

res118, res129, res130 за локусом *Xcfd223*, а за локусом *Xcfd55* рослини лінії є гетерозиготами; res127 за локусами *Xcfd152*, *Xcfd141* та гетерозигота за локусом *Xcfd55*; res121 за локусом *Xcfd141* та гетерозигота за локусом *Xcfd55*; res131, res132 за локусом *Xcfd141* та гетерозигота за локусом *Xcfd55*, res132 відрізняється від генотипу Аврори за локусом *Xcfd64*; res134 є стійкою гетерозиготою за локусом *Xcfd55* та відрізняється від генотипу Аврори за локусом *Xcfd64*; res135 відрізняється від генотипу Аврори за локусом *Xcfd64*; res138, res139, res140, res146 є стійкими гетерозиготами за локусом *Xcfd55*.

До ліній другого типу, електрофоретичний спектр продуктів ампліфікації в яких не відрізняється від спектру Аврори за всіма мікросателітними локусами, відносяться лінії res141, res142, res143, res144, res145, res148.

Якщо стійка лінія має певний мікросателітний локус за спектром ампліфікації, характерним для генотипу Аврора, а не генотипу Аврозис, вона може використовуватися у якості донора гена стійкості при схрещуванні з такими генотипами м'якої пшениці, які за спектром ампліконів того самого мікросателітного локусу відрізняються від генотипу Аврора. У попередньому дослідженні нами було виявлено низку генотипів сучасних сортів м'якої пшениці, які можуть слугувати реципієнтами при схрещуванні з дослідженими інтрогресивними лініями при створенні популяцій для роботи із ними методом BSA.

#### Література

1. *Randhawal H.S. et al.* Rapid and targeted introgression of genes into popular wheat cultivars using marker-assisted background selection // PLoS ONE. www.plosone.org. 1 June 2009.— V.4, Issue 6.— e5752.
2. *McIntosh R.A. et al.* Catalogue of gene symbols for wheat. <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>.
3. *Vdovychenko Zh.V., Antonyuk M.Z., Ternovskaya T.K.* Genetic analysis of the *T. aestivum* / *Ae. sharonensis* introgressive lines of common wheat for resistance to powdery mildew // Cytology and Genetics, 2005, 39, p. 21–30.

#### Резюме

Оцінено поліморфізм за мікросателітними локусами, локалізованими на хромосомі 3D м'якої пшениці, у інтрогресивних ліній *T. aestivum/Ae. sharonensis* у порівнянні з генотипами Аврора, Аврозис та 11 сучасних сортів м'якої пшениці. Виявлено лінії, які можна використовувати як джерело гену *Pm* у комбінаціях схрещування з певними генотипами при застосуванні методу BSA.

Оценен полиморфизм по микросателлитным локусам, локализованным на хромосоме 3D пшеницы, у интрогрессивных линий *T. aestivum/Ae. sharonensis* по сравнению с генотипами Аврора, Аврозис и 11 современных сортов мягкой пшеницы. Виявлены линии, которые могут служить источником гена *Pm* в комбинациях скрещивания с определенными генотипами при использовании метода BSA.

The polymorphism between *T. aestivum/Ae. sharonensis* introgression lines and Aurora, Aurosis and 11 modern common wheat cultivars in microsatellite loci, located on 3D chromosome of common wheat, has been estimated. The lines that could be used as *Pm* gene donors in crossing combinations with some genotypes are revealed.

**БУБЛИК О.М., АНДРЕЄВ І.О., СПІРІДОНОВА К.В., КУНАХ В.А.**

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Акад.  
Заболотного, 150, м. Київ, 03680, Україна, e-mail: kunakh@imbg.org.ua*

## **МІНЛИВІСТЬ МІЖМІКРОСАТЕЛІТНИХ ДІЛЯНОК ГЕНОМУ (ISSR) У КУЛЬТУРІ ТКАНИН *UNGERNIA VICTORIS***

Унгернія Віктора (*Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko, *Amaryllidaceae*) — рідкісний вид — ендемік Таджикистану і Узбекистану, ізохінолінові алкалоїди та біологічно активні полісахариди якого є цінними для фармакології. Проблему недостатності природної сировинної бази виду дозволяє вирішити створення калюсних культур-продуцентів БАР. До того ж, регенерацію із калюсних культур, яка забезпечує високий коефіцієнт розмноження, можна використати для прискореного розмноження та реінтродукції виду.

Було створено клітинні лінії культури тканин *U. victoris*, здатні до тривалого росту на агаризованих та в рідких живильних середовищах різного складу [1]. Використання цих ліній з метою збереження генофонду виду або як продуцентів БАР ставить питання про їхню генетичну стабільність. Раніше було проведено RAPD- та цитогенетичний аналізи створених ліній [2, 3]. Було встановлено, що окремі калюсні лінії, отримані із однієї цибулини, поряд із незначними молекулярно-генетичними відмінностями характеризуються міксоплоїдією, значним ступенем поліплоїдизації клітин (до 36n, при модальному класі 2n-4n) та дивергенцією за хромосомною структурою клітинних популяцій. Продовжуючи розпочаті дослідження, ми перейшли від аналізу анонімних ділянок геному (RAPD-маркери), до вивчення мінливості ділянок певного типу — міжмікросателітних послідовностей ДНК (ISSR-аналіз). Отримані дані дозволять більш ґрунтовно дослідити клітинні лінії культури тканин *U. victoris* на молекулярно-генетичному рівні.

### **Матеріали і методи**

Матеріалом для дослідження слугували 6 калюсних та 3 суспензійні дев'ятирічні лінії *U. victoris*, отримані від однієї рослини на живильних середовищах із спільною мінеральною основою 5С із різним вмістом біологічно активних добавок (отримання ліній описано в [2]). На час дослідження калюсні лінії вирощували щонайменше 40 пасажів на таких середовищах: лінії №2, №5, №6 — на середовищі 5С01, лінії №3, №7 — на середовищі 5С3Н, лінію №9а — на середовищі 5С. Суспензійні лінії №10 і №11 вирощували більше 40 пасажів на середовищі 5С3Нж, лінію №12 — на 5С01ж.

У ході попереднього скринінгу двадцяти чотирьох ISSR-праймерів було відібрано 15 праймерів (таблиця), що давали чіткі відтворювані спектри ПЛР-продуктів. Для ампліфікації застосовували наступний температурний режим: 95 °С — 2 хв., 35 Ч (94 °С — 30 с, 53 °С — 30 с, 72 °С — 1 хв. 30 с.), 72 °С — 5 хв. Склад реакційної суміші для ПЛР та методика виділення ДНК наведені в [4].

**Нуклеотидні послідовності ISSR-праймерів та характеристика їх ПЛР-продуктів для клітинних ліній культури тканин *U. victoris***

Праймер	Нуклеотидна послідовність (5'–3')	Враховано ампліконів, шт.	Поліморфних ампліконів, шт.	Праймер	Нуклеотидна послідовність (5'–3')	Враховано ампліконів, шт.	Поліморфних ампліконів, шт.
844B	(CT) <sub>8</sub> GC	9	0	UBC#807	(AG) <sub>8</sub> T	12	0
ISSR-03	(AC) <sub>8</sub> TT	4	0	UBC#811	(GA) <sub>8</sub> C	13	0
ISSR-04	(AC) <sub>8</sub> AG	7	0	UBC#827	(AC) <sub>8</sub> G	8	0
ISSR-05	(AC) <sub>8</sub> TG	8	0	UBC#835	(AG) <sub>8</sub> YC	10	3
ISSR-23	(AC) <sub>8</sub> TA	14	3	UBC#836	(AG) <sub>8</sub> YA	12	0
ISSR-45	(AC) <sub>8</sub> GC	9	1	UBC#840	(GA) <sub>8</sub> YT	8	0
ISSR-47	(AC) <sub>8</sub> GT	6	0	UBC#857	(AC) <sub>8</sub> YG	5	0
ISSR-59	(AG) <sub>8</sub> GC	11	0	Сума (шт. / %)		136/100	7/5,1

Примітка. Y — С або Т.

Враховували чітко розрізновані, відтворювані амплікони. Результати були представлені у вигляді бінарної матриці, у якій наявність або відсутність у ISSR-спектрі однакових за розміром ампліконів позначалася відповідно як стан “1” або “0”. На основі отриманої матриці за допомогою програми FAMD було розраховано генетичні відстані Жакарда та побудовано дендрограму генетичної подібності досліджених ліній.

#### **Результати та обговорення**

Для визначення генетичної стабільності *U. victoris* в культурі *in vitro* проводили порівняльний аналіз спектрів ПЛР-продуктів ДНК культур тканин отриманих від однієї рослини за умов тривалого вирощування (віком 9 років). Порівнювали між собою лінії, що вирощували на середовищах із різним вмістом біологічно активних речовин, а також лінії, що тривалий час вирощували на твердому або рідкому середовищі однакового складу. Для дослідження обрали ділянки геному, фланковані інвертованими повторами мікросателітних локусів (ISSR-аналіз). Було застосовано 15 ISSR-праймерів, які забезпечували ампліфікацію фрагментів у межах 300–2800 пн. Загальна кількість врахованих ампліконів становила 136 (від 4 до 14 на праймер, у середньому 9,1) (таблиця). Відмінності між клітинними лініями виявили сім ампліконів, що складає 5,1%. Генетичні відстані Жакарда між лініями коливались в межах від 0 до 3,73%.

На основі генетичних відстаней методом UPGMA було побудовано дендрограму генетичної подібності клітинних ліній (рисунок). На дендрограмі об'єкти згрупувалися незалежно від умов культивування (агаризоване або рідке середовище), складу живильних середовищ та походження ліній [2]. Аналіз наявності окремих поліморфних ISSR-фрагментів також не

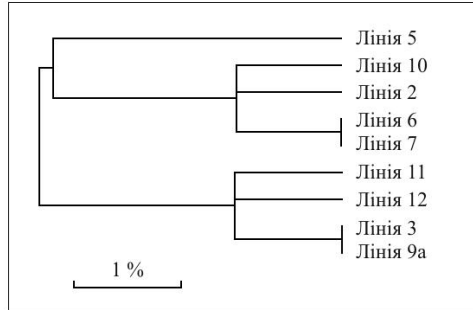


Рис. Дендрограма генетичної подібності клітинних ліній культури тканин *U. victoris*, побудована UPGMA-методом за генетичними відстанями Жакарда

виявив зв'язку із вищезгаданими параметрами. У цілому, проведені дослідження свідчать про те, що тривале культивування *in vitro* тканин *U. victoris* супроводжується молекулярно-генетичними змінами, які призводять до дивергенції ліній культивованих тканин.

Рівень поліморфізму спектрів ампліфікованих міжмікросателітних послідовностей тривалокультивованих ліній *U. victoris* виявився дещо вищим за аналогічні показники, отримані раніше в результаті RAPD-аналізу: у випадку останнього генетичні відстані між лініями складали від 0,84 до 2,99%, а частка поліморфних ампліконів — 3,8% [3]. Не дивлячись на більшу кількість поліморфних ампліконів, використані ISSR-маркери не дозволяють розрізнити деякі лінії з ідентичними спектрами, тоді як RAPD-аналіз дав змогу ідентифікувати кожну лінію. Разом з тим, генетичні відносини між лініями культивованих тканин унгернії, встановлені на підставі різних типів маркерів, хоча і не збігалися повністю, але були подібними.

Літературні дані щодо порівняння ефективності цих двох методів молекулярно-генетичного аналізу у випадку дослідження соматоклональної мінливості є неоднозначними. У деяких випадках ефективність ISSR-аналізу перевищує таку у RAPD-ПЛР — так, у соматоклонів чаю, отриманих шляхом стимуляції росту пазушних бруньок у культурі пагонів, поліморфними були 12,8% ISSR-локусів і лише 4,3% RAPD-локусів [5]. За іншими даними, соматоклональна мінливість ISSR-маркерів виявилася значно нижчою, ніж RAPD-маркерів: частка поліморфних локусів складала відповідно 15,7 і 24,9% у регенерантів *Codonopsis lanceolata* отриманих шляхом органогенезу із каллосу насінневого походження [6].

При переході від поверхневого вирощування до глибинного геном культивованих тканин зазнає значного стресового впливу [7, розділ 8]. Раніше було встановлено, що зміна умов вирощування чинить більший вплив на геном культивованих тканин раувольфії зміїної порівняно зі зміною складу живильного середовища. Зокрема, рівень поліморфізму RAPD-ампліконів при зміні умов вирощування калюсної культури раувольфії зміїної з поверх-

невого на глибинне був значно вищий, ніж при зниженні вмісту сахарози і зміні мінеральної основи агаризованого середовища [8]. В результаті проведених досліджень культивованих тканин *U. victoris* не вдалося встановити залежності рівня мінливості міжмікросателітних ділянок геному від вмісту фітогормонів та способу вирощування (поверхневий, або в рідкому середовищі). Величина генетичних дистанцій між лініями, що вирощували на агаризованому середовищі 5C01 (1 мг/л кінетину, 1 мг/л  $\alpha$ -НОК) коливалася від 0,75% до 2,96%; на середовищі 5C3H (0,02 мг/л кінетину, 0,5 мг/л  $\alpha$ -НОК) — від 2,24% до 2,99%. Генетичні дистанції між лініями, які вирощували протягом щонайменш 40 пасажів на твердому та рідкому середовищі однакового складу, також коливались в широкому діапазоні — від 0,75% та 1,52% для ліній, що росли на 5C3H та 5C3Hж, до 2,24% для ліній, що росли на 5C01 та 5C01ж. Таким чином, цілком можливо, що на рівень генетичної мінливості культивованих тканин *U. victoris* впливають інші чинники, не враховані в проведеному дослідженні.

### Висновки

Тривале культивування *in vitro* тканин *U. victoris* супроводжується перебуваннями міжмікросателітних ділянок геному, які призводять до дивергенції окремих клітинних ліній культури тканин, отриманих від однієї рослини. Генетичні відстані Жакарда між лініями становили від 0 до 3,73%. Залежності рівня мінливості від складу живильного середовища та способу вирощування не виявлено. В цілому, результати молекулярно-генетичного аналізу з використанням ISSR-маркерів узгоджуються з даними проведеного раніше RAPD-аналізу.

### Література

1. Кунах В.А., Можилевская Л.П., Потанчук Е.А. и др. Получение культуры тканей *Ungernia victoris* и ее особенности при выращивании на питательных средах различного состава // Биотехнология.— 2007.— №1.— С. 14–21.
2. 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.— Т.42, №1.— С. 29–36.
3. Бублик О.М., Андреев И.О., Спиридонова К.В., Кунах В.А. Соматическая мінливість *U. victoris*: необхідність комплексного генетичного аналізу // Biopolym. Cell.— 2008.— №6.— С. 487–493.
4. Бублик О.М., Андреев И.О., Спиридонова К.В. и др. Генетична гетерогенність рідкісного ендемічного виду *Ungernia victoris* (Amaryllidaceae): RAPD-аналіз // Український ботанічний журнал.— 2008.— Т.65, №3.— С. 445–452.
5. Devarumath R.M., Nandy S., Rani V. et al. RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica* ssp. *assamica* (Assam-India type) // Plant Cell Rep.— 2002.— Vol.21.— P. 166–173.
6. Guo W.L., Gong L., Ding Z.F. et al. Genomic instability in phenotypically normal regenerants of medicinal plant *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f., as revealed by ISSR and RAPD markers // Plant Cell Rep.— 2006.— Vol.25.— P. 896–906.

7. Кунах В.А. Биотехнология лекарственных растений. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи.— К.: Логос, 2005.— 724 с.

8. Спиридонова Е.В., Адноф Д.М., Андреев И.О., Кунах В.А. Динамика изменений генома каллусных тканей раувольфии змеиной при переводе в условия глубинного выращивания // Цитология и генетика.— 2008.— Т.42, №2.— С. 35–41.

#### **Резюме**

ISSR-аналіз 9 клітинних ліній *U. victoris*, отриманих від однієї рослини, показав, що тривале культивування *in vitro* супроводжується перебудовами міжмікросателітних ділянок геному, які призводять до дивергенції ліній. Генетичні відстані Жакарда між лініями склали від 0 до 3,73%. Не виявлено залежності рівня мінливості від складу живильного середовища та способу вирощування.

ISSR-анализ 9 клеточных линий *U. victoris*, полученных от одного растения, показал, что длительное культивирование *in vitro* сопровождается перестройками межмикро сателлитных участков генома, и приводит к дивергенции клеточных линий. Генетические расстояния Жакарда между линиями составили от 0 до 3,73%. Не выявлено зависимости уровня изменчивости от состава питательной среды и способа выращивания.

ISSR-analysis of nine *U. victoris* cell lines generated from the same plant revealed the variability of inter simple sequence repeat markers to be induced by long term culture *in vitro*, which resulted in divergence of the lines. Jacquard's genetic distances between cell lines varied from 0 to 3.73%. No relationship was found between variability level and of nutrient medium content as well as mode of maintenance.

**ВЕСЕЛОВ Д.С., АХИЯРОВА Г.Р.**

*Институт биологии УНЦ РАН, Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 69*

### **ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ АКВАПОРИНОВ У РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ ПРИ ОСМОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ**

Способность сохранять баланс между поглощением и потерей воды очень важно для растений, поскольку водоснабжение и транспирация могут изменяться очень быстро в естественных условиях. В течение долгого времени внимание исследователей было сосредоточено на механизмах, позволяющих контролировать потерю воды с помощью изменения устьичной проводимости [1]. Открытие водных каналов аквапоринов и раскрытие механизмов, контролируемых их число и активность, сместило акценты в сторону изучения регуляции поглощения воды с помощью изменения гидравлической проводимости тканей. Аквапорины могут увеличивать транспорт воды через мембраны, уменьшая их гидравлическое сопротивление [2]. Роль аквапоринов в регуляции водных отношений при водном дефиците хорошо изучена, однако их экспрессия в этих условиях может увеличиваться, уменьшаться или совсем не изменяться [3]. Считается, что увеличение и снижение экспрессии аквапоринов и соответствующие изменение проницаемости мем-