

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

За використання IRAP-методу проаналізовано рівень поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими LTR повторами ретротранспозону *Cassandra*, у клітинних ліній пшениці, резистентних до метаболітів збудника офіобольозу, в процесі добору на стійкість до осмотичного стресу та індукованих з них рослин-регенерантів. Виявлено відмінності у полінуклеотидних послідовностях ДНК за прямої та ступінчастої клітинної селекції. Оцінка рівня генетичної дивергенції показала, що калюси, отримані за прямої селекції, а також калюси на пізніх етапах ступінчастого добору є найбільш генетично віддаленими від вихідних форм ($D_{NL} = 0,4855$), тобто за сублетальної дії селективного чинника спостерігаються найзначніші зміни в геномі досліджуваних об'єктів. На відміну від вихідних форм в спектрах продуктів ампліфікації ДНК калюсів та регенерантів виявлено новий амплікон довжиною близько 638 п.н., що може свідчити про активацію ретротранспозону *Cassandra*.

Ключові слова: RAP-аналіз, ретротранспозони, клітинна селекція, офіобольоз.

Вступ. Вивчення соматональної мінливості становить інтерес як для фундаментальних досліджень, так і для практичної селекції, оскільки соматокліони 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 соматональних варіацій у селективних умовах. Для підвищення ефективності селекції *in vitro* та вирішення проблеми керування соматональною варіабельністю важливо зрозуміти причини її виникнення і розмах. Для цього все ширше використовують молекулярні маркери, що дозволяють виявити генетичні зміни у клітинних формах та індукованих з них рослин. Одним з найбільш доступних і швидких способів виявити варіабельність, а по-

тім з'ясувати природу соматональної мінливості є застосування молекулярно-генетичних маркерів, що ґрунтуються на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) [1–3].

Для виявлення змін в полінуклеотидних послідовностях ДНК того чи іншого виду важливо вибрати такий метод, який би забезпечував одночасний аналіз багатьох локусів в різних ділянках геному. З врахуванням цього значний інтерес викликають ретротранспозони, які широко представлені в геномах злакових культур, зокрема пшениці. Накопичені дані про мобільні генетичні елементи дозволили розробити способи оцінки поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими повторами, зокрема термінальних ділянок ретротранспозонів [4, 5]. В літературі описана можливість використання праймерів, специфічних до LTR послідовностей ретротранспозонів, для виявлення поліморфізму між досліджуваними формами за допомогою ПЛР-фінгерпринту на основі методів IRAP і REMAP [5–9].

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 вбудування ретротранспозонів в іншу ділянку ДНК. Ефективність використання IRAP-методу показана і для аналізу рослин-регенерантів пшениці [10, 11].

Нами вперше методом клітинної селекції одержано калюсні лінії пшениці з перехресною стійкістю до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі та водного дефіциту [12]. З цих ліній індуковано рослини-регене-

ранти. Відомо, що культивування *in vitro* може бути потужним стресовим чинником [13, 14] та здатне викликати активацію мобільних генетичних елементів [15, 16], що може призводити до виникнення мутацій або зміни рівня експресії інших генів [17]. Разом з тим встановлено підвищення активності ретротранспозонів за умов біотичного/абіотичного стресу (пораження, дія патогенів, присутність різних речовин) [15, 18, 19] та доведено їх транскрипційну активність [20]. Підвищення активності ретротранспозонів за дії стресів свідчить про значну роль цих елементів у формуванні відповіді на дію стресових чинників. Таким чином, у процесі добору стійких форм за клітинної селекції може виникати генетична мінливість, пов'язана як з умовами культивування, так і з дією стресового чинника. Однак на сьогоднішні дані про мінливість на молекулярно-генетичному рівні за дії різних стресових чинників і, зокрема, осмотичного стресу недостатньо. У зв'язку з цим метою нашої роботи був аналіз рівня поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими повторами LTR ретротранспозону *Cassandra*, у клітинних ліній, резистентних до метаболітів збудника офіобольозу (*G. graminis* var. *tritici*), в процесі добору на стійкість до осмотичного стресу та індукованих з них рослин-регенерантів за використання IRAP-методу.

Матеріали і методи. У даній роботі вивчали: 1) вихідний матеріал – рослини R₂ соматоклональної лінії, стійкої до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі (10 індивідуальних рослин: P1–P10); 2) первинний калюс, отриманий з рослин R₂ соматоклональної лінії (10 зразків: FC1–FC10); 3) калюси різних пасажів за ступінчастої клітинної селекції на стійкість до водного дефіциту – першого (SS 1p), третього (SS 3p), четвертого (SS 4p) та шостого (SS 6p); 4) калюси різних пасажів за прямої клітинної селекції на стійкість до водного дефіциту – першого (DS 1p) та четвертого (DS 4p); 5) калюси четвертого (C 4p – 5 зразків) та шостого (C 6p – 5 зразків) пасажів, що культивувалися на середовищі без селективного чинника; 6) рослини-регенеранти RR₀, індуковані із стійких клітинних ліній (5 зразків: R1–R5).

Індукцію калюсогенезу та культивування калюсів проводили за розробленою нами методи-

кою [21]. Як експлант використовували верхівку пагона тридобового проростка. Вихідний калюс розділяли на дві частини. Одна частина була використана для проведення клітинної селекції на стійкість до водного дефіциту, друга – пасажувалася на культуральному середовищі без селективного чинника (контроль).

Для клітинної селекції як вихідний матеріал використовували одну з отриманих ними ліній пшениці сорту Зимоярка, стійку до метаболітів *G. graminis* var. *tritici* [22]. При моделюванні водного дефіциту селективним агентом слугував маніт у різних концентраціях, який додавали до модифікованого середовища МС. Умови проведення експериментів та схеми прямої та ступінчастої клітинної селекції наведено у роботі [12].

Екстракцію ДНК проводили за допомогою СТАВ-методу [23] із проростків, листків рослин-регенерантів або безпосередньо калюсної тканини. Концентрацію та чистоту ДНК визначали спектрофотометрично.

Ампліфікацію здійснювали на приладі «Терцик» («ДНК-Технологія», РФ). Кінцевий об'єм реакційної суміші складав 25 мкл: 10 мМ трис-НСl, 50 мМ КСl, 1,5–2,0 мМ хлориду магнію, 2 мМ кожного дезоксинуклеотидтрифосфату (dNTP), 0,2 мкл праймера, 1 од. акт. Таq ДНК-полімерази та 100–120 нг досліджуваної ДНК. До реакційної суміші для уникнення випаровування додавали по 20 мкл мінеральної олії. Ампліфікація проводилася за наступною програмою: початкова денатурація при 94 °С – 5 хв; 37 циклів (денатурація 94 °С – 30 с, відпал 55 °С – 1 хв, елонгація 72 °С – 1,5 хв) та фінальна елонгація 72 °С – 7 хв.

В дослідженнях використовували IRAP-праймери до інвертованих LTR ділянок: 5'-GGTGTGTCCGGGGCGTTACA-3' та 5'-CCGGGAGCCCATTCGAAC-3', що показали свою ефективність при аналізі злакових культур, зокрема ячменю [24]. Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу в 2%-вому агарозному гелі з додаванням бромистого етидію. Розділення здійснювали за напруги 2 В/см в трисацетатному буфері. Електрофоретичні спектри візуалізували під УФ променями. Для оцінки розмірів продуктів ампліфікації використовували маркер Step Ladder DNA S7025 («Sigma-Aldrich», США).

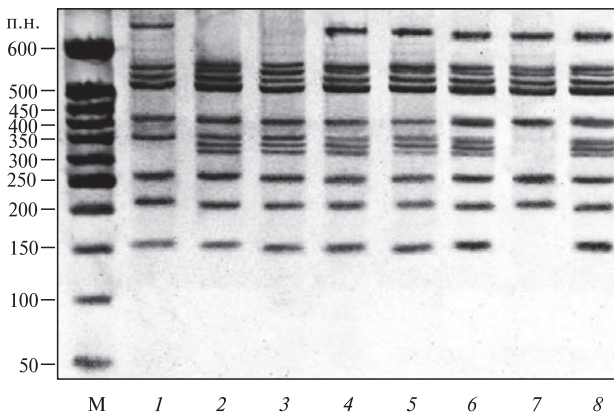


Рис. 1. Спектр продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків за ступінчастої клітинної селекції: М – маркер молекулярних мас (Step Ladder DNA S7025); 1 – рослина-регенерант (R4); 2 – рослина R₂ соматоклональної лінії, стійкої до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі (P3); 3 – первинний калюс (FC); 4 – калюс 1-го пасажу на середовищі з 0,4 М маніту (SS 1р); 5 – калюс 3-го пасажу на середовищі з 0,8 М маніту (SS 3р); 6 – калюс 4-го пасажу на середовищі без селективного чинника (SS 4р); 7 – калюс 6-го пасажу на середовищі з 0,8 М маніту (SS 6р); 8 – калюс 6-го пасажу, що культивувався на середовищі без селективного чинника (С 6р)

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 відповідала значенням 1 або 0. Генетичні відстані вираховували, користуючись мірою подібності згідно з Nei et al. [25]. Побудову дендрограми здійснювали методом попарного незваженого кластерування з арифметичним усередненням (UPGMA), використовуючи пакети прикладних програм POPGEN v.1.31 [26] та MEGA v.3.1 [27]. Ампліфікацію для перевірки стабільності синтезу ампліконів трикратно повторювали на тому ж рослинному матеріалі.

Результати досліджень та їх обговорення. На першому етапі дослідження важливо було переконатися у генетичній гомогенності контрольних рослин за досліджуваними локусами. Для цього аналізували зразки ДНК десяти довільних рослин R₂ соматоклональної лінії,

стійкої до метаболітів збудника офіобольозу. Загалом у вихідних рослин спектр продуктів ампліфікації ДНК складався з 11 фрагментів розміром від 154 до 581 п.н. Аналогічні спектри продуктів ампліфікації спостерігали і у первинних калюсах (нульовий пасаж). Отримані дані свідчать, що у вихідному матеріалі (вихідних рослинах та первинних калюсах) відсутній природний та/або спонтанний поліморфізм за досліджуваними локусами.

Оскільки за відносно тривалої (поступової) адаптації до стресового чинника (ступінчаста клітинна селекція) та відносно швидкого екстремального впливу (пряма клітинна селекція) можуть бути задіяні різні механізми формування стійкості, то в нашій роботі ми окремо досліджували поліморфізм ДНК за різних схем добору. Такий підхід сприяє комплексному уявленню про мінливість за дії осмотичного стресу в процесі добору стійких ліній.

Для виявлення поліморфізму ДНК за ступінчастої клітинної селекції відбирали зразки калюсів на ранніх та пізніх етапах добору. Контролем слугував первинний калюс (FC) та калюс 6-го пасажу (С 6р), що паралельно культивувався на середовищі без селективного чинника. Отримані результати (рис. 1) свідчать про те, 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) зазначено відсутність амплікону довжиною 581 п.н. На більш пізніх етапах клітинної селекції (на середовищі з 0,8 М маніту, сублетальна доза) спостерігали ще більші зміни. Так, у лінії № 4 встановлено втрату ампліконів довжиною 154, 334, 347 та 362 п.н. (рис. 1, доріжка 7). Відсутність певних ампліконів в спектрах ампліфікації спостерігали і у рослин-регенерантів. Так, виявлено рослину, в якій були відсутні амплікони розміром 334 та 347 п.н. (рис. 1, доріжка 1).

Наступний етап досліджень – виявлення поліморфізму ДНК за прямої клітинної селекції. Для цього аналізували зразки ДНК калюсів на ранніх (1-й пасаж) та пізніх (4-й пасаж) етапах прямого добору. Показано, що при такому підході у спектрах продуктів ампліфікації (рис. 2) можуть відбуватися як втрати ампліконів, зокрема довжиною 221, 552 та 571 п.н.,

так і поява нового унікального амплікону розміром 455 п.н. Слід зазначити, що даний амплікон виявлено тільки у калюсних лініях, отриманих при застосуванні прямої клітинної селекції.

Крім специфічних змін у спектрах продуктів ампліфікації ДНК, які відбуваються за прямої та ступінчастої клітинної селекції, привертає увагу той факт, що при культивуванні *in vitro* (як в зразках на селективних середовищах, так і в контрольному калюсі, а також отриманих рослинах-регенерантах) у всіх досліджуваних об'єктах зазначено появу відносно високомолекулярного амплікону довжиною близько 638 п.н. (рис. 1 і 2). Це може свідчити про активацію і відповідно транспозицію ретротранспозону *Cassandra* за умов культивування *in vitro*.

Для оцінки генетичної дивергенції досліджуваних зразків значення генетичних відстаней розраховували згідно з Nei et al. [25] за 13 локусами (таблиця). На основі отриманих значень була складена дендрограма (рис. 3), де досліджені зразки згруповані в чотири окремих кластери. Перший і найбільший включає рослини-регенеранти R1–R3 та 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. У другий кластер увійшли зразки рослин R₂ соматоклональної 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 калюси, отримані за прямої клітинної селекції (IV кластер), а також калюс 6-го пасажу на середовищі з 0,8 М маніту (пізні етапи ступінчастої клітинної селекції) є найбільш генетично віддаленими від вихідних форм ($D_{NL} = 0,4855$), тобто за екстремального впливу селективного фактора спостерігаються найзначніші зміни в полінуклеотидних послідовностях ДНК, фланкованих інвертованими LTR повтори ретротранспозону *Cassandra*.

Існує думка, що в культурі *in vitro* клітини, в яких присутні активні мобільні генетичні еле-

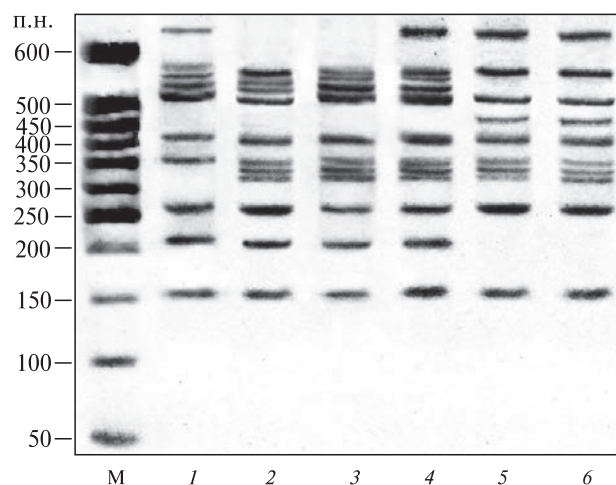


Рис. 2. Спектр продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків за прямої клітинної селекції: М – маркер молекулярних мас (Step Ladder DNA S7025); 1 – рослина-регенерант (R5); 2 – рослина R₂ соматоклональної лінії, стійкої до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі (P); 3 – первинний калюс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

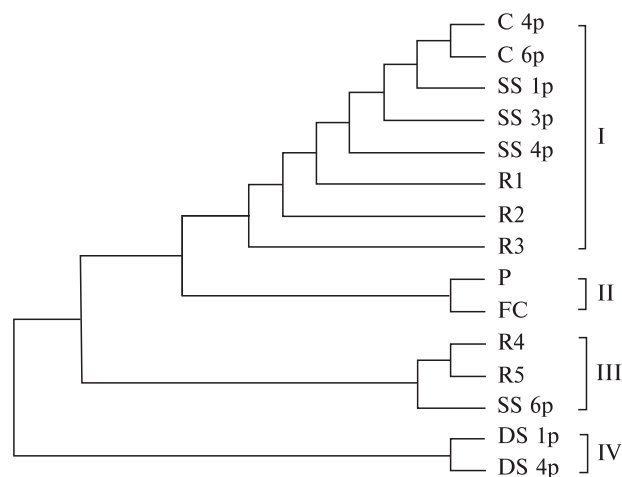


Рис. 3. Кластерний розподіл між досліджуваними зразками, побудований згідно з генетичними відстанями за даними аналізу 13 IRAP-локусів методом UPGMA

менти, генетично більш нестабільні, ніж ті, в яких ці ділянки геному не активні [28]. Згідно з отриманими даними ми припускаємо, що

Значення генетичних відстаней, визначених за Nei et al. [25], між досліджуваними зразками

Зразки	P	FC	C 4p	C 6p	DS 1p	DS 4p	SS 1p	SS 3p	SS 4p	SS 6p	R1	R2	R3	R4	R5
P	****														
FC	0,0000	****													
C 4p	0,0800	0,0800	****												
C 6p	0,0800	0,0800	0,0000	****											
DS 1p	0,4855	0,4855	0,3677	0,3677	****										
DS 4p	0,4855	0,4855	0,3677	0,3677	0,0000	****									
SS 1p	0,0800	0,0800	0,0000	0,0000	0,3677	0,3677	****								
SS 3p	0,0800	0,0800	0,0000	0,0000	0,3677	0,3677	0,0000	****							
SS 4p	0,0800	0,0800	0,0000	0,0000	0,3677	0,3677	0,0000	0,0000	****						
SS 6p	0,4855	0,4855	0,3677	0,3677	0,9555	0,9555	0,3677	0,3677	0,3677	****					
R1	0,0800	0,0800	0,0000	0,0000	0,3677	0,3677	0,0000	0,0000	0,0000	0,3677	****				
R2	0,0800	0,0800	0,0000	0,0000	0,3677	0,3677	0,0000	0,0000	0,0000	0,3677	0,0000	****			
R3	0,0800	0,0800	0,0000	0,0000	0,3677	0,3677	0,0000	0,0000	0,0000	0,3677	0,0000	0,0000	****		
R4	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	****	
R5	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. P – рослина R₅ соматлональної лінії, стійкої до метаболітів *G. graminis* var. *tritici* (вихідний генотип); FC – первинний калюс; C 4p – контрольний калюс 4-го пасажу; C 6p – контрольний калюс 6-го пасажу; DS 1p – калюс 1-го пасажу на середовищі з концентрацією маніту 0,8 М (пряма клітинна селекція); DS 4p – калюс 4-го пасажу на середовищі з концентрацією маніту 0,8 М (пряма клітинна селекція); SS 1p – калюс 1-го пасажу на середовищі з 0,4 М маніту (ступінчаста клітинна селекція); SS 3p – калюс 3-го пасажу на середовищі з 0,8 М маніту (ступінчаста клітинна селекція); SS 4p – калюс 4-го пасажу на середовищі без селективного чинника (ступінчаста клітинна селекція); SS 6p – калюс 6-го пасажу на середовищі з 0,8 М маніту (ступінчаста клітинна селекція); R1–R5 – рослини-регенеранти.

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. Продемонстровано також, що за клітинної селекції можуть відбуватися множинні точкові мутації або делеції, зокрема в сайтах зв'язування з праймерами до ретротранспозону *Cassandra*, які спричиняють зникнення окремих ампліконів в спектрах продуктів ПЛР.

Висновки. Таким чином, за використання IRAP-методу проаналізовано рівень поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими LTR повторами ретротранспозону *Cassandra*, у клітинних ліній пшениці, що резистентні до метаболітів збудника офіобольозу, в процесі добору на стійкість до осмотичного стресу та індукованих з них рослин-регенерантів. Виявлено, що залежно від використаної схеми клітинної селекції (пряма або ступінчаста) можуть виявлятися різні зміни геному. Оцінка рівня генетичної дивергенції за генетичними відстанями згідно з Nei et al. [25] показала, що за екстремального впливу селективного фактора спостерігаються найзначніші зміни в геномі досліджуваних об'єктів. Крім специфічних змін у спектрах продуктів ампліфікації ДНК, які відбуваються за прямої та ступінчастої клітинної селекції, у всіх досліджуваних об'єктах, за винятком вихідних форм, зазначено появу відносно високомолекулярного амплікону довжиною близько 638 п.н., що може свідчити про активацію ретротранспозону *Cassandra* за умов культивування *in vitro*.

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

Institute of Plant Physiology and Genetics
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
E-mail: bavol1@rambler.ru

MOLECULAR POLYMORPHISM OF CELLULAR LINES OF WHEAT, WITH RESISTANT TO METABOLITES OF *G. GRAMINIS* VAR. *TRITICI*, UNDER OSMOTIC STRESS

It was analyzed polymorphism of DNA loci, flanked by inverted repeats of LTR retrotransposon *Cassandra*, in cell lines of bread wheat, resistant to the metabolites of ophiobolus root rot (*G. graminis* var. *tritici*), under osmotic stress and induced from them plant-regenerants. The differences in the polynucleotide sequences of DNA at the direct and step cell selection it was identified. Assessment of

the level of genetic divergence showed that calluses obtained at the direct selection and calluses in the later stages of step selection were the most genetically distant from the original forms ($D_{NL} = 0,4855$), this means that at the sublethal doses of selective factors occur the most significant changes at the genome of the investigated objects. In contrast to the original form at the spectra of products DNA amplification of calluses and regenerated plants showed the emergence of bands approximately 638 bp length, which may indicate the activation of retrotransposon *Cassandra*.

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

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ, УСТОЙЧИВЫХ К МЕТАБОЛИТАМ ВОЗБУДИТЕЛЯ ОФИОБОЛЛЕЗА, ПРИ ДЕЙСТВИИ ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

При использовании IRAP-метода проанализирован уровень полиморфизма участков ДНК, фланкированных инвертированными LTR повторами ретротранспозона *Cassandra*, у клеточных линий пшеницы, устойчивых к метаболитам возбудителя офиоболлеза, в процессе отбора на устойчивость к осмотическому стрессу и индуцированных из них растений-регенерантов. Выявлены различия в полинуклеотидных последовательностях ДНК при прямой и ступенчатой клеточной селекции. Оценка уровня генетической дивергенции показала, что каллусы, полученные при прямой селекции, а также каллусы на поздних этапах ступенчатого отбора наиболее генетически удалены от исходных форм ($D_{NL} = 0,4855$), т.е. при действии сублетальной дозы селективного фактора наблюдаются наиболее значительные изменения в геноме исследуемых объектов. В отличие от исходных форм в спектрах продуктов амплификации ДНК каллусов и регенерантов отмечено появление амплікона длиной около 638 п.н., что может свидетельствовать об активации ретротранспозона *Cassandra*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. 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. – 23. – P. 241–249.
2. Козыренко М.М., Фисенко П.П., Артюкова Е.В. Анализ генетического разнообразия сортов и соматоклональных линий культурной сои (*Glicine max* (L.) Merr.) методом маркирования межмикросателлитных последовательностей (ISSR) // Биотехнология. – 2007. – № 1. – С. 3–13.
3. De Vienne D. Molecular markers in plant genetics and biotechnology. – Enfield, 2003. – 248 p.

4. 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.
5. Kalendar R., Schulman A.H. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting // *Nature Protocols.* – 2006. – **1**, № 5. – P. 2478–2484.
6. 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. Genom.* – 2003. – **269**. – P. 464–474.
7. Боронникова С.В., Календарь Р.Н. Использование IRAP-метода для анализа генетической изменчивости популяций ресурсных и редких видов растений // *Генетика.* – 2010. – **46**, № 1. – С. 44–50.
8. Цветков И.А., Иванов А.Н., Глазко В.И. Генетическая дифференциация сортов риса по IRAP-маркерам // *Изв. ТСХА.* – 2006. – № 4. – С. 155–159.
9. Žiarovská J., Ražná K., Senková S. et al. Variability of *Linum usitatissimum* L. based on molecular markers // *J. Agricult. and Biol. Sci.* – 2012. – **7**, № 1. – P. 50–58.
10. Созинова Л.Ф., Цветков И.Л., Сейтбатталова А.И. и др. Генетическая дифференциация растений-регенерантов мягкой пшеницы с помощью IRAP-маркеров // *С.-х. биология.* – 2008. – № 5. – С. 18–21.
11. Хатилина О.Н., Новаковская А.П., Райзер О.Б., Созинова Л.Ф. Генетическая дифференциация линий регенерантов мягкой пшеницы с помощью молекулярно-генетических маркеров // *Вестн. науки Казах. агротех. ун-та. Серия с.-х., ветеринар. и биол. наук.* – 2011. – № 1. – С. 37–45.
12. Зінченко М.О., Дубровна О.В., Бавол А.В. Селекція *in vitro* м'якої пшениці на комплексну стійкість до метаболітів збудника офіобольозу та водного дефіциту // *Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів.* – 2012. – **10**, № 1. – С. 28–36.
13. 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. – **64**. – P. 145–157.
14. Gaspar T., Franck T., Bisbis B. et al. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures // *Plant Growth Regul.* – 2002. – **37**. – P. 263–285.
15. Grandbastien M.-A. Activation of plant retrotransposons under stress conditions // *Trends Plant Sci.* – 1998. – **3**. – P. 181–187.
16. Bayram E., Yilmaz S., Hamat-Mecbur H. Nikita retrotransposon movements in callus cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Plant OMICS: J. Plant Mol. Biol. Omics.* – 2012. – **5**, № 3. – P. 211–217.
17. Todorovska E. Retrotransposons and their role in plant – genome evolution // *Biotechnol. and Bio-technol. Equip.* – 2007. – № 21. – P. 294–305.
18. Wessler S.R. Plant retrotransposones: turned on by stress // *Curr. Biol.* – 1996. – № 6. – P. 959–961.
19. Ikeda K., Nakayashiki H., Takagi M. et al. Heat shock, copper sulfate and oxidative stress activate the retrotransposon MAGGY resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea* // *Mol. Genet. Genom.* – 2001. – № 266. – P. 318–325.
20. Bonchev G., Georgiev S., Pearce S. Retrotransposons and ethyl methanesulfonate-induced diversity in hexaploid wheat and *Triticale* // *Cent. Eur. J. Biol.* – 2010. – **5**, № 6. – P. 765–776.
21. Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці // *Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів.* – 2007. – **5**, № 1/2. – С. 3–10.
22. 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 культур. растений.* – 2009. – **41**, № 4. – С. 314–320.
23. Dellaport S.L., Wood J., Hicks J. A plant DNA mini-preparation: Version II [J] // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 1983. – **1**, № 14. – P. 19–21
24. Kalendar R., Tanskanen J., Chang W. et al. Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2008. – **105**, № 15. – P. 5833–5838.
25. Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1979. – **76**. – P. 5269–5273.
26. Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T. POPGENE version 1.31: Microsoft windows-based freeware for population genetic analysis / *Molecular Biology and Technology Center, University of Alberta.* – Edmonton, Canada, 1999. – 26 p.
27. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolution genetics analysis and sequences alignment // *Brief. Bioinform.* – 2004. – **5**. – P. 150–163.
28. Evrensel C., Yilmaz S., Temel A., Gozukirmizi N. Variations in BARE-1 insertion patterns in barley callus cultures // *Genet. Mol. Res.* – 2011. – **10**, № 2. – P. 980–987.

Надійшла 17.12.12