

ZELENINA E.A.^{1,2}, MASHKINA O.S.^{1,2}

¹Research Institute of Forest Genetics and Breeding

Russia, 394087, Voronezh, 105, Lomonosova str, e-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

²Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University

Russia, 394006, Voronezh, 1, Universitetskaya square, e-mail: katy-green2009@yandex.ru

CYTOGENETIC CHARACTERISTICS OF COLLECTION OF CURLY BIRCH CLONES LONG-TERM CULTIVATED *IN VITRO*

Aims. Studying of cytogenetic stability of long-term cultivated curly birch clones. **Methods.** Cytogenetic characteristic have included frequency of mitotic abnormalities and mixoploidy level. **Results.** Clones cultivated on hormone-free medium for over 14-20 years conserved their cytogenetic and morphological characteristics both in normal clones and in mutants. **Conclusions.** Long-term cultivation on hormone-free medium is an effective method for conservation of valuable genofond of curly birch.

Key words: Curly birch, cytogenetic stability, long-term cultivation, mixoploidy.

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

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська 31/17, e-mail: dubrovny@ukr.net

ГЕНОМНА МІНЛИВІСТЬ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ, СТІЙКИХ ДО МЕТАБОЛІТІВ ЗБУДНИКА ОФІОБОЛЬОЗУ, ЗА ДІЇ ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ

Вивчення закономірностей і особливостей структурно-функціональної мінливості геному рослин за дії стресових чинників в умовах *in vitro* вносить суттєвий вклад у встановлення механізмів їх стійкості до несприятливих факторів довкілля. Встановлено, що абіотичні стресори індують мінливість та нестабільність геному в культурі *in vitro*, яка виявляється на різних рівнях досліджень [1, 2]. На цитологічному рівні показано, що за присутності осмотичних речовин в середовищі культивування спостерігається зниження мітотичної активності клітин, що супроводжується значними морфологічними та цитохімічними змінами ядер та ядерця [3]. Крім того, гіперосмолярність також створює вторинний окислювальний стрес, спричинений надмірною кількістю активних форм кисню. Такі активні форми кисню можуть викликати пошкодження клітинних структур і макромолекул, в тім числі ДНК, індуючи утворення мутацій, зокрема делецій а також інші генетичні ефекти [4].

Одним із найбільш доступних і швидких способів виявити варіабельність, а потім з'ясувати природу соматональної мінливості є за-

стосування молекулярних маркерів, що ґрунтуються на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) [5]. 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, локалізованих 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 ретротранспозону в іншу ділянку ДНК.

У процесі добору стійких форм за клітинної селекції може виникати генетична мінливість, пов'язана як з умовами культивування, так і дією стресового чинника [6]. У зв'язку з цим, метою роботи було вивчення геномної мінливості клітинних ліній пшениці, стійких до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі (*G. graminis* var. *tritici*), за дії осмотичного стресу та регенерантів з них за використання цитологічного та IRAP-методу.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень були калюсні лінії, отримані із експлантатів верхівки пагона 3-добових стерильних проростків рослин м'якої пшениці сорту Зимоярка та рослин R₂ соматона-

нальних ліній цього ж сорту, стійких до збудника офіобольозної кореневої гнилі. Індукцію калюсогенезу та культивування калюсів проводили по розробленій нами методиці [7]. Для мо-

делювання водного дефіциту, як селективний агент застосовували маніт у концентраціях 0,4, 0,8 та 1,0 М, який додавали до модифікованого середовища МС. Умови проведення експериментів та схеми прямої та ступінчастої клітинної селекції наведено у роботі [8].

Цитогенетичне дослідження калюсів проводились в період найбільшої мітотичної активності на 6-7 добу пасажу. Забарвлювали калюси 2% розчином ацеторсеїну за стандартною методикою [9]. Зміни співвідношення клітин різного рівня плоідності, частоти структурних перебудов хромосом і аномалій мітозу були основними критеріями оцінки цитогенетичного ефекту дії маніту на калюсні культури. Достовірність отриманих даних визначали за критерієм Ст'юдента.

Для IRAP – аналізу відбирали: 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

Результати та обговорення

Клітинні популяції вихідних калюсів (контроль) характеризуються стабільно-гетерогенною структурою, де понад 70% складають гексаплоїдні клітини, при наявності певного пулу (~ 10-17 %) поліплоїдних, (~ 7-15%) анеуплоїдних клітин та незначної кількості клітин іншого рівня плоідності. Кількість хромосом у клітинах варіює від 7 до понад 84. При перенесенні калюсів на живильні середовища з низькою концентрацією осмотика – 0,4 М – достовірних відмінностей за числом наборів хромосом та частотою їх аберацій в клітинах контрольних та дослідних калюсних ліній не виявлено, що свідчить про те, що маніт у низьких концентраціях не має вираженого цитогенетичного ефекту на калюсні культури пшениці. Підвищення концентрації маніту до 0,8 М призводило до статистично достовірного збільшення кількості анеуплоїдних клітин (30%) в контролі, в той час як у ліній, стійких до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі, достовірне збільшення числа таких клітин відбулося лише за концент-

зразків: R1-R5).

Екстракцію ДНК проводили за допомогою СТАВ-методу [10] із проростків, листків рослин-регенерантів або безпосередньо калюсної тканини. Ампліфікацію проводили на приладі «Терцик» 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 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: 95°C – 5 хв; 37× (95°C – 30 с; 55°C – 1 хв; 72°C – 1 хв. 30 сек), 72° С – 7 хв. В дослідженнях застосовували IRAP-праймери 5'-GGTGTGTCGGGGCGTTACA-3' та 5'-CCGGGAGCCCATTCGAAC-3' [11] комплементарні до послідовностей двох поруч розташованих LTR ретротранспозону Cassandra. Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу в 1,6% агарозному гелі з додаванням бромистого етидію. Розділення проводилось при напрузі 50 в/см в трис-ацетатному буфері. Електрофоретичні спектри візуалізували під УФ променями. Для оцінки розмірів продуктів ампліфікації використовували маркер Step Ladder DNA S7025 (SIGMA). Приблизний розмір продуктів ПЛР визначали за допомогою пакету прикладних програм TotalLab v.2.01 (Nonlinear Dynamics).

рації 1М (18%).

При культивуванні калюсів на селективних середовищах з сублетальною концентрацією маніту (0,8 М) у стійких та нестійких форм вже в першому пасажі спостерігаються достовірне збільшення клітин з порушеннями мітозу. В умовах осмотичного стресу виявлено: конденсацію та фрагментацію ядер, хромосомні аберації у вигляді хроматидних мостів, злипання окремих хромосом та їх клампінг, а також порушення веретена поділу у вигляді багатополосних мітозів, відставання хромосом, утворення мікроядер.

Більшість хромосомних аберацій представлена у вигляді хроматидних мостів (55,7%), що свідчить про збереження в клітинних поколіннях дицентричних хромосом. За дії сублетальної дози маніту у нестійких ліній частота аберацій збільшується майже у 4 рази (від 4 до 15%), тоді як у стійких ліній лише у 2 рази – (від 4 до 9%). Слід зазначити, що найбільш вираженим цитогенетичним ефектом дії маніту був клампінг

хромосом – тобто множинне їх злипання у вигляді комків, що унеможлиблює нормальний цитокінез, і призводить до апоптозу. Ця хромосомна аберация зустрічалася в контролі з частотою не більше 1%, в той час, як на середовищах з сублетальною концентрацією маніту кількість таких клітин достовірно зростала до 5% у стійкої лінії та 7% – у нестійкої.

На селективних середовищах з сублетальною концентрацією маніту (0,8 М) лостовірно зростала частота аномалій мітозу, пов'язана з порушеннями веретена поділу, від 4-5 % – у контролі до 8-11% – у досліді. В ході дослідження виявлено відставання хромосом, багатополюсні мітози, також спостерігали клітини з лопатеви-ми ядрами, мікроядрами, дво- та багатоядерні клітини. Слід відзначити, що серед турбагенних порушень мітозу більшість складала багатополюсні мітози (55%). На середовищах з високою концентрацією осмотика спостерігалось достовірно збільшення їх числа у нестійких ліній (від 1% – у контролі до 6 % – у досліді), у той час як у стійких форм суттєвих відмінностей не виявлено. Крім того, за сублетальної концентрації стресора в першому пасажі зростає кількість клітин з мікроядрами (до 25-30% від загального числа клітин з турбагенними порушеннями), що також є ознакою апоптозу, нестабільності геному та показником значної генотоксичної дії маніту на клітини. У нестійкої форми виявляється порівняно більше таких клітин, проте достовірних відмінностей не встановлено. Слід зазначити, що частка клітин з іншими патологіями мітозу, зокрема полікаріоцитами, була незначною – їх кількість не перевищувала 10 % від загальної кількості клітин з аномаліями поділу.

Таким чином, встановлено, що високі концентрації осмотика спричиняють кластогенний ефект та викликають турбагенні порушення в клітинах калюсних культур пшениці. Стійкі до метаболітів збудника офіобольозу калюсні лінії характеризуються достовірно нижчою частотою цитологічних порушень, що може бути результатом того, що клітини, стійкі до одного стресового чинника, проявляють резистентність і до іншого стресора.

Наступним етапом дослідження був IRAP-аналіз отриманих форм. Перш за все важливо було переконатися у генетичній гомогенності контрольних рослин за досліджуваними локусами. Для цього аналізували зразки ДНК 10 довільних рослин R_2 соматональних ліній, стійких до метаболітів збудника офіобольозної

кореневої гнилі, (зразки P1-P10) та первинний калюс отриманий з них. В цілому, для кожного з проаналізованих зразків отримано ідентичні спектри продуктів ПЛР та виявлено 11 ампліконів розміром від 154 до 581 п.н. Типові зразки наведено на рис. 1 (доріжка 2 та 3) та рис. 2 (доріжка 2 та 3). Отримані дані свідчать, що у вихідного матеріалу відсутній природний та/або спонтанний поліморфізм за досліджуваними локусами.

Для виявлення поліморфізму ДНК за ступінчастої клітинної селекції, відбирали зразки калюсів на ранніх та пізніх етапах ступінчастої клітинної селекції. 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 клітинної 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 амплікону довжиною близько 581 п.н. На пізніх етапах клітинної селекції (6 пасаж 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 7). Відсутність певних ампліконів була відмічена і у рослин-регенерантів. Так, виявлено рослину, у якої також були відсутні амплікони розміром приблизно 334 та 347 п. н. (рис. 1, доріжка 1). Крім того, за ступінчастої клітинної селекції у всіх досліджуваних зразків, а також у контрольних калюсах 6-го пасажу та отриманих рослин-регенерантів відмічено появу нового відносно високомолекулярного амплікона розміром 638 п.н.

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 прямої клітинної селекції.

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.

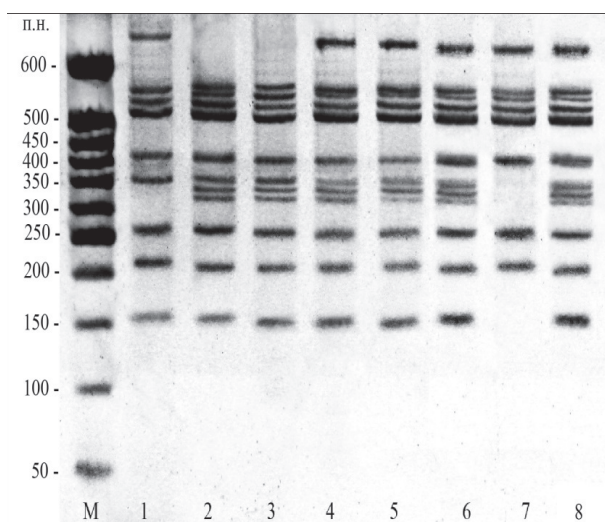


Рис. 1. Спектр продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків за ступінчастої клітинної селекції: М – маркер молекулярних мас (Step Ladder DNA S7025); 1 – рослина-регенерант; 2 – рослина R₂ соматоклональної лінії, стійкої до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі; 3 – первинний калюс; 4-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

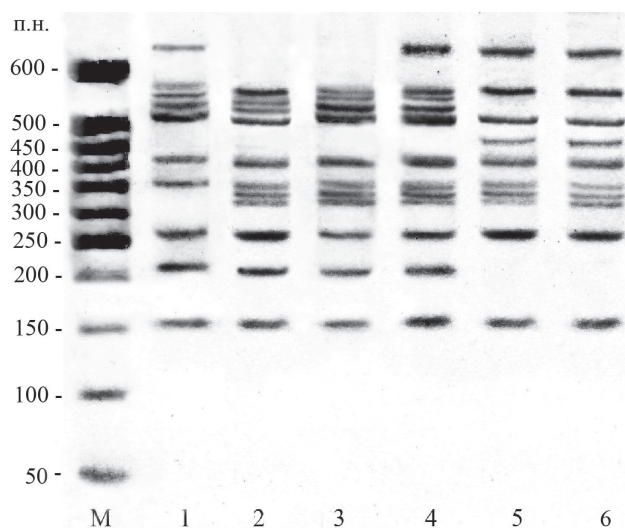


Рис. 2. Спектр продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків за прямої клітинної селекції: М – маркер молекулярних мас (Step Ladder DNA S7025); 1 – рослина-регенерант; 2 – рослина R₂ соматоклональної лінії, стійкої до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі; 3 – первинний калюс; 4- контрольний 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 0,8М

Таким чином, крім специфічних змін в 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 відносно високомолекулярного аплікону довжиною близько 638 п.н. (рис. 1, рис. 2). Даний аплікон співрозмірний з повною довжиною ретротранспозону Cassandra. Виявлені відмінності свідчать про складність процесу виникнення генетичної мінливості 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. З огляду на отримані дані, можна висунути припущення, що культивування *in vitro* може викликати транспозицію ретронспозону Cassandra, що можна ідентифікувати в спектрах продуктів ампліфікації досліджуваних зразків як появу аплікону 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 даного ретротранспозону, які приводять до зникнення окремих апліконів в спектрах продуктів ПЛР.

Література

1. Тищенко Е.Н. Михальская С.И., Сергеева Л.Е. Нестабильность RAPD-ампликонов сои при клеточной селекции на устойчивость к оксианионам вольфрама и ванадия // 36. наук. праць "Фактори екпериментальної еволюції організмів". – К.: Логос., 2008. – Т. 4. – С. 205-210.

2. Errabii T., Bernard C., Gandonou C., Essalmani H., Abrini J., Idaomar M., Skali-Senhaji N. Effects of NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum sp.*) callus cultures // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 2007. – Vol. 29. – P. 95-102.
3. Gawande N.D., Mahurkar D.G., Rathod T.H., Jahagidar S.W., Shinde S.M. *In vitro* screening of wheat genotypes for drought tolerance // *Annals Plant Physiol*. – 2005. – Vol. 19. – P. 162-168.
4. Hassanein A. M. A. Establishment of efficient *in vitro* method for drought tolerance evaluation in *Pelargonium* // *A. Journal of horticultural science and ornamental plants*. – 2010. – Vol. 2, №1. – P. 8-15
5. Хапилина 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.
6. Созинова Л.Ф., Цветков И.Л., Сейтбатталова А.И. и др. Генетическая дифференциация растений-регенерантов мягкой пшеницы с помощью IRAP-маркеров // *Сельскохозяйственная биология*. – 2008. – №5. – С. 18-21.
7. 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.
8. 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.
9. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. –М.: Колос, 1988. – С. 168 – 170
10. Kleinhofs A., Kilian A., Maroof M.A.S. et al. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome // *Theor. and Appl. Genet*. – 1993. – Vol. 86. – P. 705-712.
11. Kalendar, R., J. Tanskanen, W. Chang, K. et al. Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol. 105. – P. 5833-5838.

ZINCENKO M. O. BAVOL A. V., DUBROVNA O. V.

Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str 31/17, e-mail: dubrovny@ukr.net

VARIABILITY OF GENOME OF WHEAT CELLULAR LINES RESISTANT TO METABOLITES OF OPHIOBOLUS ROOT ROT UNDER OSMOTIC STRESS

Aims. Determination of cytogenetic and molecular – genetic polymorphism of resistant/nonresistant to the pathogen metabolites of *G. graminis var. tritici* cellular lines of bread wheat under osmotic stress and plant-regenerants from them. **Methods** cytogenetic analysis and IRAP – method. **Results.** It was found that the effect of mannitol appears with high concentrations and result in increased frequency of aneuploidy and spindle failures. While callus and regenerated plants were cultured *in vitro*, in the spectra of the DNA amplification products noted the appearance of amplicon approximately 638 bp. length, which is absent in original form. **Conclusions.** We found that, depending on the scheme used cell selection (direct or step) can identify the different changes in the genome.

Key words: *Triticum aestivum* L., cellular lines, cytogenetic effect, IRAP-method.

КАСЯНЧУК Р.М., ВОЛКОВ А.Р., ПАНЧУК І.І.

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича

Україна, 58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського 2, e-mail: irina.panchuk@gmail.com

ВПЛИВ САХАРОЗИ НА РІВЕНЬ мРНК АРХ ЗА ДІЇ ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Рослини постійно піддаються впливам стресових факторів абіотичної природи. Різні форми абіотичного стресу – світловий стрес, надмірна інсоляція, сольовий та високотемпературний стреси – призводять до зростання продукції активних форм кисню (АФК) в рослинних

клітинах [9, 11]. Шкідливі наслідки має також і підвищення концентрації іонів важких металів (ВМ), які негативно впливають на перебіг багатьох метаболічних процесів 6, 7, зокрема порушується окисно-відновна рівновага у клітині та втрачається активність багатьох ензимів [7, 8,