

## МЕХАНІЗМИ ВЗАЄМОДІЇ ТА ЕКСПРЕСІЇ ГЕНЕТИЧНИХ СИСТЕМ

БАВОЛ А.В., ДУБРОВНАЯ О.В., ЛЯЛЬКО И.И. ЗЛАЦКАЯ А.В.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины

Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: bavol1@rambler.ru

### ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОМА ПШЕНИЦЫ ПРИ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К КУЛЬТУРАЛЬНОМУ ФИЛЬТРАТУ *GAEUMANNOMYCES GRAMINIS VAR. TRITICI*

Биотехнологические методы культуры *in vitro* различных эксплантов (органов или частей органов, изолированных от донорного растения) в настоящее время широко используются для решения прикладных задач селекции сельскохозяйственных культур [1-3], и в частности, мягкой пшеницы [4,5]. Одним из направлений современной биотехнологии, которое уже получило практическое применение, является клеточная селекция, как метод создания новых форм растений путем выделения мутантных клеток и соматональных вариаций в селективных условиях. Устойчивость к болезням — одна из важных задач селекции, которую также пытаются решить с помощью культуры *in vitro* [6]. Возможность получения устойчивых форм при клеточной селекции обусловлена, прежде всего, соматональной изменчивостью, мутагенным действием рострегулирующих веществ питательной среды и веществ, которые входят в селективную среду, а также действием селективного фактора, направленного против выживания неустойчивых форм [7,8]. Методом клеточной селекции уже получены формы пшеницы, устойчивые к фузариозу [7-10], септориозу [11] и гельминтоспориозу [12-14]. Кроме того, показано, что метаболиты некротрофных фитопатогенов не только удобный инструмент для отбора устойчивых генотипов, но и могут быть источником изменчивости, увеличивая частоту и расширяя спектр генетических изменений [7,8, 15-17].

Офиоболлезная корневая гниль, возбудителем которой является *Gaeumannomyces graminis var. tritici* — одна из наиболее вредоносных болезней пшеницы. В ряде стран офиоболлез может быть основной причиной снижения продуктивности зерновых, в том числе и в Украине. Поскольку генетических источников устойчивости к патогену мало, целесообразно использовать методы клеточной селекции для ускоренного получения толерантных форм.

Следует отметить, что цитологические и молекулярно-генетические особенности каллусных культур мягкой пшеницы при клеточной селекции изучены недостаточно. Вместе с тем, данное исследование позволяет выявить специфические генетические механизмы, которые обуславливают изменчивость в процессе отбора и получения устойчивых форм. Такие исследования способствуют более эффективному использованию биотехнологических приемов для решения генетико-селекционных задач у пшеницы.

В связи с этим, целью настоящей работы было изучение особенностей изменчивости генома на хромосомном и молекулярном уровне каллусных культур пшеницы в процессе клеточной селекции на устойчивость к культуральному фильтрату (КФ) *Gaeumannomyces graminis var. tritici*.

#### Материалы и методы

Работы по клеточной селекции проводились на сорте-двуручке мягкой пшеницы Зимоярка, созданным в Институте физиологии и генетики НАН Украины. Для отбора каллусных линий, устойчивых к метаболитам *G. graminis var. tritici*, использовали прямую клеточную селекцию [16]. В качестве селективного агента применяли КФ фитопатогена, который получали при выращивании высоковирулентных штаммов гриба на жидкой питательной среде Чапека.

Для установления генетической структуры клеточных популяций каллусов в процессе культивирования на контрольной и селективной средах, исследовались клетки

на стадии метафазы. Частоту и спектр хромосомных aberrаций изучали анафазным методом. Анализировали 70-100 метафазных пластинок и клеток на стадиях ана- и телофаз в каждом варианте опыта. Цитогенетический анализ каллусных культур проводили в период наибольшей митотической активности на 5-7 сутки культивирования в 1,3,5 и 7 пассажах.

Экстракцию ДНК проводили с помощью СТАВ-метода [18]. Для исследования уровня полиморфизма ДНК использовали ISSR-анализ, который выполняли по методике амплификации с температурой отжига 50°C [19]. Разделение продуктов амплификации осуществляли в 1,4 % агарозном геле, с последующей визуализацией продуктов амплификации в ультрафиолетовом свете с применением бромистого этидия. Длину продуктов ПЦР определяли с помощью пакета прикладных программ TotalLab v.2.01 (Nonlinear Dynamics). В работе использовали 34 произвольных ISSR-прайма, 3 ди-, три-, тетра- и пентануклеотидными мотивами [20].

### Результаты и обсуждение

Клеточную селекцию проводили по разработанной нами схеме [16]. В результате были отобраны штаммы, которые сохраняли способность к росту на селективной среде. От этих штаммов получено 7 устойчивых линий, которые имели прирост биомассы в селективных условиях, 4 из которых сохраняли морфогенетический потенциал.

Цитогенетический анализ каллусных культур показал высокую степень гетерогенности и наличие значительных отличий в характере протекания цитологических процессов между каллусами, выращиваемых на контрольной и селективной средах. Если в контрольных каллусах первые полиплоидные метафазы были выявлены на 5-ые сутки выращивания, то после перенесения на селективную среду такие метафазы наблюдали, начиная уже с 2-х суток культивирования. Анализ числа хромосом в каллусных клетках разных штаммов, исследовавшихся на протяжении семи пассажей, свидетельствует о сходстве цитогенетических процессов, происходящих у них. Так, в каллусах первого пассажа отмечалось достоверное увеличение числа полиплоидных клеток до 26,1±4,1%, в то же время в контроле этот показатель составлял 12,6±3,3% (табл. 1). Появление полиплоидных клеток связано с образованием реституционных ядер в ранней анафазе за счет нарушения веретена деления и, как следствие этого, нерасхождение хромосом к полюсам. Выявлены отдельные клетки с большим числом хромосом, которые, в дальнейшем, очевидно, не делятся.

Таблица 1

Распределение по числу наборов хромосом в клетках каллусных культур пшеницы в процессе культивирования на контрольной и селективной средах, %  
(на примере линии № 2)

Вариант опыта	Уровень ploидности	Пассаж			
		1	3	5	7
Контроль	3x	1,0±0,7	1,1±0,6	-	2,2±0,9
	6x	80,6±5,2	67,8±5,1	48,4±4,5	48,9±4,4
	12x	12,6±3,3	25,6±3,5	42,9±4,3	40±4,0
	анеуплоиды	5,8±2,4	5,6±1,4	8,8±2,1	8,9±2,2
Селективная среда	3x	-	-	1,2±1,0	-
	6x	58,7±5,4	54±5,3	47,6±5,1	45,9±2,4
	12x	26,1±4,1	34,5±4,4	39,3±4,1	45,9±2,9
	анеуплоиды	15,2±3,9	11,5±3,3	9,5±2,8	8,2±2,8

Одновременно с полиплоидизацией наблюдалось достоверное увеличение количества анеуплоидных клеток до 15,2±3,9% в сравнении с 5,8±2,4 % в контроле. Это явление связано с потерей хромосом в процессе митозе и часто сопровождается наличием в клетке микроядер. В целом, популяции клеток контрольного и

культивированного на селективной среде каллусов достаточно гетерогенны по числу хромосом, количество которых в клетках составляло от 7 до 84 и более. Выявлены двух- и трехядерные клетки, а также клетки с фрагментированными ядрами.

В анафазах отмечены хромосомные и хроматидные мосты, единичные и парные фрагменты, что свидетельствует о наличии мутационного процесса, который вызывает нарушение целостности хромосом. В первом пассаже количество клеток с абберациями в контрольном каллусе было на уровне  $2,9 \pm 1,7\%$ , в то же время в каллусах, культивированных на селективной среде, отмечено достоверное увеличение их числа до  $13,33 \pm 2,4\%$  (табл. 2). У контрольных каллусов в спектре аббераций присутствовали только мосты (66,7%) и фрагменты (33,3%).

Таблица 2

Частота аббераций хромосом в каллусах пшеницы, %  
(на примере линии №2)

Варианты опыта	Пассаж			
	1	3	5	7
Контроль	$2,94 \pm 1,7^*$	$4,34 \pm 0,3^*$	$4,44 \pm 0,3$	$5,33 \pm 0,4$
Селективная среда	$13,33 \pm 2,4^*$	$9,18 \pm 1,7^*$	$5,56 \pm 0,8$	$6,85 \pm 0,7$

\* Отличия достоверны при  $P_{0,05}$

В третьем пассаже в каллусах, культивированных на селективной среде, наблюдалось дальнейшее увеличение числа полиплоидных клеток до  $34,5 \pm 4,4\%$ , в то же время количество анеуплоидных клеток достигало  $11,5 \pm 3,3\%$ , что достоверно не отличалось от контроля. Количество клеток с абберациями снизилось до  $9,18 \pm 1,7\%$ , что может быть связано с адаптацией к условиям культивирования и/или с элиминацией поврежденных клеток. В пятом пассаже количество полиплоидных клеток в каллусах, которые выращивались на разных средах, достоверно не отличалось и составляло  $\approx 40\%$ , частота появления клеток с хромосомными абберациями практически не менялась. Подавляющее число аббераций выявляется в виде хроматидных мостов, что свидетельствует о сохранении в клеточных поколениях дицентрических хромосом в результате цикла “разрыв-слияние-мост”. Определенная стабилизация уровня хромосомных перестроек в каллусных культурах может указывать на то, что произошел отбор клеточной популяции, приспособленной к росту на селективной среде. В клетках седьмого пассажа частота и спектр хромосомных перестроек практически не изменялись. Не выявлено достоверных отличий и по уровню плоидности клеток.

Известно, что при селекции *in vitro* генетические изменения в клетках происходят не только на цитологическом, но и на молекулярном уровне. [21,22]. Поэтому, чтобы выявить такие изменения, мы исследовали полиморфизм в спектрах продуктов амплификации ДНК исходного каллуса, устойчивых каллусных линий и каллусов, которые не подвергались влиянию селективного фактора методом ISSR-ПЦР [20]. Показано высокую надежность и информативность данного метода для анализа устойчивых клеточных линий пшеницы. Наиболее эффективными оказались праймеры с динуклеотидными мотивами (GA)<sub>n</sub>, (AC)<sub>n</sub>, (TG)<sub>n</sub> и (AG)<sub>n</sub>.

У устойчивых каллусов выявлены специфические изменения в нуклеотидных последовательностях ДНК. Установлено, что все устойчивые клеточные линии отличаются от исходного каллуса и каллуса, который не подвергался действию селективного фактора, наличием специфических ампликонов длиной 2347 пн (праймер 5'-TCTCTCTCTCTCTCTCG-3') и 1745 пн (праймер 5'-AGAGAGAGAGAGAGAGTC-3') (рис. 1), а также отсутствием ампликона длиной 1108 пн (праймер 5'-ACACACACACACACACC-3').

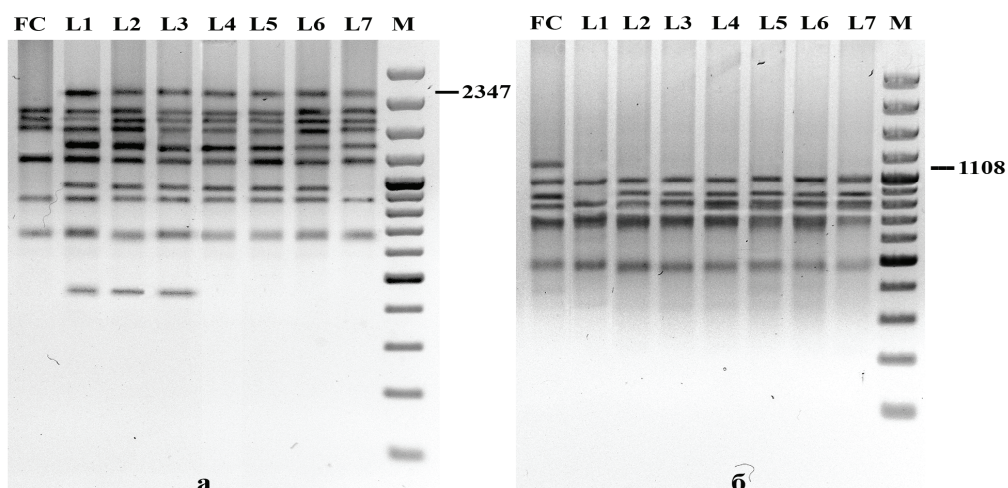


Рис. 1. Спектры продуктов амплификации ДНК: а - праймер 5'-AGAGAGAGAGAGAGAGTC-3'; б - праймер 5'-ACACACACACACACACC-3'. FC- исходный каллус; L1-L7 – каллусные линии, устойчивые к КФ *G. graminis var. tritici*, М - маркер молекулярных масс (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder). С правой стороны отмечен размер специфических ампликонов, пн

В ходе исследований для сравнения устойчивых каллусов и каллусов, на которые не действовали КФ, рассчитывали значения генетических дистанций ( $D_j$ ) по Жаккарду по 227 локусам. В соответствии с полученными данными была составлена дендрограмма, на которой выделялись два четко отличимых кластера. Первый - полностью сопоставим с группой линий, полученных нами путем клеточной селекции, а второй – с группой каллусов, не подвергавшихся действию селективного фактора. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при клеточной селекции генетические изменения, возникающие в культуре *in vitro*, носят направленный характер.

Наличие/отсутствие определенных ампликонов у всех устойчивых линий (при условии наличия/отсутствия этих фрагментов у исходного каллуса и каллусов, которые не подвергались действию КФ) может свидетельствовать о их непосредственной связи с признаком устойчивости. Именно такие ампликоны, потенциально могут быть использованы как маркеры устойчивости.

#### Выводы

Показано что в каллусах, подвергавшихся влиянию селективного фактора, на начальных этапах клеточной селекции отмечалось достоверное увеличение числа полиплоидных и анеуплоидных клеток в сравнении с контролем, а также значительное увеличение числа клеток с абберациями. Устойчивые к культуральному фильтрату *Gaeumannomyces graminis var. tritici* клеточные линии пшеницы характеризуются наличием специфических изменений в нуклеотидных последовательностях ДНК. Установлено, что все устойчивые клеточные линии отличаются от исходного каллуса и каллуса, который не подвергся действию селективного фактора, наличием специфических ампликонов длиной 2347 пн (праймер 5'-TCTCTCTCTCTCTCG-3') и 1745 пн (праймер 5'-AGAGAGAGAGAGAGTC-3'), а также отсутствием ампликона длиной 1108 пн (праймер 5'-ACACACACACACACACC-3').

#### Литература

1. Атанасов А.А. Биотехнология в растениеводстве. Новосибирск: Наука, 1993. - 242 с.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
3. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений. СПб.: Изд-во Санкт-Петербургск. ун-та, 2003. 227 с.

4. Рахимбаев И.Р., Тивари Ш., Бишимбаева Н.К., Кушнаренко С.В. Биотехнология зерновых культур. Алма-Ата: Гылым, 1992. 240 с.
5. Анапияев Б.Б. Культура микроспор и гаплоидная биотехнология пшеницы. Алматы: Гылым, 2001. 220 с.
6. Волощук С. И., Волощук Г. Д., Гурко В. С. Створення вихідного матеріалу озимої пшениці, стійкого до грибних патогенів методами клітинної селекції // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть – К: Логос. – 2001. – Т. 1, № 4. – С. 610 – 614.
7. Волощук С.И. Клітинна селекція пшениці на стійкість до *Fusarium graminearum* Schwabe // Дис. на здобуття наук. ст. канд. с.-г. наук. К.: Ін-т агроєкології УААН, 2006. -249 с.
8. Lu W., Zhou M., Zhang X. Studies and improvement of wheat breeding for scab resistance using biotechnology // Wheat improvement for Scab resistance: Proc. Intern. Symp.- 5- 11 May 2000.- Sunghou and Nanjing, China, 2000.- P.151-156.
9. Ahmed, K.Z., Mesterházy, Á., Bartók, T., Sági, F. In vitro techniques for selecting wheat (*Triticum aestivum* L.) for Fusarium-resistance. II. Culture filtrate technique and inheritance of Fusarium-resistance in the somaclones // Euphytica .- 1996.- v.91, №3 .- P. 341-349.
10. Клечковская Е., Игнатова С., Слепченко А. Селекция in vitro генотипов пшеницы с комплексной устойчивостью к фузариозу злаков // Биология клеток растений in vitro, биотехнология и сохранение генофонда: Тез. Докл. VII междунар. Конф. 25-28 ноября 1997 г. Москва, Россия. –Москва, 1997. –С. 372.
11. Джос Л., Калашишникова Е.А. Клеточная селекция пшеницы на устойчивость к септориозу // Сельскохозяйственная биотехнология.- Избранные работы / Под ред. Шевелухи В.С. – М.: Евразия +, 2000.- С. 61-71.
12. De Cristaldo R., De Carvalho F., Barbieri R., Kohli M., Dornelles C., Handel C., Bered, F. Response of different subcultures of wheat callus to toxic filtrates of *Helminthosporium sativum* // J. of Genetics and Breeding.-1997.-v. 51, N1.- P. 39-43.
13. Shawla H., Wenzel G. In vitro selection of barley and wheat for resistance against *Helminthosporium sativum* // Theor. and Appl. Genet. -1987. – Vol. 74. –P. 841-845.
14. Shawla H. S., Wenzel G. Resistant wheat plants against *Helminthosporium sativum* from embryo derived callus cultures // Wheat Inf. Serv. -1989. –Vol. 69, N1.-P.8-12.
15. Губанова Н. Я., Дубровная О. В., Чугункова Т. В. Отбор и цитологический анализ устойчивых к токсину *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* клеточных линий кормовой свеклы и регенерантов из них // Цитология и генетика, – 1999. -33-№4. -С. 9-15.
16. Бавол А. В., Дубровна О.В, Лялько І.І. Добір та цитологічний аналіз стійких до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* клітинних ліній пшениці та регенерантів з них // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів -2008. - 6, №2 –С.191-200.
17. Дубровна О.В. Спектр аберацій хромосом в клітинних популяціях калюсних культур кормових буряків при відборі на стійкість до токсину збудника бактеріозу // Физиология и биохимия культ. растений.- 2003.- Т. 34, № 3.- С. 241-247.
18. 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.
19. Roder M.S., Korzun V., Wendehake K. et al. A microsatellite map of wheat // Genetics. – 1998. – 149. – P. 2007-2023.
20. Бавол А. В., Злацька А. В. Поліморфізм ДНК калюсних ліній пшениці, стійких до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, за використання ISSR-методу // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. –том 41, №1.–С. 69-74.
21. Priya R., Khimani A., Subramanian R. Characterization of Fusarium Wilt Resistant and Susceptible Varieties of ginger (*Zingiber officinale*) through Random Amplified Polymorphic DNA Markers // Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, -2007. -№1. - P. 87-95.

22. Zheng, X., Wolff D. Randomly Amplified polymorphic DNA Markers Linked to Fusarium Wilt Resistance in Diverse Melons // Hort. Sci. -2000. – 35, №4.- P. 716-721.

#### **Резюме**

Проведен цитогенетический и молекулярно-генетический анализ култусных культур при клеточной селекции на устойчивость к культуральному фильтрату *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. Показано что в каллусах, подвергавшихся влиянию селективного фактора, на начальных этапах клеточной селекции, отмечалось достоверное увеличение числа полиплоидных и анеуплоидных клеток в сравнении с контролем, а также значительное увеличение числа клеток с абберациями. Выявлено, что при действии культурального фильтрата генетические изменения на молекулярном уровне, которые возникают в культуре *in vitro*, носят направленный характер. Установлено, что все устойчивые клеточные линии отличаются от исходного каллуса и каллуса, который не подвергался действию селективного фактора, наличием специфических ампликонов длиной 2347 пн (праймер 5'-TCTCTCTCTCTCTCTCG-3') и 1745 пн (праймер 5'-AGAGAGAGAGAGAGAGTTC-3'), а также отсутствием ампликона длиной 1108 пн (праймер 5'-ACACACACACACACACC-3').

Проведено цитогенетичний та молекулярно-генетичний аналіз калюсних культур за клітинної селекції на стійкість до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. Показано, що у калюсах, які зазнавали дії селективного чинника, на початкових етапах клітинної селекції спостерігалось достовірне збільшення числа поліплоїдних та анеуплоїдних клітин порівняно з контролем, а також значне підвищення числа клітин з абераціями. Виявлено, що за дії культурального фільтрату генетичні зміни на молекулярному рівні, що виникають в культурі *in vitro*, носять спрямований характер. Встановлено, що всі стійкі клітинні лінії відрізнялись від вихідного калюсу та калюсу, який не зазнавав дії селективного чинника наявністю специфічних ампліконів довжиною 2347 пн (праймер 5'-TCTCTCTCTCTCTCTCG-3') та 1745 пн (праймер 5'-AGAGAGAGAGAGAGAGTTC-3'), а також відсутністю амплікону довжиною 1108 пн (праймер 5'-ACACACACACACACACC-3').

The cytogenetical and molecular peculiarities of callus culture in cultivation on the selective medium where studied. On the initial stages of cellular selection in calluses, which were cultivated on the selective medium, has been revealed increase in number of polyploidy and aneuploidy cells and cells with different aberrations. Specific changes in sequence of DNA were revealed in resistant calluses. It was established, that all resistant cellular lines differ from initial callus and callus which was not treated to action of the selective factor by the presence of specific amplicons in the length 2347 bp (primer 5'-TCTCTCTCTCTCTCTCG-3') and 1745 bp (primer 5'-AGAGAGAGAGAGAGAGTTC-3'), and also absence by the amplicon in the length 1108 bp (primer 5'-ACACACACACACACACC-3').

#### **ВЛАСЕНКО В.А.**

Мироніський інститут пшениці імені В.М. Ремесла УААН,  
Україна, 08853, Київська обл., Миронівський р-н, с. Центральне,  
e-mail:vlaskenkova@ukr.net

#### **ОСОБЛИВОСТІ ГЕНОМ-ПЛАЗМОННОГО ВПЛИВУ НА МІНЛИВІСТЬ ВИСОТИ РОСЛИН У АЛОПЛАЗМАТИЧНИХ ФОРМ ТА ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ**

При розробці теорії віддаленої гібридизації Г.Д. Карпеченко [1] звернув увагу на роль цитоплазми, припускаючи її різноманітність у різних форм одного виду. У багатьох дослідженнях з пшеницею та спорідненими видами виявлено вплив цитоплазми на