающихся спектральным соотношением R/B («красный/синий») от 0,8 до 20,7. Варианты освещения обозначались порядковыми номерами, присвоенными им согласно общей нумерации, используемой в биотехнологической лаборатории. Экстракцию тотальной ДНК из растительных тканей осуществляли с использованием модифицированного СТАВ-метода. Для определения генетических особенностей регенерантов в вариантах опыта был проведен

ПЦР-анализ с применением произвольно амплифицируемых праймеров с последующей визуализацией продуктов электрофореза и построением мультилокусных генетических паспортов.

Разработка систем регенерации с точки зрения фитобиотехнологии требует учета большого разнообразия факторов, воздействующих на клеточные популяции (каллусные культуры) или соматические клетки интенсивно делящихся тканей (существующие меристемы эксплантов).

Следует отметить, что микроклональное размножение в условиях *in vitro* линий, характеризующихся повышенным уровнем соматической изменчивости, позволяет отбирать варианты, характеризующиеся набором параметров, существенно варьирующих в пределах нормы реакции или обусловленных значительными перестройками на уровне наследственного аппарата, а значит закрепленными генетически.

Не смотря на вероятное отсутствие прямой корреляции между выявляемыми в результате проведенного *RAPD*-анализа точечными мутациями и физиолого-биохимическими особенностями регенерантов сирени, полученные сведения иллюстрируют общий уровень изменчивости, индуцируемый воздействием физических условий культивирования (в нашем случае параметров светодиодного освещения) на растительный материал *in vitro*. Использование кластерного анализа применительно к полученным молекулярно-генетическим данным и построение древовидной диаграммы, позволило получить обобщенную интегральную картину аллельных вариантов с набором уровней, соответствующих шагу последовательного укрупнения кластеров, объединяющих сходные по генетическим параметрам регенерантов, полученных в результате культивирования в различных условиях *in vitro*.

Анализ набора амплифицируемых локусов сортов сирени и иерархическая кластеризация результатов позволила объединить варианты освещения в три группы: первая – 18, 19, 20, а также близкий к ним 17 и две сходные группы 4, 5, 21, 22 и 8, 16. Дистанция между указанными группами составила около 15–25 %. Наибольшая изменчивость характерна для образцов, выращенных при вариантах освещения 12 (30 % отличие), близкие по изменчивости образцы при вариантах 13 и 14, отличающиеся от основной группы на 32 % и при варианте 11 с максимальной степенью изменчивости составляющей 40 %.

Таким образом, в ходе анализа *RAPD*-спектров были составлены генетические паспорта исследованных микроклональных растений трех сортов сирени *in vitro* и проведен кластерный анализ результатов.

Варианты спектрального состава света светодиодных источников с эффективность излучения фотонов 1,85–2,03 мкмоль/с·Вт определены в качестве перспективных для разработки на их основе системы клеточной селекции регенерантов, индукции соматических мутаций и получения генетического разнообразия культивируемого материала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского Республиканского фонда фундаментальных исследований, договор № Б19-112.