

УДК 57.085.23:633

**ЦИТОЛОГІЧНИЙ ЕФЕКТ ДІЇ МАНІТУ НА КАЛЮСНІ КУЛЬТУРИ
М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ, СТІЙКІ ТА НЕСТІЙКІ ДО МЕТАБОЛІТІВ
*GAEUMANNOMYCES GRAMINIS VAR. TRITICI***

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

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17*

Досліджено цитологічні особливості стійких та нестійких до метаболітів збудника офіобользної кореневої гнилі калюсних культур м'якої пшениці за дії осмотичного стресу. Встановлено, що високі концентрації стресового чинника мають виражений кластогенний ефект та викликають турбагенні порушення в клітинах калюсів. Сстійкі до метаболітів збудника офіобольозу калюсні лінії характеризуються достовірно нижчою частотою цитологічних порушень.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., калюсні культури, маніт, цитологічний аналіз

Вивчення закономірностей і особливостей структурно-функціональної мінливості геному рослин за дії стресових чинників вносить суттєвий вклад у встановлення механізмів їх стійкості до несприятливих факторів довкілля. Застосування культури *in vitro* дозволяє розглядати дію стресорів на клітину в строго контрольованих умовах вирощування та надає можливість виключити складні корелятивні взаємовідносини між різними органами і тканинами й тим самим полегшити дослідження самого процесу дії стресового фактора на клітинний метаболізм.

Встановлено, що абіотичні стресори індукують мінливість та нестабільність геному в культурі *in vitro*, яка виявляються на різних рівнях

досліджень [10,15,27]. На цитологічному рівні показано, що в умовах дії осмотичних речовин відбувається зниження мітотичної активності клітин, що супроводжується значними морфологічними та цитохімічними змінами ядер та ядерця [14-18,22,25]. Ці зміни проявлялися в деструктуризації, гомогенізації, вакуолізації, зменшенні середніх розмірів та появі поліморфних ядер. За осмотичного стресу спостерігається значна конденсація ядер та фрагментація ДНК [1,26]. Крім того, гіперосмолярність також створює вторинний окислювальний стрес, який викликає надмірна кількість активних форм кисню. Активні форми кисню також можуть мати пошкоджуючий вплив на клітинні структури і макромолекули, особливо на ДНК, викликаючи численні ушкодження, внаслідок чого виникають делеції, мутації та інші генетичні ефекти [13,19-21]. Значний цитотоксичний ефект осмотиків, зокрема маніту, було встановлено при дослідженні клітин меристеми кореня рослин *Centaurea ragusina* L., які культивувалися *in vitro* [24]. Виявлено як хромосомні аберації, так і аномалії мітозу, пов'язані з порушеннями веретена поділу.

Особливості цитогенетичної мінливості калюсних культур пшениці в процесі отримання форм, стійких до абіотичних стресових чинників, досліджені не достатньо. Однак цитогенетична нестабільність при культивуванні *in vitro* може призводити як до втрати стійкості до стресорів, так і до зниження морфогенетичного потенціалу [2,8]. Метою даної роботи було вивчення цитологічного ефекту дії маніту на клітини стійких та нестійких до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі калюсів м'якої пшениці протягом 6 пасажів культивування *in vitro*.

Методика

Матеріалом досліджень були калюсні лінії, отримані із експлантатів верхівки пагона 3-добових стерильних проростків рослин м'якої пшениці сорту Зимоярка та рослин R₂ соматональних ліній цього ж сорту, стійких до збудника офіобольозної кореневої гнилі. Для індукції калюсу використовували середовище МС [23], доповнене 2,4-Д у концентрації 2,0 мг/л. Калюси культивували при 26 °С, освітленні 3-4 клк, відносній вологості повітря 70 % і

16-годинному фотоперіоді. В якості стресового чинника використовували маніт, який додавали у поживне середовище у концентраціях: 0,4, 0,8 та 1,0 М. Для того, щоб всі клітини підлягали осмотичному впливу використовували маленькі мікрокалюси (не більше 5-10 мг). Летальні та сублетальні концентрації маніту в культурі тканин пшениці були встановлені в попередніх дослідженнях [4]. Контролем слугували калюсні культури, які вирощувалися на середовищах без селективного чинника.

Цитологічний аналіз проводився, виключаючи предфіксаційний вплив на мітоз, з використанням стандартної методики фіксації (етиловий спирт: оцтова кислота 3:1). Калюсні культури забарвлювали 2% оцетоорсеїном та готували тимчасові препарати за стандартною методикою [9]. Цитологічне дослідження калюсів проводили в експоненціальну фазу росту, в період найбільшої мітотичної активності, яка спостерігалася на 6-7 добу культивування. Цитогенетичний ефект дії маніту на культуру тканин пшениці визначали за зміною співвідношення клітин різного рівня плоідності та частотою структурних перебудов хромосом і аномалій мітозу. Достовірність отриманих даних визначали за критерієм Ст'юдента.

Результати та обговорення

Треба відмітити, що клітинні культури пшениці виявили схожу реакцію на осмотичний стрес, тому особливості впливу різних концентрацій маніту на генетичну структуру клітинних популяцій наведено на прикладі калюсних ліній сорту Зимоярка №7 (нестійка) та №11 (стійка до метаболітів збудника офіобольозу).

Клітинні популяції вихідних калюсів (контроль) характеризуються стабільно-гетерогенною структурою, де понад 70% складають гексаплоїдні клітини, при наявності певного пулу (~ 10 -17 %) поліплоїдних та (~ 7-15%) анеуплоїдних клітин та незначної кількості клітин іншого рівня плоідності. Кількість хромосом у клітинах варіює від 7 до понад 84 (рис. 1).

При перенесенні калюсів на середовище з низькою концентрацією осмотика (0,4 М) протягом 6 пасажів достовірних відмінностей за числом наборів хромосом та частотою їх аберацій в клітинах контрольних та дослідних калюсних ліній не виявлено. Це свідчить про те, що маніт у низьких концентраціях не має вираженого цитогенетичного ефекту на калюсні культури пшениці.

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 клітини з порушеннями мітозу. В умовах осмотичного стресу виявлено: конденсацію та фрагментацію ядер, хромосомні аберації у вигляді хроматидних мостів, злипання окремих хромосом та їх клам্পінг, а також порушення веретена поділу у вигляді багатополюсних мітозів, відставання хромосом, утворення мікроядер (рис. 2 в, г).

За сублетальної концентрації стресового чинника відбуваються певні зміни і в структурі клітинних популяцій калюсних культур. У нестійкої лінії №7 достовірно зменшується кількість еуплоїдних (гексаплоїдних) клітин та майже у два рази збільшується число анеуплоїдних клітин (рис.3). Достовірних відмінностей за генетичною структурою клітинних популяцій між контролем та стійкою лінією № 11 не виявлено (рис.3). Протягом подальшого культивування суттєвих змін в структурі клітинних популяцій стійких та нестійких калюсів не спостерігалось. Певна стабілізація калюсних культур за генетичною структурою може свідчити про те, що пройшов добір клітинної популяції, адаптованої до росту на селективному середовищі.

Необхідно зазначити, що за частотою поліплоїдних клітин контрольні та дослідні калюси достовірно не відрізнялась (рис.3), лише в шостому пасажі виявлено певну тенденцію до її підвищення у контролі, що може бути пов'язано зі старінням клітинної популяції та зниженням частоти мітозів. Нами простежений механізм виникнення поліплоїдів, які є результатом утворення

реституційних ядер за рахунок порушення роботи веретена поділу й, як наслідок цього процесу, нерозходження хромосом до полюсів.

Вихідні калюсні штами характеризуються досить низьким рівнем хромосомних аберацій – у ліній № 7 та № 11 він не перевищує 4 відсотків (рис.4). За дії сублетальної дози маніту вже в першому пасажі на селективному середовищі у нестійкої лінії №7 рівень порушень анафаз збільшується майже у 4 рази (15%), водночас частота структурних перебудов хромосом у стійкої лінії № 11 лише у 2 рази – до 9%. Тобто високі концентрації маніту мають виражений кластогенний ефект на калюсні культури обох типів. Починаючи з третього пасажу частота таких порушень у лінії № 11 суттєво не змінюється, на відміну від нестійкої лінії №7 де відбувається збільшення кількості аберацій до 19% в шостому пасажі. Тобто стійка калюсна лінія протягом 6 пасажів культивування характеризується достовірно нижчою частотою хромосомних аберацій порівняно із нестійкою.

Значна кількість аберацій в нашому експерименті представлена у вигляді хроматидних мостів що свідчить про збереження в клітинних поколіннях дицентричних хромосом [6]. Фрагменти траплялися дуже рідко, що вказує на відсутність “свіжих” розривів хромосом. В обох випадках у контрольних та стійких калюсів не виявлено клітин, які несуть одночасно мости та фрагменти.

Слід зазначити, що найбільш вираженим цитогенетичним ефектом дії маніту був клампінг хромосом – тобто множинне їх злипання у вигляді комків, що унеможлиблює нормальний цитокінез, призводячи до апоптозу (рис. 2 д) . Ця хромосомна аберація зустрічалася в контролі з частотою не більше 1%, в той час, як на середовищах з сублетальною концентрацією маніту кількість таких клітин достовірно зростала в декілька разів - до 5% у стійкої лінії та 7% - у нестійкої. Впродовж усього періоду культивування на селективному середовищі (6 пасажів) достовірних відмінностей за частотою появи клітин із даним порушенням між калюсами різного типу не виявлено.

Сумарна кількість аномалій мітозу, пов'язана з порушеннями веретена поділу, в контролі не перевищувала 4-5 відсотків (рис.5). Виявлені відсталі

хромосоми, багатополюсні мітози, клітини з лопатевими ядрами та мікроядрами, а також двоядерні. При перенесенні калюсів на поживні середовища з низькою концентрацією осмотика, яка слабо інгібує ріст культур - 0,4М, достовірних відмінностей за їх кількістю в клітинах контрольних та дослідних калюсів не виявлено. Це свідчить про те, що маніт у низьких концентраціях не має вираженого турбагенного ефекту на калюсні культури пшениці.

На селективних середовищах з 0,8 М маніту вже в першому пасажі частота аномалій мітозу, пов'язана з порушеннями веретена поділу, збільшилася до 9 % у лінії №11 та до 13% - у лінії №7. Отримані результати свідчать, що сублетальна концентрація маніту викликає також і турбагенні порушення в клітинах калюсних культур пшениці. Треба відмітити, що серед турбагенних порушень мітозу більшість складала багатополюсні мітози (55%). На середовищах з високою концентрацією осмотика спостерігалось достовірне збільшення їх числа у лінії №7 (від 1% в контролі до 7 % в досліді), в той час як у лінії №11 суттєвих відмінностей не виявлено. Відомо, що така аномалія клітинного поділу є проявом сильної антимікротрубочкової дії токсичних сполук [16]. У 6 пасажі культивування на селективному середовищі кількість багатополюсних мітозів мала тенденцію до підвищення, проте достовірних відмінностей не виявлено.

Крім того, за сублетальної концентрації осмотика в першому пасажі зростає кількість клітин з мікроядрами (до 25-30% від загального числа клітин з турбагенними порушеннями), що є ознакою апоптозу, нестабільності геному та показником значного генотоксичного ефекту маніту на клітини [12]. У нестійкої форми виявляється порівняно більше таких клітин, проте достовірних відмінностей не встановлено. Протягом подальшого культивування суттєвих змін також не виявлено.

Існує думка, що можливими механізмами дії маніту є його інгібуючий вплив на ферменти репарації ДНК, що цитологічно проявляється в істотному збільшенні частки

фрагментів хромосом у метафазі мітозу і мікроядер в інтерфазних клітинах. Мікроядра можуть утворюватися внаслідок виходу з мітозу клітин із відставанням хромосом, що разом із багатополюсними мітозами обумовлює можливість розвитку анеуплоїдії [5,11].

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. Реститутивні клітини, клітини з лопатевими ядрами (Рис. 2 *г*) або полікаріоцити (Рис. 2 *б*) можуть утворюватися внаслідок виходу клітин із К-мітозу шляхом деконденсації хаотично розкиданих хромосом, минаючи стадію розходження хромосом та утворення клітинної стінки [7]. Утворення двоядерних клітин відбувається внаслідок порушення клітинного поділу, що пов'язане із запізненням цитокінезу. Такі ядерні аномалії інтерфазних клітин також характеризують турбагенний ефект дії маніту.

Отже, цитогенетичний аналіз структури клітинних популяцій пшениці впродовж тривалої клітинної селекції виявив подібний тип їх розвитку – достовірне збільшення числа анеуплоїдних клітин при сублетальних концентраціях осмотика. Встановлено, що сублетальна концентрація маніту викликає турбагенні порушення у клітинах нестійких калюсів, а серед хромосомних аберацій найбільш вираженою є клампінг хромосом.

Підсумовуючи, слід зазначити, що нами виявлений цитогенетичний ефект дії маніту в культурі тканин м'якої пшениці. Сублетальні концентрації осмотика викликають зміни рівня плоїдності клітин калюсних ліній, що виявляється достовірним збільшенням числа анеуплоїдних клітин. Показано, що високі концентрації маніту мають виражений кластогенний ефект лише на нестійкі клітинні лінії пшениці. Злипання хромосом було найбільш вираженим цитогенетичним ефектом дії цього стресового чинника на калюсні культури пшениці. Встановлено, що сублетальна концентрація маніту викликає турбагенні порушення в клітинах нестійких калюсів.

1. Бублик Е.Н., Адонин В.И., Кунах В.А. Цитогенетическая изменчивость клеточных линий *Ungernia victoris* при выращивании на питательных средах различного состава // Цитология и генетика. — 2008. — 42, № 1. — С. 29—36.
2. Губанова Н.Я., Дубровная О.В., Чузункова Т.В. Отбор и сравнительный анализ устойчивых к солевому стрессу каллусных культур кормовой свеклы, полученных из эксплантов различной ploидности // Физиология и биохимия культ. растений.- 2000.- 32, №5.- С. 362-368.
3. Дубровна О.В. Цитогенетичний ефект дії NaCl та Na₂SO₄ на калюсні культури кормових буряків // Физиология и биохимия культ. растений. — 2005. — 37, № 1. — С. 30—36.
4. Дубровна О.В., Бавол А.В., Зінченко М.О., Лялько І.І., Круглова Н.М. Вплив осмотичних речовин на калюсні лінії м'якої пшениці, стійкі до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis var. tritici* // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. 2011, Т.9, №1.- С.10-16.
5. Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Ванчугова Н.Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. - Томск: Изд-во ТГУ, 1992.-270с.
6. Кунах В. А. Механізми та деякі закономірності соматональної мінливості рослин // Вісник Укр. тов. генетиків і селекціонерів. —2003. —№1. — С. 101–106.
7. Кундельчук О. П., Тарасенко Л. В., Блюм Я. Б. Сравнение действия амипрофосметила на структуру клеток корня у чувствительных и устойчивых линий *Nicotiana plumbaginifolia* // Физиология растений. - 2002. - 49, № 3. - С. 425-430.
8. Михальская С.И., Сергеева Л.Е., Тищенко Е.Н. Цитогенетический анализ клеточной линии сои, устойчивой к

- оксианионам вольфрама // Физиология и биохимия культ. растений. – 2010. –42, № 2. – С. 125-131.
9. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. –М.: Колос, 1988. - С.168 – 170.
 10. Тищенко Е.Н. Михальская С.И., Сергеева Л.Е. Нестабильность RAPD-ампликонов сои при клеточной селекции на устойчивость к оксианионам вольфрама и ванадия // Зб. наук. праць “Фактори експериментальної еволюції організмів”. – К.: Логос.- 2008. - Том 4. - С. 205 – 210.
 11. Antoccia A. Degrassi F., Battistoni A., Ciliutti P., Tanzarella C. In vitro micronucleus test with kinetochore staining:evaluation of test performance // Mutagenesis.- 1991 - v. 6, p. 319-324.
 12. Blum A. Plant breeding for stress environment. CRC Press. Israel, 1988.-450 p.
 13. Dat J., Vandenabeele S., Van Montagu M., Inze D., Van Breusegem F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses // Cell. Mol. Life Sci. - 2000. v. 57.- P. 779–795.
 14. Echenique G.V., Curvetto N.R. Effect of water stress upon cell division in root tips of *Eragrostis carvula* // [Biologia Plantarum](#).-1990.- v. 32, N 2, - P.153-160
 15. 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.- v.29.- P. 95-102.
 16. Fiskesjo G. In vitro toxicity testing protokol. – Humana Press, Totowa, 1995- NJ.-P.119-127.
 17. 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. -v. 19. –P. 162-168.

18. *Hasegawa P., Bressan R., Handa S., Handa A.* Cellular mechanisms of tolerance to water stress // Hort Science .- 1984.- v.19.- P.371-377.
19. *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. – v. 2 (1). – P. 8 - 15
20. *Imlay J.A., Linn S.* DNA damage and oxygen radical toxicity // Science.- 1986.- v.240.- P. 1302–1309.
21. *Kultz D., Chakravarty D.* Hyperosmolarity in the form of elevated NaCl but not urea causes DNA damage in murine kidney cells // Proc. Natl. Acad. Sci.- 2001.- v. 98.- P.1999–2004.
22. *Munns R.* Comparative physiology of salt and water stress // Plant Cell Environ .-2002.- v. 25.- P. 239–250.
23. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Phisiol. Plant. –1962. –v. 15. – P. 473–479.
24. *Radic S., Prolic M., Pavlica M., Pevalek-Kozlina B.* Cytogenetic effects of osmotic stress on the root meristem cells of *Centaurea ragusina* L.// Environmental and experimental botany. – 2005 - v. 54, № 3.- P.213-218.
25. *Verma D.* Cytokinesis and building of the cell plate in plants // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 2001 - v.52- P.751-784.
26. *Xiong L., Zhu J.-K.* Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress // Plant Cell Environ.- 2002.- v. 25.- P. 131–139.
27. *Zhang J., Kirkham M.* Drought stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species// Plant Cell Physiology.- 1994.- v. 35.- P. 785-791.



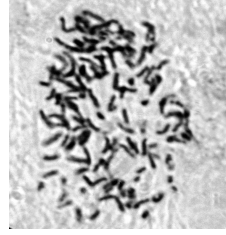
a



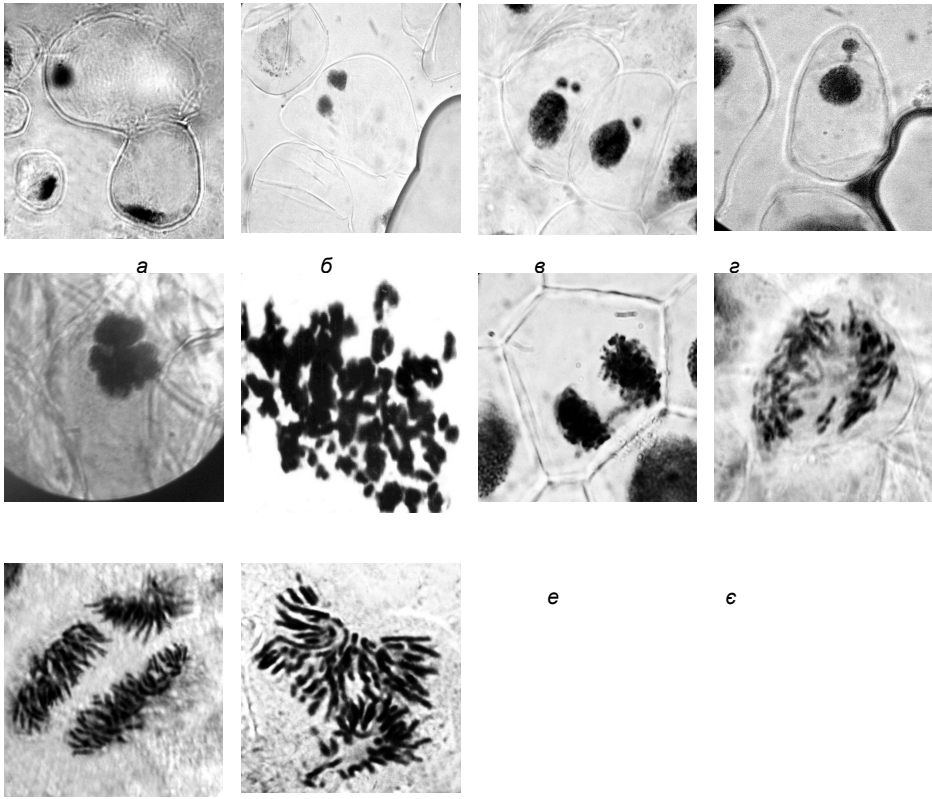
б



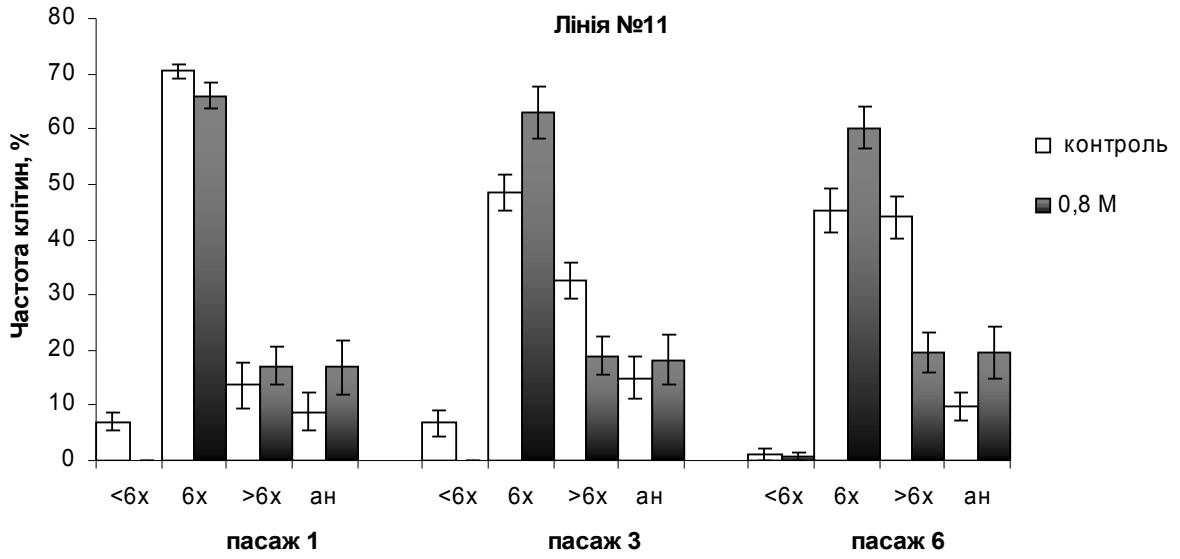
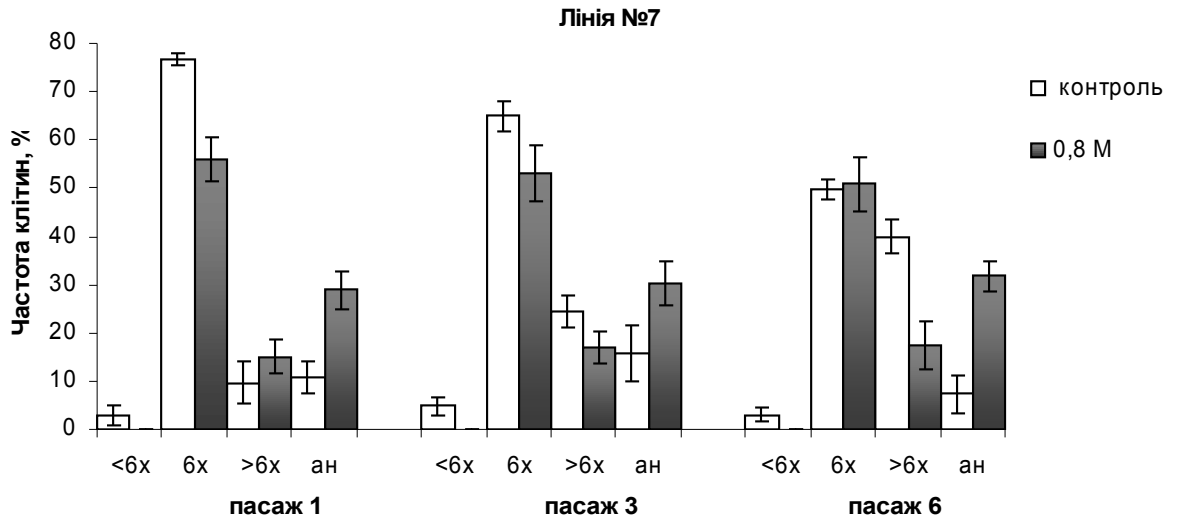
в

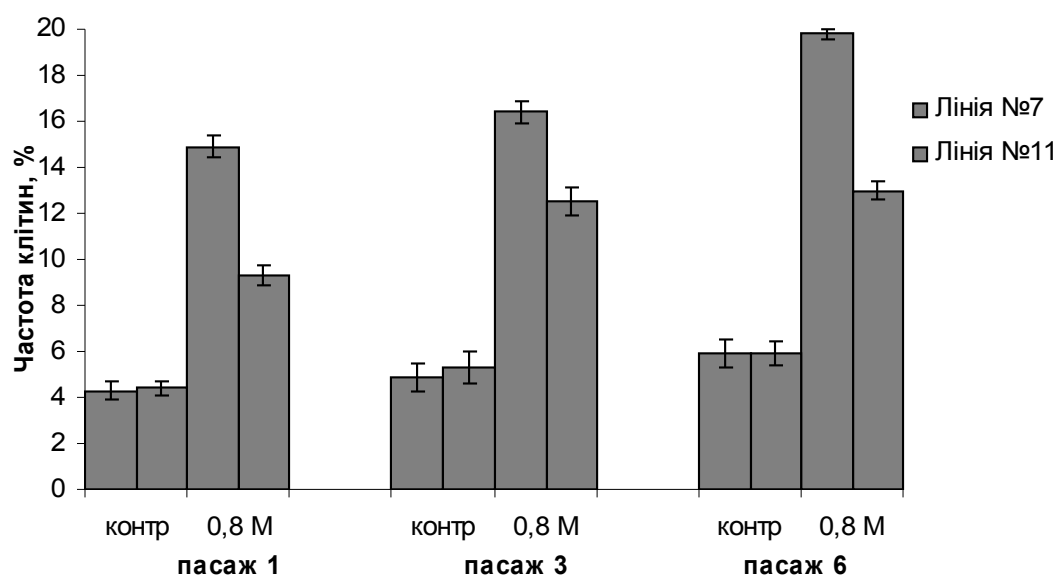


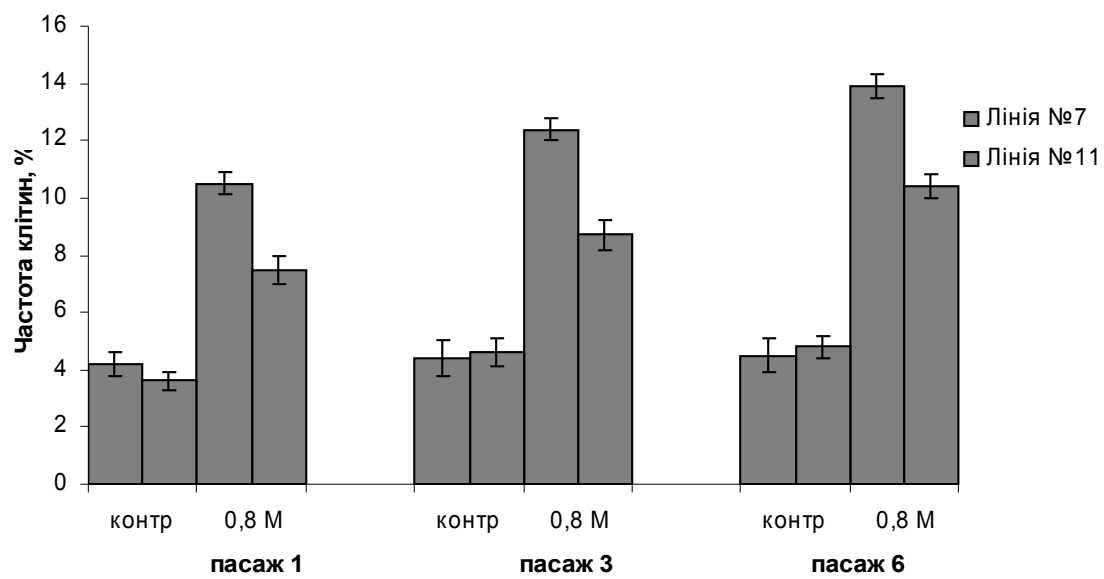
г



3







Підписи до рисунків

Рис. 1. Клітини різного рівня плоідності калюсних культур пшениці: *a* – $2n=1x=7$; *б* – $2n=2x=14$; *в* – $2n=6x=42$; *г* – $2n=12x+3=87$

Рис. 2. Клітини калюсу пшениці в умовах осмотичного стресу: *a* – конденсація ядер; *б* - двоядерна клітина; *в*, *г* – мікроядра; *т* – лопатеве ядро; *д* – клампінг; *е* – хроматидний міст; *є* – відставання хромосом; *ж*, *з* – багатополосний мітоз

Рис. 3. Частота клітин з різним числом хромосом у калюсів нестійкої та стійкої лінії на контрольному середовищі та середовищі з сублетальною концентрацією маніту: по вертикалі – частота клітин, %; по горизонталі – кількість клітин із числом хромосом (ан – анеуплоїдні клітини).

Рис. 4. Частота аберацій хромосом у калюсів на контрольному середовищі та середовищі з сублетальною концентрацією маніту

Рис. 5. Частота виникнення турбагенних ефектів у мітотичних клітинах калюсних культур м'якої пшениці у калюсів на контрольному середовищі та середовищі з сублетальною концентрацією маніту

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ДЕЙСТВИЯ МАННИТА НА КАЛЛЮСНЫЕ КУЛЬТУРЫ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ, УСТОЙЧИВЫЕ И НЕ УСТОЙЧИВЫЕ К МЕТАБОЛИТАМ *GAEUMANNOMYCES GRAMINIS VAR. TRITICI*

М. А. Зинченко, О. В. Дубровная, А. В. Бавол

Институт физиологии растений и генетики Национальной Академии Наук Украины, Киев

Исследованы цитогенетические особенности устойчивых и неустойчивых каллюсных культур мягкой пшеницы к метаболитам офиоболёзной корневой гнили в условиях осмотического стресса. Установлено, что высокие концентрации стрессового фактора имеют выраженный кластогенный эффект и вызывают турбагенные нарушения в клетках неустойчивых каллюсов. Устойчивые к метаболитам возбудителя офиоболёза каллюсные линии характеризуются достоверно меньшим количеством цитологических нарушений.

MANNITOL CYTOGENETIC EFFECTS ON CALLUS LINES OF BREAD WHEAT RESISTANT AND UNRESISTANT TO *GAEUMANNOMYCES GRAMINIS VAR. TRITICI*

M. O.Zinchenko, O. V. Dubrovna, A. V. Baval

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

The result of the study highlights the effect of different concentrations of mannitol on callus lines of bread wheat, which are resistant and unresistant to the pathogen metabolites of ophiobolus root rot. It was founded that high concentrations of stress factors have a significant clastogene effect and cause turbagene disturbances in unresistant callus cells. Resistant to the pathogen ophiobolus metabolites callus lines are characterized by significantly fewer cytologic violations.

Key words: *Triticum aestivum* L., callus cultures, mannitol, cytologic analysis