

УДК: 581.143.6:58.085

А. В. БАВОЛ, М. О. ЗІНЧЕНКО, О. В. ДУБРОВНА

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська 31/17, e-mail: bavoll@rambler.ru

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ, СТІЙКИХ ДО МЕТАБОЛІТІВ ЗБУДНИКА ОФІОБОЛЬОЗУ, ЗА ДІЇ ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ

Проведено молекулярно-генетичний аналіз калюсних ліній м'якої пшениці, стійких до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі (*G. graminis* var. *tritici*) за дії осмотичного стресу та індукованих з них рослин-регенерантів за використання IRAP-методу. Оцінено рівень поліморфізму ДНК клітинних ліній та рослин і виявлені їх відмінності від вихідних форм за генетичною структурою. За культивування *in vitro* в спектрах продуктів ампліфікації ДНК калюсів та регенерантів відмічено появу аплікона довжиною близько 638 п.н., який був відсутній у вихідних форм. Виявлено, що залежно від використаної схеми клітинної селекції (пряма або ступінчаста) можуть виявлятися різні зміни геному.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., клітинна селекція, офіобольоз, осмотичний стрес, поліморфізм ДНК

Вступ. Вивчення соматоклональної мінливості становить інтерес, як для фундаментальних досліджень, так і практичної селекції, оскільки соматоклони можуть бути джерелом отримання генетичного різноманіття. Одним із найважливіших напрямів сучасної біотехнології, який вже отримав широке практичне застосування, є клітинна селекція, як метод створення нових форм рослин шляхом виділення мутантних клітин і соматоклональних варіацій у селективних умовах. Для підвищення ефективності селекції *in vitro* та вирішення проблеми управління соматоклональною варіабельністю, важливо

зрозуміти причини її виникнення і розмах. Для цього все ширше використовуються молекулярно-генетичні маркери, що дозволяють виявити генетичні зміни у клітинних форм та індукованих з них рослин. В останні роки ДНК-маркери широко використовуються для вивчення соматональних варіантів рослин, отриманих біотехнологічним шляхом [1-4].

Одним з найбільш доступних і швидких способів виявити варіабельність, а потім з'ясувати природу соматональної мінливості є застосування молекулярних маркерів, заснованих на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) і створення з їх допомогою маркерів ДНК, які відрізняють соматоклони від вихідного генотипу [5].

Значна частина геному рослин представлена повторюваними послідовностями, до яких відносяться мікросателіти і мобільні генетичні елементи, зокрема ретротранспозони. В деяких випадках на ретротранспозони може припадати більше 70% ядерного геному [6]. Накопичені дані про мобільні генетичні елементи в геномах рослин дозволили розробити способи оцінки поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими повторами, зокрема, термінальних ділянок ретротранспозонів [7,8]. Послідовності LTR-ретротранспозонів використовуються для виявлення поліморфізму між досліджуваними формами за допомогою ПЛР-фінгерпрінту IRAP і REMAP методами [9-12]. Показана ефективність їх застосування і в культурі *in vitro* [13-16].

IRAP-аналіз (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) – метод ампліфікації геномної ДНК між близько розташованими послідовностями ретротранспозонів. Однією з переваг цього методу є можливість одночасного аналізу багатьох локусів в різних ділянках геному, що особливо важливо при культивуванні *in vitro*. Поліморфізм в цьому випадку обумовлюється або мутацією в ділянці зв'язування праймера або безпосередньо транспозицією через вбудовування ретротранспозонів в іншу ділянку ДНК.

Нами вперше методом клітинної селекції одержано калюсні лінії пшениці з перехресною стійкістю до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі та водного дефіциту [17]. З даних ліній індуковані рослини-регенеранти. У процесі добору стійких форм за клітинної селекції може виникати генетична мінливість, пов'язана як з умовами культивування, так і дією стресового чинника [13]. У зв'язку з цим, метою роботи було проаналізувати рівень поліморфізму ДНК стійких до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі (*G. graminis* var. *tritici*) за дії осмотичного стресу та індукованих із стійких форм рослин-регенерантів за використання IRAP-методу.

Матеріали і методи.

Матеріал досліджень. У даній роботі вивчались: 1) рослини R₂ соматоклональних ліній, стійких до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі (10 індивідуальних рослин: P1 - P10) – вихідний матеріал; 2) первинний калюс, отриманий з рослин R₂ соматоклональних ліній (10 зразків); 3) калюси, отримані на ранніх (1 пасаж) та пізніх етапах (6 пасаж) ступінчастої клітинної селекції (10 зразків); 4) калюси 1-4 пасажів прямої клітинної селекції (10 зразків); 5) калюси, що культивувалися протягом такого ж періоду як і стійкі клітинні лінії, однак не зазнавали дії селективного чинника (10 зразків: C1-C10); 6) рослини-регенеранти, індуковані із стійких калюсів R₀ (5 зразків: R1-R5)

Культивування калюсів. Індукцію калюсогенезу та культивування калюсів проводили по розробленій нами методиці [18]. Як експлант використовували верхівку пагона 3-добового проростка. Вихідний калюс розділяли на 2 частини. Одна частина була використана для проведення клітинної селекції, інша - пасажувалася на культуральному середовищі без селективного чинника (контроль).

Клітинна селекція. Як вихідний матеріал для отримання ліній з комплексною стійкістю використовували отримані нами калюсні лінії, стійкі до метаболітів *G. graminis* var. *tritici* [19]. Для моделювання водного

дефіциту, як селективний агент застосовували маніт у різних концентраціях, який додавали до модифікованого середовища МС. Умови проведення експериментів та схеми прямої та ступінчастої клітинної селекції наведено у роботі [17].

Виділення ДНК. Екстракцію ДНК проводили за допомогою СТАВ-методу [20] із проростків, листків рослин-регенерантів або безпосередньо калюсної тканини. Концентрацію та чистоту ДНК визначали спектрофотометрично.

Ампліфікація ДНК. Ампліфікацію проводили на приладі «Герцик» фірми «ДНК-Технологія». Кінцевий об'єм реакційної суміші складав 25 мкл: 10mM TRIS-HCl, 50 mM KCl, 1,5 - 2,0 mM хлориду магнію, 2 mM кожного дезоксинуклеотидтрифосфату (dNTP), 0,2 мкл праймера, 1 од. акт. Таq ДНК полімерази та 100-120 нг досліджуваної ДНК. Для уникнення випаровування до реакційної суміші додавали по 20 мкл мінеральної олії. Ампліфікація проводилась за наступною програмою: початкова денатурація 95°C – 5 хв; тридцять сім циклів 1. 95°C – 30 сек; 2. 55°C – 1 хв; 3. 72°C – 2 хв. 30 сек; кінцева елонгація 72°C – 7 хв. В дослідженнях застосовували IRAP-праймери [21, 22], що розроблялись на основі загальнодоступних даних (повний сиквенс первинної структури ретротранспозону Cassandra в базі даних NCBI) [23], та показали свою ефективність при аналізі сільськогосподарських культур. Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу в 2% агарозному гелі з додаванням бромистого етидію. Розділення проводилось при напруженості 2 в/см в трис-ацетатному буфері. Електрофоретичні спектри візуалізували під УФ променями. Для оцінки розмірів продуктів ампліфікації на кожному блоці використовували маркер Step Ladder DNA S7025 (SIGMA).

Кількісна та якісна оцінка результатів. Точний розмір продуктів ПЛР визначали за допомогою пакету прикладних програм TotalLab v.2.01 (Nonlinear Dynamics). Для кількісної оцінки отриманих результатів дані були представлені у вигляді бінарних матриць в яких наявність/відсутність в

IRAP-спектрах однакових за розміром ампліконів відповідало значенням 1 або 0. Генетичні відстані вираховували користуючись мірою подібності згідно Nei та Li [24]. Побудову дендрограм здійснювали методом попарного незваженого кластерування з арифметичним усередненням (UPGMA), використовуючи пакети прикладних програм POPGEN v.1.31 [25] та MEGA v.3.1 [26]. Перевірку стабільності прояву ампліконів, здійснювали шляхом трикратного повторення ампліфікації з одним і тим самим праймером на тому ж рослинному матеріалі.

Результати досліджень та їх обговорення.

На першому етапі дослідження важливо було переконатися у генетичній гомогенності контрольних рослин. Для цього аналізували зразки ДНК 10 довільних рослин R₂ соматоклональних ліній, стійких до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі. В цілому було виявлено 11 ампліконів у кожному з проаналізованих зразків (рис. 1, доріжка 2; рис. 2, доріжка 2). Крім того, аналогічні спектри продуктів ампліфікації спостерігалися у первинних калюсах (0-го пасажу). Отримані дані свідчать, що у вихідного матеріалу відсутній природний та/або спонтанний поліморфізм у окремих рослин та первинного калюсу, оскільки у всіх досліджуваних зразків виявлялись ідентичні спектри продуктів ампліфікації. Таким чином у вихідних рослин та первинного калюсу сумарний спектр продуктів ампліфікації (ампліконів) ділянок ДНК, фланкованих інвертованими повторами праймерів, складався з 11 подібних фрагментів ДНК розміром від 154 до 581 п.н.

Наступним етапом досліджень було виявлення поліморфізму ДНК за ступінчастої клітинної селекції. Для цього відбирали зразки калюсів на ранніх та пізніх етапах ступінчастого добору. Контролем слугував первинний калюс (0 пасаж) та калюс 6-го пасажу, що паралельно культивувався на середовищі без селективного чинника.

Отримані результати (рис. 1) свідчать, що за ступінчастої селекції в спектрах продуктів ампліфікації ДНК калюсів спостерігається втрата

окремих ампліконів. Зокрема, на середовищі з 0,4 М маніту у однієї з ліній (№ 2) відмічено відсутність амплікона довжиною близько 581 п.н. На більш пізніх етапах клітинної селекції (на середовищі з 0,8 М маніту) відмічено ще більші зміни. Так у лінії № 4 відмічено втрату ампліконів довжиною близько 154, 334, 347 та 362 п.н. (рис. 1., доріжка 6) Відсутність певних ампліконів була відмічена і у рослин-регенерантів. Так, виявлено рослину-регенерант, у якої також були відсутні амплікони розміром приблизно 334 та 347 п.н. (рис. 1., доріжка 1). Крім того, за ступінчастої селекції у всіх досліджуваних зразків, а також у контрольних калюсів 6-го пасажу та отриманих рослин-регенерантів відмічено появу нового, відносно високомолекулярного, амплікона розміром 638 п.н.

Оскільки відносно тривала (поступова) адаптації до стресового чинника (ступінчаста клітинна селекція) та відносно швидкий екстремальний вплив стресового чинника (пряма клітинна селекція) можуть задіяти різні механізми формування адаптації, то очевидно при таких підходах можуть відбуватися неоднакові зміни в геномі. В зв'язку з цим, наступним етапом досліджень було виявлення поліморфізму ДНК за прямої клітинної селекції. Для цього аналізували зразки ДНК калюсів на ранніх (1 пасаж) та пізніх (4 пасаж) етапах прямого добору. Показано, що при такому підході у спектрах продуктів ампліфікації (рис. 2), можуть відбуватися як втрати ампліконів, зокрема довжиною близько 221, 552 та 571 п.н., так і поява нового унікального амплікону розміром близько 455 п.н. Слід відмітити, що даний амплікон виявлено тільки у калюсних лініях, отриманих при застосуванні прямої клітинної селекції. Також, за прямої клітинної селекції у всіх досліджуваних зразків виявлено появу нового, відносно високомолекулярного, амплікона розміром 638 п.н.

Таким чином, крім специфічних змін у спектрах продуктів ампліфікації ДНК, які відбуваються за прямої та ступінчастої клітинної селекції, звертає на себе увагу той факт, що при культивуванні *in vitro* (як в дослідних зразках на селективних середовищах, так і в контрольному

калюсі, а також отриманих рослинах-регенерантах) у всіх досліджуваних об'єктах відмічено появу високомолекулярного аплікона довжиною близько 638 п.н. (рис 1, рис 2). Даний аплікон співрозмірний з повною довжиною ретротранспозона *Cassandra*. Виявлені відмінності свідчать про складність процесу виникнення генетичної мінливості, в клітинах при калюсоутворенні (як на середовищах з селективним агентом так і без нього), морфогенезі та регенерації рослин а також при отриманні нових форм в процесі клітинної селекції.

Таким чином, з огляду на отримані дані можна припустити, що селективний чинник (стресовий фактор) в залежності від обраної схеми клітинної селекції може спричиняти різні зміни геному. Для підтвердження цього були розраховані значення генетичних відстаней згідно Nei та Li [24] за 13 локусами (табл. 1). Відповідно до отриманих значень була складена дендрограма (рис. 3). Як видно з представлених даних досліджувані зразки можна згрупувати в чотири окремих кластера. Перший і найбільший включає контрольний калюс 4-го та 6-го пасажів, калюси отримані за ступінчастої клітинної селекції, крім калюсу 6-го пасажу на середовищі з 0,8 М маніту та рослини-регенеранти R1-R3. У другий кластер увійшли зразки рослин R₂ соматональної лінії, стійкої до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі (вихідна форма) та первинний калюс. Третій кластер утворений зразками рослин регенерантів R4 та R5, а також калюсу 6-го пасажу на середовищі з 0,8 М маніту (пізні етапи ступінчастої клітинної селекції). У четвертий кластер увійшли зразки калюсів 1-го та 4-го пасажів, отриманих за прямої клітинної селекції. Узагальнюючи отримані дані зазначимо, що саме четвертий кластер, сформований з калюсів, отриманих за прямої клітинної селекції, а також калюс 6-го пасажу на середовищі з 0,8 М маніту (пізні етапи ступінчастої клітинної селекції) є найбільш генетично віддаленим від вихідних форм ($D_{NL} = 0,4855$). Однак, для більш обґрунтованих висновків потрібно збільшити вибірку та розширити спектр ретротранспозонів.

Існує думка, що в культурі *in vitro* клітини, в яких присутні активні мобільні генетичні елементи, генетично більш нестабільні ніж ті, в яких ці ділянки геному неактивні [27]. У пшениці за приблизними підрахунками близько 90% геному представлено повторюваними послідовностями та 68 % — послідовностями, що здатні міняти свою локалізацію. З огляду на літературні дані, на сьогоднішній день не викликає сумніву, що культивування тканин *in vitro*, яке є потужним стресовим чинником [28,29], здатне активізувати мобільні генетичні елементи. Однак, вони можуть також можуть бути активовані різними біотичними або абіотичними стресовими чинниками [30-32]. Наприклад показано, що в умовах біотичного/абіотичного стресу (дія жасмонової або саліцилової кислот; присутність збудника борошнистої роси) рівень експресії ділянок ретротранспозонів групи TaRT-1 надзвичайно зростає, що наштовхнуло авторів на думку про значну роль ретротранспозонів даної групи у формуванні відповіді на дію стресових чинників. Слід зазначити, що за дії стресових чинників відмічається не тільки підвищення рівня транскрипції даної ділянки, а й активація транспозиції, що може призводити до виникнення мутацій або зміни рівня експресії інших генів [32].

Відповідно до отриманих даних, ми припускаємо, що одним із механізмів адаптації до стресових умов є збільшення генетичної нестабільності та відповідно розширення генетичної різноманітності, що в даних конкретних умовах проявляється на рівні популяцій клітин. З огляду на отримані дані можна висунути припущення, що культивування *in vitro* може стимулювати транспозицію ретротранспозона Cassandra, що можна ідентифікувати на спектрах продуктів ампліфікації досліджуваних зразків як появу амплікона розміром близько 638 п.н. Також показано, що за клітинної селекції очевидно можуть відбуватися множинні точкові мутації або делеції, зокрема в сайтах зв'язування з праймерами до ретротранспозону Cassandra, які приводять до зникнення окремих ампліконів в спектрах продуктів ПЛР.

Висновки. Таким чином, за використання IRAP-аналізу нами проведено молекулярно-генетичний аналіз калюсних ліній м'якої пшениці, стійких до комплексу стресових чинників, зокрема метаболітів *G. graminis* var. *tritici* (збудник офіобольозної кореневої гнилі) і модельованого водного дефіциту та індукованих рослин-регенерантів за використання IRAP-маркерів. Оцінено рівень поліморфізму ДНК отриманих клітинних ліній та рослин і виявлені їх відмінності від вихідних форм за генетичною структурою. Показано, що за культивування в умовах *in vitro* в спектрах продуктів ампліфікації ДНК калюсів та регенерантів відмічено появу високомолекулярного аплікону довжиною близько 638 п.н., що був відсутній у вихідних форм. Виявлено, що при високих дозах стресового фактору розширюється спектр індивідуальних особливостей, пов'язаних з наявністю/відсутністю окремих фрагментів ДНК.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кузнецова О. И., Аш О. А., Хартина Г. А. и др. Исследование растений-регенерантов гороха (*Pisum sativum* L.) с помощью молекулярных RAPD- и ISSR-маркеров // Генетика. – 2005. – 41, №1. – С. 71-77.
2. Muhammad A., Othman R. Characterization of *Fusarium* wilt-resistant and *Fusarium* wilt-susceptible somaclones of banana cultivar rastali (*Musa* AAB) by random amplified polymorphic DNA and retrotransposon markers // Plant Mol Biol Rep.- 2005.- v. 23.- P.241-249.
3. Козыренко М. М., Фисенко П. П., Артюкова Е. В. Анализ генетического разнообразия сортов и соматоклональных линий культурной сои (*Glicine max* (L.) Merr.) методом маркирования межмикросателитных последовательностей (ISSR) // Биотехнология. – 2007. – №1. – С. 3-13.
4. Бавол А. В., Дубровна О. В. Молекулярно-генетичний поліморфізм клітинних ліній пшениці, стійких до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, та регенерантів з них // Цитологія і генетика. – 2009. – 43, № 5. – С. 28-34.

5. *De Vienne D.* Molecular markers in plant genetics and biotechnology. Enfield, NH, USA, 2003.
6. *Kumar A., Bennetzen J.* Plant retrotransposons // *Annu. Rev. Genet.* – 1999. – 33. – P. 479-532.
7. *Kalendar R., Grob T., Regina M. et al.* IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques // *Theor. Appl. Genet.* – 1999. – 98. – P. 704-711.
8. *Kalendar R., Schulman A.H.* IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting // *Nature Protocols.* - 2006. – 1, № 5. – P. 2478–2484.
9. *Leigh F., Kalendar R., Lea V. et al.* Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques // *Mol.Gen. Genomics.* - 2003. - 269. - P. 464–474.
10. *Боронникова С.В., Календарь Р.Н.* Использование IRAP-метода для анализа генетической изменчивости популяций ресурсных и редких видов растений // *Генетика.* – 2010. – Т. 46. - № 1. – С. 44-50.
11. *Цветков И. А., Иванов А. Н., Глазко В. И.* Генетическая дифференциация сортов риса по IRAP-маркерам // *Изв. ТСХА.* – 2006. – 4. – С. 155-159.
12. *Бельтюкова Н. Н., Боронникова С. В., Кариева Л. Г.* Исследование генетического полиморфизма лекарственного вида *Digitalis grandiflora* Mill. с использованием анализа ретротранспозонов // *Аграрная Россия.* – 2009. – 4. – С. 20-23.
13. *Созинова Л.Ф., Цветков И.Л., Сейтбатталова А.И., Комаров А.Б., Глазко В.И., Раманкулов Е.М., Саданов А.К.* Генетическая дифференциация растений-регенерантов мягкой пшеницы с помощью IRAP-маркеров // *Сельскохозяйственная биология.* - 2008. - № 5. - С. 18-21.
14. *Хапиллина О.Н., Новаковская А.П., Райзер О.Б., Созинова Л.Ф.* Генетическая дифференциация линий регенерантов мягкой пшеницы с помощью молекулярно-генетических маркеров // *Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина. Серия*

- сельскохозяйственных, ветеринарных и биологических наук. - 2011. - № 1. – С. 37-45.
15. *Campbell B., LeMare S, Piperidis G, Godwin I.* IRAP, a retrotransposon-based marker system for the detection of somaclonal variation in barley // *Mol. Breeding* .- 2011.- v.27.- P. 193-206.
16. *Evrensel C., Yilmaz S., Temel A., Gozukirmizi N.* Variations in *BARE-1* insertion patterns in barley callus cultures // *Genet. Mol. Res.*-2011.- v.10, N 2.- P. 980-987.
17. *Зінченко М.О, Дубровна О. В., Бавол А. В.* Селекція *in vitro* м'якої пшениці на комплексну стійкість до метаболітів збудник офіобольозу та водного дефіциту // *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів* -2012. - т. 10, №1. – С. 28-36.
18. *Бавол А. В., Дубровна О. В., Лялько І. І.* Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці // *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів.* – 2007. - Т. 5, №1-2. - С. 3-10.
19. *Бавол А. В., Дубровна О. В., Лялько І. І.* Селекція *in vitro* м'якої пшениці на стійкість до *Gaeumannomyces graminis var. tritici* // *Физиология и биохимия культурных растений.* -2009. – Т.41, № 4. –С. 314-320.
20. *Dellaport S. L., Wood J., Hicks J.* A plant DNA minipreparation: Version II [J] // *Plant Molecular Biology Reporter.* –1983. –Vol. 1, № 14. –P. 19–21.
21. *Žiarovská J., Ražná K., Senková S. et al.* Variability of *Linum usitatissimum L.* based on molecular markers // *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science.* – 2012. - 7, № 1. - P. 50-58.
22. *Kalendar R., Tanskanen J., Chang W. et al.* // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2008. - 105(15). - P. 5833–5838.
23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY860314>
24. *Nei M., Li W.H.* Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1979. – 76. – P. 5269–5273.

25. *Yeh F.C., Rongcai Y., Boyle T.* POPGENE. Version 1.31. University of Alberta, Edmonton, Canada. - 1999.
26. *Kumar S., Tamura K., Nei M.* MEGA3: Integrated software for Molecular Evolution Genetics Analysis and sequences alignment // Briefings in Bioinformatics. -2004. -Vol. 5, P. 150-163.
27. *Grandbastien M.-A.* Activation of plant retrotransposons under stress conditions // Trends Plant Sci . - 1998. – 3. - P. 181-187.
28. *Cassells, A. C., Curry, R. F.* Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. -2001. – vol. 64. –P. 145 –157.
29. *Gaspar T., Franck T., Bisbis B. et al.* Concepts in plant stress physiology // Application to plant tissue cultures. Plant Growth Regul. - 2002. – vol. 37. –P. 263–285.
30. *Wessler S. R.* Plant retrotransposones: tuned on by stress // Curr. Biol. – 1996 - №6. - P. 959-961
31. *Ikeda K., Nakayashiki H., Takagi M., Tosa Y., Mayama S.* Heat shock, copper sulfate and oxidative stress activate the retrotransposon MAGGY resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea* // Mol Genet Genomics. -2001. - №266. -P. 318-325.
32. *Todorovska E.* Retrotransposons and their role in plant - genome evolution // Biotechnology & Biotechnological Equipment -2007 -№21. P. 294-305.

Bavol A. V., Zinchenko M. O., Dubrovna O. V.
 MOLECULAR POLYMORPHISM OF CELLULAR LINES OF WHEAT,
 WITH RESISTANT TO METABOLITES OF *G. GRAMINIS VAR. TRITICI*,
 UNDER THE INFLUENCE OF OSMOTIC STRESS

Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine,
 Ukraine, 03022 Kiev, Vasylkivska str.31/17

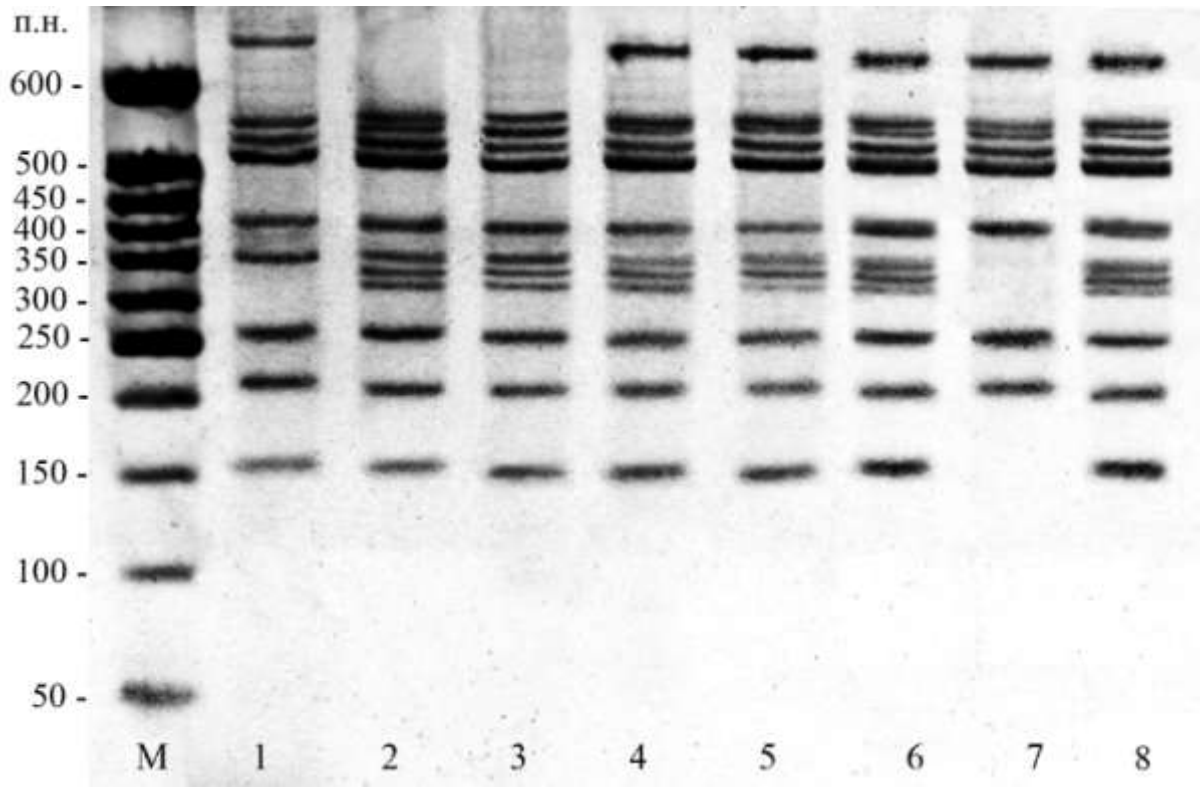
It was carry out the molecular analysis of bread wheat callus lines resistant to the metabolites of ophiobolus root rot (*G. graminis var. tritici*) under influence of osmotic stress and induced from them plant-regenerants using IRAP - method. The level of DNA polymorphism of cell lines and plants was valued and also determined the difference from the original form of the genetic structure. While calluses and plants-regenerants were cultured *in vitro*, in the spectra of the DNA amplification products are noted the appearance of amplicon approximately 638 bp. length, which is absent in original form. Found that, depending on the used cell selection scheme (direct or step) different changes are induced in the genome.

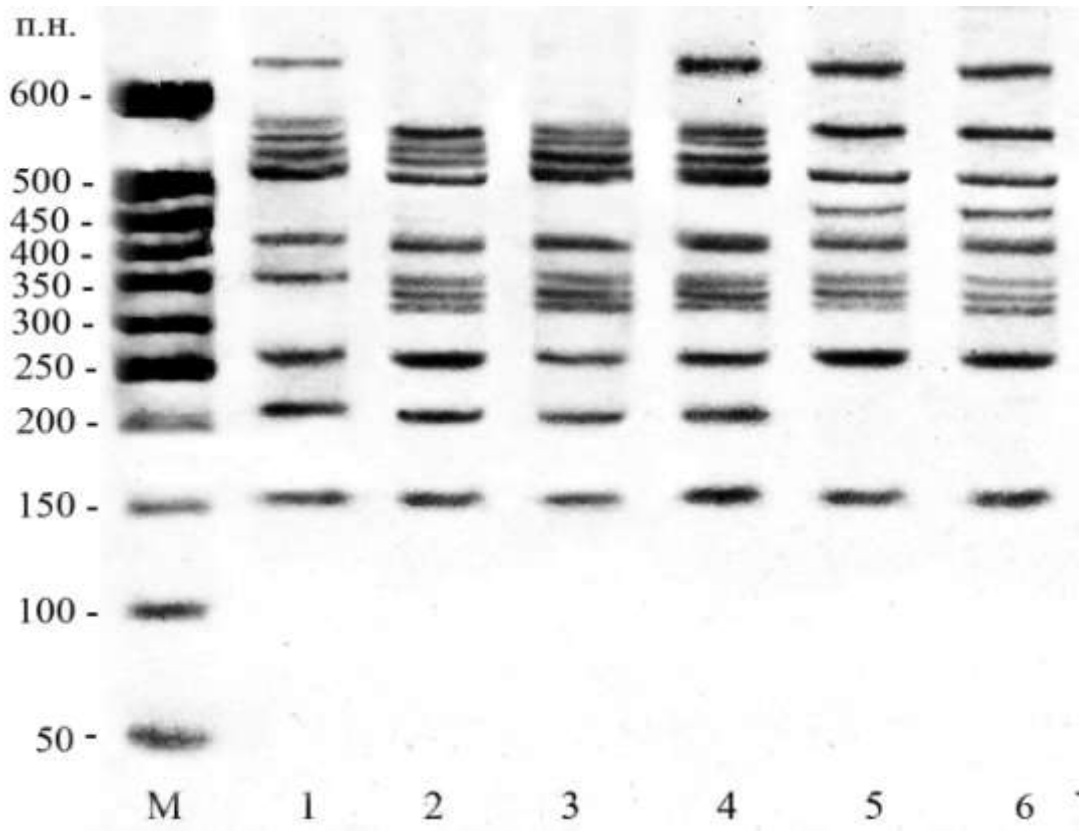
Key words: Triticum aestivum L., in vitro selection, take-all disease, osmotic stress, DNA polymorphism

Бавол А. В., Зинченко М. А., Дубровная О. В.
 МОЛЕКУЛЯРНО – ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ КЛЕТОЧНЫХ
 ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ, УСТОЙЧИВЫХ К МЕТАБОЛИТАМ ВОЗБУДИТЕЛЯ
 ОФИОБОЛЁЗА, ПРИ ДЕЙСТВИИ ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

Проведен молекулярно – генетический анализ каллюсных линий мягкой пшеницы, устойчивых к метаболитам возбудителя офиоболёзной корневой гнили (*G. graminis var. tritici*) при действии осмотического стресса и индуцированных из них растений-регенерантов с использованием IRAP – метода. Оценен уровень полиморфизма ДНК клеточных линий и растений, а также определены их отличия от исходных форм по генетической структуре. При культивировании *in vitro* в спектрах продуктов амплификации ДНК каллюсов и регенерантов отмечено появление ампликона длиной около 638 п.н., который отсутствовал у исходных форм. Установлено, что в зависимости от использованной схемы клеточной селекции (прямая или ступенчатая) могут выявляться различные изменения генома.

Ключевые слова: Triticum aestivum L., клеточная селекция, офиобольоз, осмотический стресс, полиморфизм ДНК

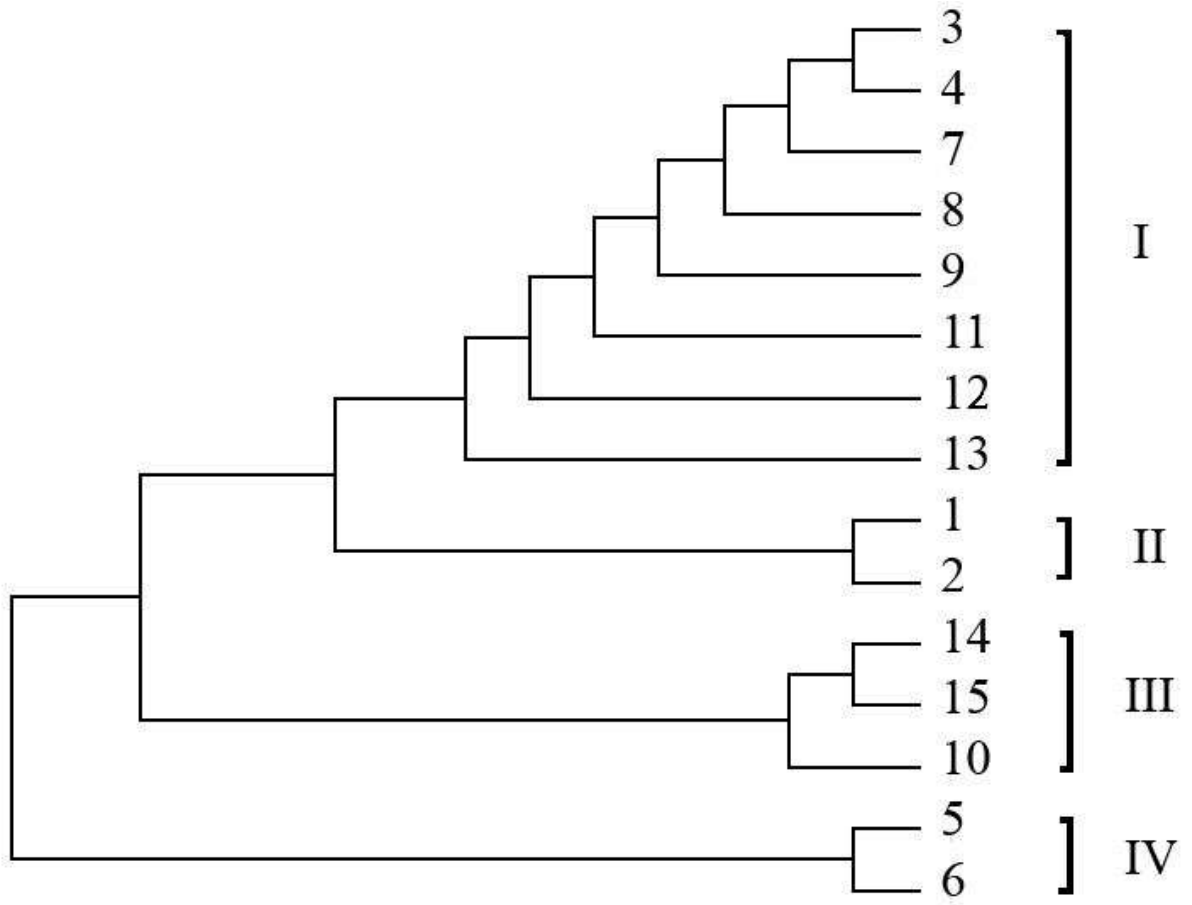




Значення генетичних відстаней, визначених за Nei та Li (1979) між досліджуваними зразками (1-15)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	****														
2	0.0000	****													
3	0.0800	0.0800	****												
4	0.0800	0.0800	0.0000	****											
5	0.4855	0.4855	0.3677	0.3677	****										
6	0.4855	0.4855	0.3677	0.3677	0.0000	****									
7	0.0800	0.0800	0.0000	0.0000	0.3677	0.3677	****								
8	0.0800	0.0800	0.0000	0.0000	0.3677	0.3677	0.0000	****							
9	0.0800	0.0800	0.0000	0.0000	0.3677	0.3677	0.0000	0.0000	****						
10	0.4855	0.4855	0.3677	0.3677	0.9555	0.9555	0.3677	0.3677	0.3677	****					
11	0.0800	0.0800	0.0000	0.0000	0.3677	0.3677	0.0000	0.0000	0.0000	0.3677	****				
12	0.0800	0.0800	0.0000	0.0000	0.3677	0.3677	0.0000	0.0000	0.0000	0.3677	0.0000	****			
13	0.0800	0.0800	0.0000	0.0000	0.3677	0.3677	0.0000	0.0000	0.0000	0.3677	0.0000	0.0000	****		
14	0.3677	0.3677	0.2624	0.2624	0.7732	0.7732	0.2624	0.2624	0.2624	0.2624	0.2624	0.2624	0.2624	****	
15	0.2624	0.2624	0.1671	0.1671	0.6190	0.6190	0.1671	0.1671	0.1671	0.1671	0.1671	0.1671	0.1671	0.0800	****

Примітка: 1 - рослина R₂ соматоклональної лінії, стійкої до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі; 2 - первинний калюс; 3 - контрольний калюс 4-го пасажу; 4 - контрольний калюс 6-го пасажу; 5 – калюс 1-го пасажу на середовищі з концентрацією маніту 0,8 М (пряма клітинна селекція); 6 - калюс 4-го пасажу на середовищі з концентрацією маніту 0,8 М (пряма клітинна селекція); 7 - калюс 1-го пасажу на середовищі з 0,4 М маніту (ступінчаста клітинна селекція); 8 – калюс 3-го пасажу на середовищі з 0,8 М маніту (ступінчаста клітинна селекція); 9 – калюс 4-го пасажу на середовищі без селективного чинника (ступінчаста клітинна селекція); 10 - калюс 6-го пасажу на середовищі з 0,8 М маніту (ступінчаста клітинна селекція); 11-13 – рослини-регенеранти (три зразки: R1-R3); 14 - рослина-регенерант R4; 15 - рослина-регенерант R5.



Підписи до рисунків

Рис. 1. Спектр продуктів ампліфікації ДНК: М - маркер молекулярних мас (Step Ladder DNA S7025); 1 – рослина-регенерант (R4); 2 – рослина R₂ соматоклональної лінії, стійкої до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі (P3); 3 – первинний калюс; 4- калюс 1-го пасажу на середовищі з 0,4 М маніту (лінія № 2); 5 – калюс 3-го пасажу на середовищі з 0,8 М маніту; 6 – калюс 4-го пасажу на середовищі без селективного чинника; 7 - калюс 6-го пасажу на середовищі з 0,8 М маніту (лінія № 4); 8 – калюс 6-го пасажу, що культивувався на середовищі без селективного чинника.

Рис. 2. Спектр продуктів ампліфікації ДНК: М - маркер молекулярних мас (Step Ladder DNA S7025); 1 – рослина-регенерант (R5); 2 – рослина R₂ соматоклональної лінії, стійкої до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі (P5); 3 – первинний калюс; 4- контрольний калюс 4-го пасажу, що культивувався на середовищі без селективного чинника; 5 – калюс 1-го пасажу на середовищі з концентрацією маніту 0,8 М; 6 – калюс 4-го пасажу на середовищі з концентрацією маніту 0,8 М.

Рис. 3. Кластерний розподіл між досліджуваними зразками (1-15), побудований згідно генетичних відстаней за даними аналізу 13 IRAP-локусів за допомогою UPGMA.