

**О.П. Кравець, Д.О. Соколова, А.М. Берестяна, О.Р. Шнуренко,  
М.О. Банникова, Б.В. Моргун, М.В. Кучук, Д.М. Гродзинський**  
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ

## **ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ЕКОЛОГІЧНОЇ ПЛАСТИЧНОСТІ ЕЛІТНИХ СОРТІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ І ПОЛІМОРФІЗМУ ПРОФІЛІВ МЕТИЛУВАННЯ ДНК У МЕЖАХ СОРТУ**



Досліджено зв'язок екологічної пластичності восьми елітних сортів озимої пшениці з поліморфізмом профілів метилування ДНК в межах сорту у проростків з насіння, що проростає з різною швидкістю. Рівень поліморфізму, або «епігенетичну відстань», у спектрах рестрикційних фрагментів електрофореграм розподілу продуктів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) кількісно оцінювали за показником *HeI*. Встановлено існування кореляції ( $R_s = 0,69$ ) між рангом, що визначається по продуктивності та екологічній пластичності, і рівнем поліморфізму профілів метилування ДНК сорту. Показано, що найбільша «епігенетична відстань» ( $D \geq 0,1$ ) спостерігається у сортів з найвищим рангом по продуктивності та екологічній пластичності. Запропоновано використовувати оцінку показника епігенетичної відстані у селекції нових сортів для зон з нестійкими кліматичними умовами.

*Ключові слова:* пшениця, екологічна пластичність, епігенетичний поліморфізм, відстань за *HeI*, рестрикційний аналіз.

Зміна клімату та широкомасштабне забруднення довкілля висуває додаткові вимоги до створення нових сортів. Однією з нагальних сучасних потреб є пришвидшення селекційного процесу та створення сортів не тільки з високим продукційним потенціалом в оптимальних умовах росту і розвитку, але й з високою екологічною пластичністю і адаптивними можливостями, що дозволяють формувати високі врожаї за певною мірою екстремальних умов.

Сучасна селекція, озброєна молекулярно-генетичними підходами, широко застосовує метод генетичних маркерів, що дозволяє виявити генетичний поліморфізм великих обсягів селекційного матеріалу, пришвидшує та робить більш цілеспрямованим одержання нових елітних сортів із заданими генетичними

характеристиками. Водночас наукові здобутки останніх років свідчать [1–3], що адаптивний процес зумовлюється зміною експресії великих ансамблів генів і значною перебудовою ізоферментних спектрів. Ці дані підтверджують, що високим адаптивним потенціалом будуть володіти сорти з високою здатністю до таких перебудов.

Сучасна популяційна генетика разом з поняттям генетичного поліморфізму оперує поняттям поліморфізму епігенетичного, під яким мається на увазі залежність гетерогенності фенотипів від різноманіття їх епігенетичних програм при збереженні тотожності генотипу.

Дані досліджень останніх років свідчать про значну роль кліматичних чинників у визначенні епігенетичного поліморфізму популяцій, що передається спадково протягом декількох поколінь і забезпечує пристосування до нестійких умов зростання. На прикладі ряду техніч-

них культур показано [4], що генетичний поліморфізм визначає тільки декілька відсотків адаптивного потенціалу сорту, основний внесок у пластичність сорту пов'язаний з епігенетичними змінами та зміною рівня епігенетичного поліморфізму, що визначає норму реакції рослинного організму.

Зі встановленням факту виникнення і розширення епігенетичного поліморфізму між популяціями одного сорту у зв'язку з їх ростом у різних кліматичних умовах виникає таке запитання: чи існує у довільній популяції рослин деякий *початковий* (існуючий вже на стадії насінини і зародка) *епігенетичний поліморфізм*, що дозволяє забезпечити популяційний гомеостаз, тобто успішні проростання, ріст та відтворення виду і сорту у можливих для даного регіону кліматичних нестабільностях, що можуть знищити певну частину популяції?

Будь-яка вибірка насіння, яке не знаходиться у стані спокою, належить до одного виду, сорту і врожаю, характеризується певною варіабельністю термінів проростання після ініціації цього процесу. Фактично для більшості видів рослин не спостерігається гетерокарпія і швидкість проростання є єдиною фенотиповою ознакою, що дозволяє перехід від вивчення фенотипічного поліморфізму до поліморфізму епігенетичного. У серії досліджень [5–8] на прикладі кукурудзи встановлено зв'язок різної швидкості проростання насіння довільної вибірки з вихідним поліморфізмом профілів метилування функціонально різних послідовностей ДНК проростків та їх стійкістю до абіотичних факторів, що дозволяє розглядати характер метилування ДНК як фактор індивідуальної стійкості організму, а поліморфізм профілів метилування — як фактор популяційної стійкості [5]. Показано, що адаптивний потенціал субпопуляцій рослин також пов'язаний з активністю процесу їх проростання та вихідним станом метилування функціонально різних послідовностей ДНК проростків, а адаптивні можливості популяції рослин — з поліморфізмом профілів метилування ДНК [5–8].

Таким чином, стан питання на сьогодні дозволяє зробити висновок, що екологічна пластичність, яка досягається епігенетичними механізмами, є однією з універсальних захисних реакцій, що визначають різноманітність відповідей на дію стресових чинників і забезпечують виживаність і репродуктивний потенціал популяцій диких і культурних рослин. Одержані дані вказують на можливість практичного застосування оцінок рівня епігенетичного поліморфізму сортів як прогностичного критерію успішності їх продукційного процесу.

Метою нашого дослідження була оцінка зв'язку екологічної пластичності елітних сортів озимої пшениці з рівнем їх епігенетичного поліморфізму, що полягає у вихідній відмінності профілів метилування ДНК рослин одного врожаю у межах сорту, та розробка на основі проведених оцінок прогностичного критерію, застосування якого у селекційній практиці може виявитися корисним при цілеспрямованому одержанні сортів для зон критичного землекористування та в умовах кліматичної нестабільності.

## 1. РОЛЬ МЕТИЛУВАННЯ ДНК У ОРГАНІЗАЦІЇ ПОЛІМОРФНОГО ЕПІГЕНОМУ

Одним із функціональних механізмів епігенетичного поліморфізму як залежності гетерогенності фенотипів від різноманітності їх епігенетичних програм при збереженні тотожності генотипу є хімічна модифікація азотистих основ ДНК (метилування цитозину). Дана модифікація успадковується епігенетично завдяки існуванню системи, що розпізнає геміметильовані послідовності та перетворює їх у суцільно метильовані ділянки. Епігенетична мітка послідовності знімається разом з усуненням метильних груп [9, 10].

Неоднакове співвідношення активності різноманітних механізмів метилування в різних клітинах спричиняє появу «мозаїк метилування». При цьому окрім «підтримуючого» метилування, що забезпечує постмітотичну модифікацію симетричних сайтів, метилтранс-

фрази виконують метилювання *de novo*, а до заздалегідь запрограмованого селективного зняття метилювання додається випадкова депресія як наслідок пасивного та активного деметилювання [11].

Метилювання ДНК трапляється здебільшого на визначених «цільових» послідовностях (переважно CpG та CpNpG) і являє собою важливу форму поліморфізму. Через ці модифікації продукуються нові *алелі*, «*епіалелі*», спільною рисою яких є їх обов'язковий прояв у фенотипі та які є епігенетичною основою фенотипової мінливості. Проте не всі епіалелі та результати їх перебудови помітні як видимі зміни фенотипу, тому дослідження епігенетичної спадковості в масштабах суцільного геному актуалізувалися з появою молекулярних методів. Так, завдяки аналізу MSAP (Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism) показано, що природні популяції значно більше варіюють за рівнем метильованості ДНК, ніж за складом нуклеотидних послідовностей, і мають вище епігенетичне різноманіття, ніж генетичне [12, 13]. Крім того, зафіксовано явище спадкового закріплення стрес-індукованих змін епігеному [6, 14–16, 17]. Застосування високопродуктивних методів сиквенсу демонструє значно вищу частоту епіалелів (порівняно з генетичними мутаціями) та реверсивність метильованих ділянок ДНК [8]. Метастабільність епіалелів вказує на те, що багато із спонтанно утворених унікальних епігенетичних ознак нездатні достатньо довго існувати, аби забезпечувати еволюційні зміни належної тривалості. Проте реверсивність епіалелів є фактором, котрий змушує їх підпадати під загальні правила фенотипової селекції і закріплення ознак. Отже, метастабільні епіалелі, індуковані довкіллям, забезпечують фенотипове різноманіття популяції [5].

Як зазначено вище, різна швидкість проростання насіння також має епігенетичний механізм виникнення і підтримки, а епігенетичний поліморфізм насіння пов'язаний із швидкістю його проростання і стійкістю проростків до абіотичних чинників [7, 5]. Існує суттєва різни-

ця між адаптивним потенціалом проростків і епігенетично різними групами одного й того ж виду і сорту рослин [6–8]. Це вказує на можливий біологічний сенс зв'язку епігенетичного поліморфізму насіння із швидкістю його проростання: варіабельність термінів проростання і відмінність подальшої стійкості проростків є одним з механізмів збереження гомеостазу популяції у змінних умовах середовища.

## 2. ОЦІНКА СТУПЕНЯ ЕПІГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ЕЛІТНИХ СОРТІВ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

Дослідження проводили на 11-добових проростках восьми районованих сортів м'якої пшениці (Дарунок Поділля, Лимарівна, Наталка, Новокиївська, Подолянка, Смуглянка, Сотниця, Фаворитка); оригінаторами сортів є Інститут фізіології рослин і генетики НАН України та Миронівський інститут пшениці ім. В.М. Ремесла НААН України.

Вивчення зв'язку епігенетичного поліморфізму з екологічною пластичністю (виробничою надійністю) сорту виконували в кілька етапів:

1) аналіз паспортних даних елітних сортів пшениці та їх ранжування за продуктивністю та екологічною пластичністю;

2) характеристика сортів за співвідношенням субпопуляцій насіння з різною швидкістю проростання;

3) виділення ДНК, оцінка її нативності, проведення рестрикції з подальшою ПЛР;

4) аналіз спектрів ампліконів, оцінка «епігенетичної відстані» за Неї у межах сорту;

5) оцінка рангової кореляції за Спірменом між екологічною пластичністю та епігенетичною відстанню у межах сорту.

Реакції ISSR-PCR, ITS-PCR та рестрикційний аналіз проводили за стандартними протоколами. Реакційна суміш для ISSR-PCR об'ємом 20 мкл містила: 1 од. (0,8 мкл) Таq-полімерази, інгібованої для «гарячого старту», 10 мкл PCR-розчинника, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ кожного dNTP, 0,1 мкМ праймера (1,6 мкл), 200 нг загальної ДНК (2 мкл), 6,4 мкл деіонізованої

води. Суміш покривали шаром вазелінової олії (20 мкл). Ампліфікація з ISSR-праймерами включала наступні етапи: початкова денатурація 5 хв при 94 °С (40 циклів); денатурація при 94 °С – 45 с; відпал при 52 °С – 45 с; елонгація при 72 °С – 90 с; кінцева елонгація при 72 °С – 7 хв [18].

Реакційна суміш для ITS-PCR об'ємом 20 мкл містила: 1 од. Таq-полімерази, інгібованої для «гарячого старту»; 10 мкл PCR-розчинника; 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 200 мкМ кожного dNTP; 0,1 мкМ кожного праймера (по 0,8 мкл); 200 нг загальної ДНК (2 мкл); 6,4 мкл деіонізованої води. Суміш покривали шаром вазелінової олії (20 мкл). Ампліфікація з ITS-праймерами включала наступні етапи: початкова денатурація 1,5 хв при 94 °С; 40 циклів денатурації при 94 °С – 15 с; відпал при 55 °С – 15 с; елонгація при 72 °С – 15 с; «закріплення»: денатурація при 94 °С – 10 с, температура відпалу 55 °С – 10 с; кінцева елонгація при 72 °С – 5 хв [19].

Рестрикційний аналіз (подібно до ампліфікації) проводили в 4-канальному ДНК-ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-технологія», РФ). Застосовували три типи рестриктаз: MspI, MboI та HpaII (Fisher Thermo Scientific, США).

Реакція рестрикції з ферментом MspI проходила в об'ємі 25 мкл, містила 0,6 од. ферменту (0,9 мкл), 2 мкл 10xBuffer Tango, 500 нг загальної ДНК (5 мкл), а також 17,1 мкл деіонізованої води. Реакційні суміші для рестрикційного аналізу MboI та HpaII об'ємом 25 мкл містили по 0,2 од. ферменту (0,3 мкл), 2 мкл 10xBuffer Tango, 500 нг загальної геномної ДНК (5 мкл), 17,7 мкл деіонізованої води. Усі суміші покривали шаром вазелінової олії (20 мкл). Реакція рестрикції тривала 16 год при 37 °С, зупинка реакції – 20 хв при 65 °С (для MboI) або 20 хв при 80 °С (для MspI).

Отримані продукти ПЛР і рестрикційного аналізу розділяли в 1,7%-му агарозному гелі з ТБЕ-буфером за присутності бромистого етидію та візуалізували на UV-трансліюмінаторі. При постановці електрофорезу в лунку гелю вносили однаковий об'єм продуктів ПЛР і ре-

стрикції (5 мкл). Як маркер молекулярної маси використовували SM0373 GeneRuler 50 bp.

Епігенетичну відстань (ЕВ) оцінювали за допомогою модифікованого підходу Heї [20].

Приймали, що якщо  $X$  і  $Y$  є двома незалежними наборами ампліконів продуктів рестрикції, тоді  $x_i$  та  $y_i$  є частотами окремих смуг в цих наборах. Ймовірність ідентичності двох випадковим чином вибраних смуг  $j_X = \sum x_i^2$  – для набору  $X$ ;  $j_Y = \sum y_i^2$  – для набору  $Y$ . Ймовірність ідентичності смуги з набору  $X$  із смугою з  $Y$  –  $j_{XY} = \sum x_i y_i$ . Таким чином, нормована ідентичність смуг між  $X$  та  $Y$  виражається як

$$I = \frac{J_{XY}}{\sqrt{J_X J_Y}}, \quad (1)$$

де  $J_X$ ,  $J_Y$  і  $J_{XY}$  – середні арифметичні  $j_X$ ,  $j_Y$  та  $j_{XY}$  відповідно.

Епігенетична відстань між  $X$  та  $Y$  має такий вигляд:

$$D = -\ln I. \quad (2)$$

Тут  $D = 0$  у випадку абсолютного збігу смуг в наборах ампліконів і  $D = 1$  за умови повного розходження набору смуг (маси ампліконів).

Заключним етапом був розрахунок рангової кореляції за Спірменом між рангом сорту та показником різниці між спектрами ампліконів в межах сорту («епігенетичної відстані») та статистична обробка з використанням програмного забезпечення MS Office Excel.

Зерна пророщували в термостаті на піддонах із зволженим фільтрувальним папером за температури 24–25 °С. На другу добу пророщені зерна розділяли на дві групи: швидко проростаючі (довжина паростка >1 см) та повільно проростаючі (зерна, що ледве наклюнулись). Рівновеликі вибірки з двох груп розміщувалися на зволжених підкладках в чашках Петрі та витримувалися в термостаті ( $T = 24$ – $25$  °С) до четвертої доби, після чого продовжували пророщування в просторому прозорому посуді до 11-ї доби під лампами денного освітлення Electrum 36W/54 (4 тис. люкс) при освітлювальному режимі 16/8.

ДНК виділяли з проростків з використанням наборів реагентів NeoPrep50 DNA («NeoGene», Україна) та GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit (Fisher Thermo Scientific, США) за стандартними протоколами фірм-виробників. Вимір концентрації отриманого розчину ДНК проводили на спектрофотометрі BioPhotometer Plus Eppendorf v.1.35 з використанням стандартної методики [21].

ПЛР проводили в 4-канальному ДНК-ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-технологія», РФ). Використовували праймери до мінісателітних послідовностей ISSR (inter simple sequence repeat 15-соро, послідовність – 5'-АС-АС-АС-АС-АС-АС-АС-АС-<C>-3'), та до послідовностей, що транскрибуються, ITS1 (internal transcribed spacer 1, 5'-ТСС-ГТА-ГСТ-ГАА-ССТ-ГСС-Г-3') і ITS4 (internal transcribed spacer 4, 5'-ТСС-ТСС-ГСТ-ТАТ-ТГА-ТАТ-ГС-3'). Обидва типи праймерів синтезовані фірмою «Metabion» (Германія). Використовували також ліофілізовані сухі суміші для ампліфікації ДНК (GenPak®PCR Core).

## 2.1. АНАЛІЗ ПАСПОРТНИХ ДАНИХ СОРТІВ ТА ЇХ РАНЖУВАННЯ ЗА ПРОДУКТИВНІСТЮ ТА ЕКОЛОГІЧНОЮ ПЛАСТИЧНІСТЮ

При аналізі ступеня екологічної пластичності (виробничої надійності) елітних сортів пшениці використовували паспорти сортів, надані організаціями-оригінаторами.

Паспортні дані свідчать про значну гетерогенність обраної групи елітних сортів пшениці за основними показниками як врожайності, так і їх екологічної пластичності. В паспортах одні сорти визначені як «сорт для добрих господарів», тобто таким чином підкреслена їх можливість до кліматичних умов висівання, попередника, підживлення добривами та обробки від шкідників; для інших сортів підкреслюється їх «виробнича надійність» (іншими словами – невибагливість до умов формування врожаю, екологічна пластичність). Існуючі на сьогодні дані не дозволяють провести прямий економічний аналіз за співвідношенням *затрати/врожай*, тому при класифікації сортів доречно ввести просте ранжування як за

Таблиця 1

Характеристики сортів м'якої озимої пшениці та їх ранжування за продуктивністю та екологічною пластичністю (виробничою надійністю)

Сорт	Продуктивність		Екологічна пластичність, бали	Сума балів	Ранг сорту
	ц/га	бали			
Смуглянка	60,0–115,1	3+	0	3+	1
Подольнка	60,0–96,0	1+	6+	7+	5
Сотниця	50,2–102,6	2+	2+	4+	2
Наталка	50,3–93,6	1+	4+	5+	3
Дарунок Поділля	50,4–91,4	1+	3+	6+	4
Фаворитка	50,6–124,0	3+	3+	6+	4
Лимарівна	61,2–100,0	1+	6+	7+	5
Новокиївська	50,7–104,8	2+	6+	8+	6

*Примітка.* Продуктивність: 1+ – максимальна врожайність до 100 ц/га; 2+ – максимальна врожайність до 110 ц/га; 3+ – максимальна врожайність > 110 ц/га. Виробнича надійність = екологічна пластичність: 1+ – невисокі вимоги до строків висіву; 2+ – невисокі вимоги до строків висіву + невисокі вимоги до рівнів мінеральних добрив; 3+ – невисокі вимоги до строків висіву + невисокі вимоги до попередника + невисокі вимоги до рівнів мінеральних добрив.

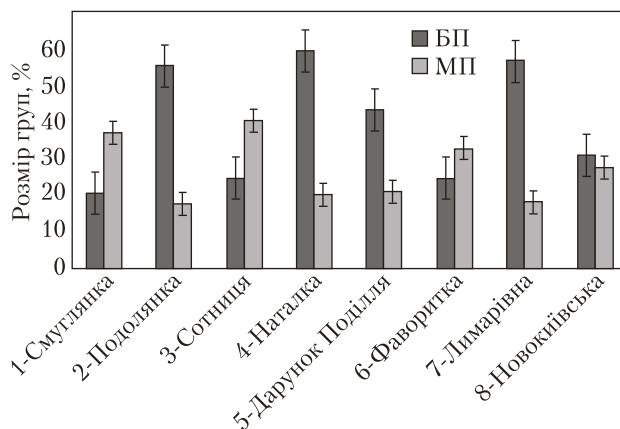


Рис. 1. Оцінка співвідношення груп насіння кожного сорту, що проростає швидко (БП) та повільно (МП)

показниками продуктивності, так і за показниками виробничої надійності, інакше кажучи — екологічної пластичності (табл. 1). Використано три показники, що свідчать про екологічну пластичність сорту, а саме: вимоги до строків висіву, вимоги до попередника та до рівнів мінеральних добрив.

## 2.2. ХАРАКТЕРИСТИКА СОРТІВ ЗА СПІВВІДНОШЕННЯМ СУБПОПУЛЯЦІЙ НАСІННЯ З РІЗНОЮ ШВИДКІСТЮ ПРОРОСТАННЯ

У попередніх дослідженнях [5–8] був відпрацьований протокол розподілу експериментальної вибірки насіння за швидкістю проростання. Вибірку розподіляли на три групи: з високою, середньою та низькою швидкістю проростання. Були встановлені нестабільності розмірів і цитогенетичних параметрів групи проростків, що походять із субпопуляцій насіння, яке проростає із «середньою» швидкістю [6]. Тому у подальших дослідженнях оцінки епігенетичного поліморфізму були сфокусовані на граничних групах проростків — із швидко та повільно проростаючого насіння. Такий підхід доцільно використовувати при дослідженні епігенетичного поліморфізму різних сортів пшениці, тому що саме він дозволить очікувати і виявити найширшу розбіжність, найбільшу «відстань» у профілях метилування ДНК.

Насіння кожного сорту було розподілено на групи за швидкістю проростання (рис. 1).

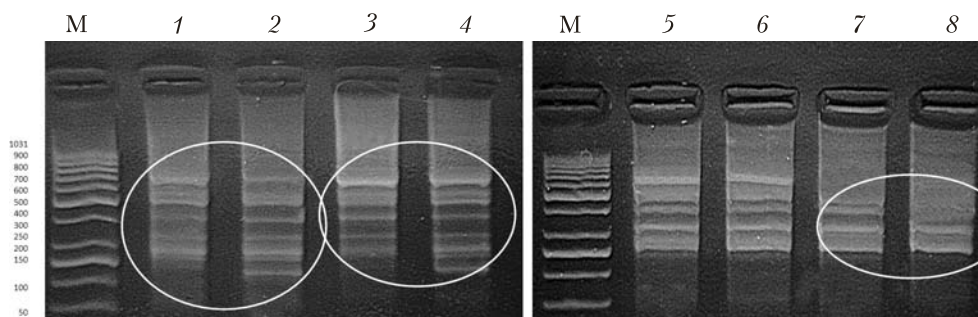
За співвідношенням зерен, що проростають швидко/повільно (БП/МП), виявлено: сорти з переважанням насіння, яке проростає повільно (МП) (Смуглянка, Сотниця, Фаворитка); яскраво вираженою перевагою насіння, що проростає швидко (БП) (Подільянка, Наталка, Дарунок Поділля, Лимарівна); приблизно рівномірним співвідношенням кількості БП/МП (Новокиївська). Отримані результати свідчать про можливу різномірність адаптаційних стратегій у селекційно виведених культиварів. Оскільки всі вісім сортів позиціонуються як елітні і характерними високими показниками врожаю, то розходження і подібності було відмічено в ході аналізу поліморфізму профілів метилування ДНК.

## 2.3. ВИВЧЕННЯ ПРОФІЛІВ МЕТИЛУВАННЯ ДНК ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ ЕЛІТНИХ СОРТІВ, ЩО ПОХОДЯТЬ З СУБПОПУЛЯЦІЙ НАСІННЯ З РІЗНОЮ ШВИДКІСТЮ ПРОРОСТАННЯ

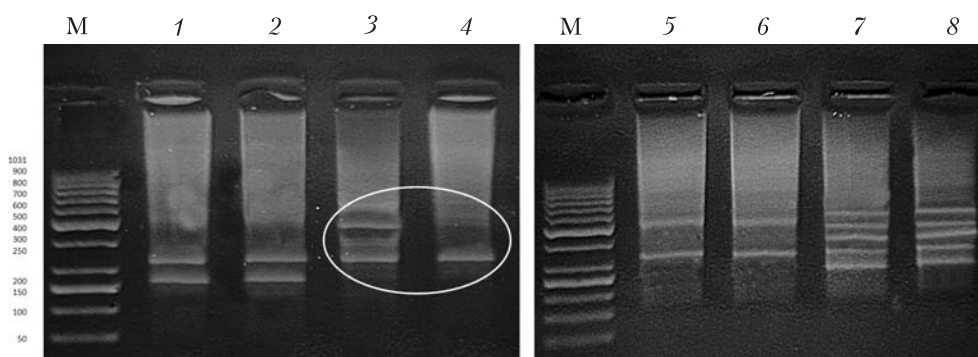
Електрофореграми контролю нативності ДНК, одержані попередньо, засвідчили високу якість виділення ДНК, що дозволило подальший аналіз характеру її метилування.

Як приклад одержаних первинних даних за особливостями метилування ДНК проростків із насіння, що розрізняється швидкістю проростання, наведено ряд електрофореграм. Читку різниці у спектрах ампліфікованих рестриктів виявлено на отриманих електрофореграмах ампліфікації рестриктів HpaII-ендонуклеазою з ISSR-праймерами між групами швидко- та повільнопроростаючих проростків для сортів Смуглянка, Подільянка та Сотниця. Для сорту Сотниця різниця між спектрами ампліфікованих продуктів рестрикції не спостерігалася, що свідчить про відсутність різниці у метилуванні відповідних сайтів ДНК проростків, що походять із зерен, які проростають швидко чи повільно (рис. 2).

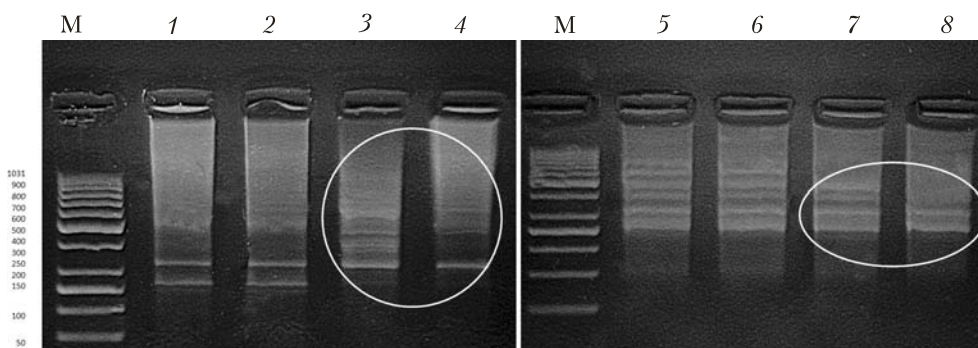
На електрофореграмах ампліфікації рестриктів MboI-ендонуклеазою з ISSR-праймерами



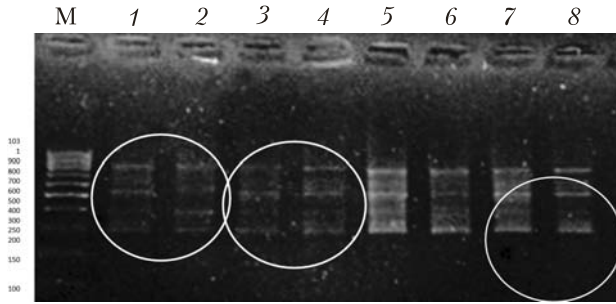
**Рис. 2.** Електрофореграми ампліфікації рестриктів HpaII з ISSR-праймером: М – маркер молекулярної маси Thermo Scientific GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder. Доріжки: 1 – SG, 1 – Смуглянка; 2 – FG, 1 – Смуглянка; 3 – SG, 2 – Подолянка; 4 – FG, 2 – Подолянка; 5 – SG, 3 – Сотниця; 6 – FG, 3 – Сотниця; 7 – SG, 4 – Наталка; 8 – FG, 4 – Наталка



**Рис. 3.** Електрофореграми ампліфікації рестриктів MboI з ISSR-праймерами: М – маркер молекулярної маси Thermo Scientific GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder. Доріжки: 1 – SG, 1 – Смуглянка; 2 – FG, 1 – Смуглянка; 3 – SG, 2 – Подолянка; 4 – FG, 2 – Подолянка; 5 – SG, 3 – Сотниця; 6 – FG, 3 – Сотниця; 7 – SG, 4 – Наталка; 8 – FG, 4 – Наталка



**Рис. 4.** Електрофореграми ампліфікації рестриктів MspI з ISSR-праймерами: М – маркер молекулярної маси Thermo Scientific GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder. Доріжки: 1 – SG, 1 – Смуглянка; 2 – FG, 1 – Смуглянка; 3 – SG, 2 – Подолянка; 4 – FG, 2 – Подолянка; 5 – SG, 3 – Сотниця; 6 – FG, 3 – Сотниця; 7 – SG, 4 – Наталка; 8 – FG, 4 – Наталка



**Рис. 5.** Електрофореграма ампліфікації рестриктів *MspI* з ITS-праймером: М – маркер молекулярної маси Thermo Scientific GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder. Доріжки: 1 – SG, 5 – Дарунок Поділля; 2 – FG, 5 – Дарунок Поділля; 3 – SG, 6 – Фаворитка; 4 – FG, 6 – Фаворитка; 5 – SG, 7 – Лимарівна; 6 – FG, 7 – Лимарівна; 7 – SG, 8 – Новокиївська; 8 – FG, 8 – Новокиївська

різниця в кількості смуг відсутня для сортів Смуглянка, Сотниця та Наталка і наявна для сорту Подолянка (рис. 3).

На електрофореграмах ампліфікації рестриктів *MspI*-ендонуклеазою з ISSR-праймерами різниця у спектрах ампліконів присутня для сортів Подолянка та Наталка і відсутня для сортів Смуглянка та Сотниця (рис. 4).

Одержані дані свідчать про тотожність спектрів ампліконів продуктів рестрикції *HpaII*-ендонуклеази, що, в свою чергу, є відображенням відсутності різниці у метилуванні відпо-

відних сайтів не тільки в межах сорту, але й у межах групи обраних сортів. Сорти Дарунок Поділля, Фаворитка, Лимарівна та Новокиївська при ампліфікації рестриктів *MboI*-ендонуклеази з ISSR-праймерами показали різний спектр ампліконів, що свідчить про різницю у профілях метилування сателітної ДНК проростків, що належать до SG- та FG-груп. При розділенні продуктів ампліфікації рестриктів *MspI*-ендонуклеази з ISSR-праймерами різницю спектру ампліконів виявлено тільки у сорту Лимарівна. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації рестриктів *MspI*-ендонуклеази з ITS-праймерами свідчить про поліморфізм спектрів ампліконів, що різняться за молекулярною масою, у сорту Дарунок Поділля (5 та 4 типів ампліконів), сорту Фаворитка (3 та 5 типів), та сорту Новокиївська (5 та 4 типів) (рис. 5).

На основі аналізу одержаних серій електрофореграм було розраховано «епігенетичну відстань» – різницю у спектрах метилування сателітної ДНК проростків певного сорту, що різняться за швидкістю проростання (табл. 2).

Таким чином, встановлено існування значного поліморфізму профілів метилування ДНК у восьми елітних сортів м'якої озимої пшениці. Ці дані підтвердили результати досліджень попередніх років, які показали існування полімор-

Таблиця 2

**Характеристики сортів м'якої озимої пшениці, їх ранжування та епігенетична відстань у межах кожного сорту**

Сорт	Продуктивність		Екологічна пластичність	Сума балів	Ранг сорту	D, епігенетична відстань
	ц/га	бали				
Смуглянка	60,0–115,1	3+	0	3+	1	0,020
Подолянка	60,0–96,0	1+	6+	7+	5	0,126
Сотниця	50,2–102,6	2+	2+	4+	2	0,004
Наталка	50,3–93,6	1+	4+	5+	3	0,108
Дарунок Поділля	50,4–91,4	1+	3+	6+	4	0,010
Фаворитка	50,6–124,0	3+	3+	6+	4	0,0056
Лимарівна	61,2–100,0	1+	6+	7+	5	0,210
Новокиївська	50,7–104,8	2+	6+	8+	6	0,098–0,100



фізму метилування ДНК у рослин, що розвиваються з насіння, яке має різну швидкість проростання, а також зв'язок поліморфізму метилування ДНК з різницями у стійкості до абіотичних факторів і адаптивного потенціалу цих рослин.

Наступний етап дослідження полягав у оцінці статистичного зв'язку по Спірмену між рангами сортів та показником епігенетичної відстані. Розраховані значення рангової кореляції становлять  $R_s = 0,69$  при  $\alpha > 0,05$ , що свідчить про достатньо високу щільність кореляційного зв'язку за умов невеликої вибірки.

### ВИСНОВКИ

Отже, можна зробити висновок, що для сортів з високою виробничою надійністю (екологічною пластичністю) характерна і більша «епігенетична відстань» між поліморфними спектрами довжин рестрикційних фрагментів ДНК рослин, що розвиваються з насіння граничних за фенотиповим показником груп — швидкого та повільного проростання. Значення показника  $D \geq 0,1$  свідчить про належність сорту до найвищих — 5-го та 6-го — рангів за показниками виробничої надійності.

Кількісний показник ступеня поліморфізму — епігенетична відстань у межах сорту — може використовуватися як прогностичний показник, маркер екологічної пластичності сорту. Його практичне визначення, тобто алгоритм оцінки епігенетичного показника-маркера екологічної пластичності сорту, що на практиці відповідає його виробничій надійності, може бути представлено у чотири етапи:

- 1) розподіл насіння на групи за швидкістю проростання;
- 2) виділення ДНК;
- 3) проведення рестрикції з подальшою ISSR-ПЛР;
- 4) аналіз розмаїття спектрів ампліконів, оцінка «епігенетичної відстані» за Неї у межах сорту.

Робота проводилася у рамках науково-технічного проекту II-13-14 «Впровадження молекулярних систем визначення генетичного й епі-

генетичного поліморфізму озимої пшениці для отримання високопродуктивних спеціалізованих сортів». Реєстраційний номер 0114U002736, м. Київ, 2014 р.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Лекавичус Э. Элементы общей теории адаптации. — Вильнюс: Моклас, 1986 — 272 с.
2. Coleman M, Yin E, Peterson L. et al. Low dose irradiation alters the transcript profiles of human lymphoblastoid cells including genes associated with cytogenetic radioadaptive response // Radiat. Res. — 2005. — V. 164, № 41. — P. 369—382.
3. Zhong L, Xu Y, Wang J. DNA-methylation changes induced by salt stress in wheat *Triticum aestivum* // Afr J Biotech. — 2009. — V. 8, № 22. — P. 6201—6207.
4. Yi C, Zhang S, Liu X. Does epigenetic polymorphism contribute to phenotypic variances in *Jatropha curcas* L.? // BMC Plant Biol. — 2010. — V. 10. — P. 1—14.
5. Sokolova D, Vengzhen G, Kravets A. The Effect of DNA Modification Polymorphism of Corn Seeds on Their Germination Rate, Seedling Resistance and Adaptive Capacity under UV-C Exposure // Amer J Plant Biol. — 2014. — V. 1, № 1. — P. 1—14.
6. Соколова Д, Венгжен Г, Кравец А. Влияние эпигенетического полиморфизма семян кукурузы на скорость их прорастания и устойчивость проростков к УФ-С облучению // Цитология и генетика. — 2014. — Т. 48, № 4. — С. 31—38.
7. Соколова Д., Венгжен Г., Кравец А. Роль эпигенетического полиморфизма проростков кукурузы в реакциях на УФ-С облучение // Физиология растений и генетика. — 2014. — Т. 46, № 3. — С. 221—229.
8. Sokolova D., Vengzhen G., Kravets A. An analysis of the correlation between the changes in satellite DNA methylation patterns and plant cell responses to the stress // CellBio. — 2013. — V. 2. — P. 163—171.
9. Tsaftaris et al. Epigenetic mechanisms in plants and their implications in plant breeding // Proceedings of the International Congress «In the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution». — 2003. — P. 157—171.
10. Salmon A., Clotault J. et al. Brassica oleracea displays a high level of DNA methylation polymorphism // Plant Sci. — 2008. — V. 174, № 1. — P. 61—70.
11. Shan X., Wang X. et al. Analysis of the DNA methylation of maize (*Zea mays* L.) in response to cold stress based on methylation-sensitive amplified polymorphisms // J. Plant Biol. — 2013. — V. 56. — P. 32—38.
12. Scheid G., Scheid M. Epigenetic responses to stress: triple defense? // Curr Opin Plant Biol. — 2012. — № 5. — P. 568—573. doi: 10.1016/j.pbi.2012.08.007.

13. Luna E., Bruce T., Roberts M. et al. Next-generation systemic acquired resistance // *Plant Physiol.* — 2012. — V. 158. — P. 844–853.
14. Rasmann S., De Vos M. et al. Herbivory in the previous generation primes plants for enhanced insect resistance // *Plant Physiol.* — 2012. — V. 158. — P. 854–863.
15. Becker C. et al. Spontaneous epigenetic variation in the *Arabidopsis thaliana* methylome // *Nature.* — 2011. — V. 480. — P. 245–249.
16. Herman J., Sultan S. Adaptive transgenerational plasticity in plants: Case studies, mechanisms, and implications for natural populations // *Front Plant Sci.* — 2011. — V. 2, № 102. — P. 1–10.
17. Boyko A., Kovalchuk I. Genome instability and epigenetic modification — heritable responses to environmental stress? // *Curr Opin Plant Biol.* — 2011. — V. 14, № 3. — P. 260–266. doi: 10.1016/j.pbi.2011.03.003.
18. Tikunov Yu. M., Khrystaleva L. I. Application of ISSR Markers in the Genus *Lycopersicon* // *Euphitica.* — 2003. — V. 131. — P. 71–80.
19. Bartlett J., Stirling D. PCR protocols. — Humana Press Inc. — 2003.
20. Nei M., Crow F., Denniston C. A new measure of genetic distance // *Genetic distance.* — 1974. — P. 63–76.
21. Ausubel F. et al. Current Protocols in Molecular Biology. — 2004.
7. Sokolova D., Vengzhen G., Kravets A. Rol epigeneticheskoho polimorfizma prorostkov kukuruzy v reaktsiiah na UF-S obluchenie. *Fiziologiya rastenii i hetetika.* 2014. 46(3): 221–229 [in Russian].
8. Sokolova D., Vengzhen G., Kravets A. An analysis of the correlation between the changes in satellite DNA methylation patterns and plant cell responses to the stress. *CellBio.* 2013. 2: 163–71.
9. Tsaftaris et al. Epigenetic mechanisms in plants and their implications in plant breeding. *Proceedings of the International Congress «In the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution».* 2003: 157–171.
10. Salmon A., Cloutault J. et al. Brassica oleracea displays a high level of DNA methylation polymorphism. *Plant Sci.* 2008. 174(1): 61–70.
11. Shan X., Wang X. et al. Analysis of the DNA methylation of maize (*Zea mays* L.) in response to cold stress based on methylation-sensitive amplified polymorphisms. *J. Plant Biol.* 2013. V.56: 32–8.
12. Scheid G., Scheid M. Epigenetic responses to stress: triple defense? *Curr Opin Plant Biol.* 2012. no 5: 568–573. doi: 10.1016/j.pbi.2012.08.007.
13. Luna E., Bruce T., Roberts M. et al. Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 2012. V.158: 844–853.
14. Rasmann S., De Vos M. et al. Herbivory in the previous generation primes plants for enhanced insect resistance. *Plant Physiol.* 2012. V.158: 854–863.
15. Becker C. et al. Spontaneous epigenetic variation in the *Arabidopsis thaliana* methylome. *Nature.* 2011. V.480: 245–249.
16. Herman J., Sultan S. Adaptive transgenerational plasticity in plants: Case studies, mechanisms, and implications for natural populations. *Front Plant Sci.* 2011. 2(102): 1–10.
17. Boyko A., Kovalchuk I. Genome instability and epigenetic modification - heritable responses to environmental stress? *Curr Opin Plant Biol.* 2011. 14(3): 260–266. doi: 10.1016/j.pbi.2011.03.003.
18. Tikunov Yu. M., Khrystaleva L. I. Application of ISSR Markers in the Genus *Lycopersicon*. *Euphitica.* 2003. V.131: 71–80.
19. Bartlett J., Stirling D. *PCR protocols.* Humana Press Inc., 2003.
20. Nei M., Crow F., Denniston C. A new measure of genetic distance. *Genetic distance.* 1974: 63–76.
21. Ausubel F. et al. Current Protocols in Molecular Biology. 2004.

#### REFERENCES

1. Lekjavichus Je. *Elementy obshchei teorii adaptatsii.* Vilnius: Mokklas, 1986 [in Russian].
2. Coleman M., Yin E., Peterson L. et al. Low dose irradiation alters the transcript profiles of human lymphoblastoid cells including genes associated with cytogenetic radioadaptive response. *Radiat. Res.* 2005. 164(41): 369–382.
3. Zhong L., Xu Y., Wang J. DNA-methylation changes induced by salt stress in wheat *Triticum aestivum*. *Afr J Biotech.* 2009. 8(22): 6201–6207.
4. Yi C., Zhang S., Liu X. Does epigenetic polymorphism contribute to phenotypic variances in *Jatropha curcas* L? *BMC Plant Biol.* 2010. 10: 1–14.
5. Sokolova D., Vengzhen G., Kravets A. The Effect of DNA Modification Polymorphism of Corn Seeds on Their Germination Rate, Seedling Resistance and Adaptive Capacity under UV-C Exposure. *Amer J Plant Biol.* 2014. 1(1): 1–14.
6. Sokolova D., Vengzhen G., Kravets A. Vliianie epigeneticheskoho polimorfizma semian kukuruzy na skorost ih prorastaniia i ustoichivost prorostkov k UF-S oblucheniiu. *Tsitologiya i hetetika.* 2014. 48(4): 31–38 [in Russian].

*А.П. Кравець, Д.А. Соколова, А.Н. Берестянська,  
О.Р. Шнуренко, М.А. Банникова, Б.В. Моргуни,  
Н.В. Кучук, Д.М. Гродзинський*

Институт клеточной биологии  
и генетической инженерии НАН Украины, Киев

**ВЗАИМОСВЯЗЬ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ  
ПЛАСТИЧНОСТИ ЭЛИТНЫХ СОРТОВ  
ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ И ПОЛИМОРФИЗМА  
ПРОФИЛЕЙ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК  
В ПРЕДЕЛАХ СОРТА**

Исследована взаимосвязь экологической пластичности восьми элитных сортов озимой пшеницы и полиморфизма профилей метилирования ДНК в пределах сорта у проростков семян, прорастающих с разной скоростью. Уровень полиморфизма, или «эпигенетическое расстояние», в спектрах рестрикционных фрагментов электрофореграмм разделения продуктов ПЦР количественно оценивали по показателю Неи. Установлено существование корреляции ( $R_s = 0,69$ ) между рангом сорта, определяемым по продуктивности и экологической пластичности, и уровнем полиморфизма профилей метилирования ДНК в пределах сорта. Показано, что наибольшее «эпигенетическое расстояние» ( $D \geq 0,1$ ) наблюдается у сортов с самым высоким рангом по продуктивности и экологической пластичности. Предложено использовать оценку показателя эпигенетического расстояния в селекции новых сортов для зон с неустойчивыми климатическими условиями.

*Ключевые слова:* пшеница, экологическая пластичность, эпигенетический полиморфизм, расстояние по Неи, рестрикционный анализ.

*O.P. Kravets, D.O. Sokolova, A.M. Berestyana,  
O.R. Shnurenko, M.O. Bannikova, B.V. Morgun,  
M.V. Kuchuk, D.M. Grodzinsky*

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering,  
the NAS of Ukraine, Kyiv

**CONNECTION BETWEEN  
ECOLOGICAL PLASTICITY  
OF ELITE WINTER WHEAT VARIETIES  
AND DNA METHYLATION PATTERN  
POLYMORPHISM WITHIN VARIETY**

Connection between ecological plasticity of eight elite winter wheat varieties and DNA methylation pattern polymorphism within variety using seedlings from seeds with different germination rate was investigated. Polymorphism degree or «epigenetic distance» in restriction fragments' range of PCR products was assessed using Nei index. Correlation ( $R_s = 0,69$ ) between variety grade determined by its productivity and ecological plasticity and degree of DNA methylation pattern polymorphism within variety was found. The prevalence of the greatest «epigenetic distance» ( $D \geq 0,1$ ) in most productive and ecologically plasticized varieties was proved. The application of the «epigenetic distance» assessment in selection of new varieties for areas with unstable climate conditions was recommended.

*Keywords:* wheat, ecological plasticity, epigenetic polymorphism, Nei distance, restriction analysis.

Стаття надійшла до редакції 27.07.15