УДК 581.143.6:58.085

ПОЛІМОРФІЗМ ДНК КАЛЮСНИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ, СТІЙКИХ ДО КУЛЬТУРАЛЬНОГО ФІЛЬТРАТУ *GAEUMANNOMYCES GRAMINIS* VAR. *TRITICI*, ЗА ВИКОРИСТАННЯ ISSR-МЕТОДУ

А.В. БАВОЛ, А.В. ЗЛАЦЬКА

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

Досліджено поліморфізм у спектрах продуктів ампліфікації ДНК калюсних ліній пшениці, стійких до культурального фільтрату (КФ) *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Показано високі надійність та інформативність методу ISSR-ПЛР для аналізу клітинних ліній пшениці, стійких до КФ. Найефективнішими виявились праймери з динуклеотидними повторами (GA)n, (AC)n, (TG)n та (AG)n, менший ступінь ефективності мали праймери з три-, тетра- та пентануклеотидними мотивами.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., ISSR-аналіз, поліморфізм ДНК, калюсні лінії, культуральний фільтрат.

Клітинна селекція є одним із сучасних методів біотехнології, що дає змогу отримувати рослини з новими цінними ознаками, зокрема стійкістю до хвороб [9, 12, 13]. Відомо, що вирощування рослинних тканин in vitro нерідко пов'язане з виникненням генетичних змін [4]. Сомаклональну мінливість вивчено у багатьох видів, але особливо цікаве це явище для сільськогосподарських культур, оскільки дає можливість отримувати форми, що можуть бути вихідним матеріалом для створення нових і поліпшення вже існуючих сортів.

На сьогодні для вивчення сомаклональної мінливості, яка виникає в умовах in vitro в клітинних культурах та індукованих із них рослинах-регенерантах, широко використовують молекулярні маркери (RAPD, ISSR, SSR) на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [2, 3, 8]. Застосування методу ПЛР дає змогу встановити рівень генетичної мінливості на різних етапах культивування, а також прояснити питання щодо природи і часу виникнення генетичних змін. Значного успіху досягнуто, зокрема, при застосуванні ISSR-аналізу [6, 7, 11]. Адже відомо, що багато генів оточено мікросателітними послідовностями, які можуть бути використані як маркерні. При ISSR-аналізі немає потреби в попередній інформації про ділянку ДНК, що ампліфікується. Цей підхід характеризується високою точністю і відтворюваністю результатів. ISSR-маркери мають домінантний тип успадкування.

Метою нашої роботи було виявлення поліморфізму ДНК клітинних ліній пшениці, стійких до КФ *G. graminis* var. *tritici*, за використання ISSR-методу.

© А.В. БАВОЛ, А.В. ЗЛАЦЬКА, 2009

Методика

Матеріалом для досліджень слугували калюсні лінії пшениці сорту-дворучки Зимоярка, отримані з верхівки пагона 3-добових проростків. Індукцію та культивування калюсів проводили за розробленою нами методикою [1].

Для отримання клітинних ліній, стійких до метаболітів *G. graminis* var. *tritici,* застосовували пряму клітинну селекцію. У дослідженнях використовували вихідний калюс, що утворювався на експлантатах. Як селективний агент застосовували КФ *G. graminis* var. *tritici*, який отримували при вирощуванні високовірулентних штамів гриба на рідкому поживному середовищі Чапека. Клітинну селекцію проводили за такою схемою: один пасаж на середовищі з сублетальною концентрацією КФ (50 %) — один пасаж на контрольному середовищі (без КФ). Так проведено чотири цикли добору. В результаті проведеної роботи ми виділили 19 калюсних ліній, які зберігали здатність до нормального росту за наявності сублетальних концентрацій селективного агента. Для молекулярно-генетичного аналізу було відібрано сім ліній. Як контроль використовували вихідний калюс, вирощуваний на середовищі без селективного чинника.

Екстрагували ДНК CTAB-методом [5]. ISSR-аналіз виконували за методикою ампліфікації з температурою відпалу 50 °С [10]. Продукти ампліфікації розділяли в 1,4 %-му агарозному гелі з наступною їх візуалізацією в ультрафіолетовому світлі з використанням бромистого етидію. Точний розмір продуктів ПЛР визначали за допомогою пакета прикладних програм TotalLab v.2.01 (Nonlinear Dynamics). Для роботи було довільно взято 34 ISSR-праймери з ди-, три-, тетра- і пентануклеотидними мотивами (табл. 1).

Стабільність прояву ампліконів перевіряли триразовим повторенням ампліфікації з одним і тим самим праймером на тому ж рослинному матеріалі.

Результати та обговорення

На першому етапі перевіряли рівень гомології нуклеотидних послідовностей вихідних калюсів за допомогою ISSR-ПЛР-методу. Для дослідження було взято 10 калюсних культур. Ми виявили високий рівень гомології ДНК вихідних калюсів, оскільки у всіх досліджуваних зразків у спектрах продуктів ампліфікації були ідентичні фрагменти. Практично всі використані праймери не реєстрували відмінності між калюсними культурами за винятком трьох (ISSR 8, ISSR 9, ISSR 20), у спектрах продуктів ампліфікації яких було виявлено поліморфні фрагменти. У подальшій роботі з дослідження поліморфізму стійких калюсних ліній їх не використовували.

Ми також з'ясували, що праймери ISSR 24 і ISSR 26, які містять модифіковані нуклеотиди, для досліджуваних зразків застосовувати недоцільно, оскільки не спостерігалося утворення стабільних та відтворюваних спектрів ампліконів. Іще шість праймерів (ISSR 4, ISSR 16, ISSR 18, ISSR 29, ISSR 30, ISSR 34) під час ампліфікації ДНК дали неперервний спектр продуктів і також були вилучені з подальшого аналізу.

У результаті встановлено, що з 34 праймерів тільки 23 виявилися придатними для подальшої роботи і характеризувалися стабільним та відтворюваним спектром ампліконів.

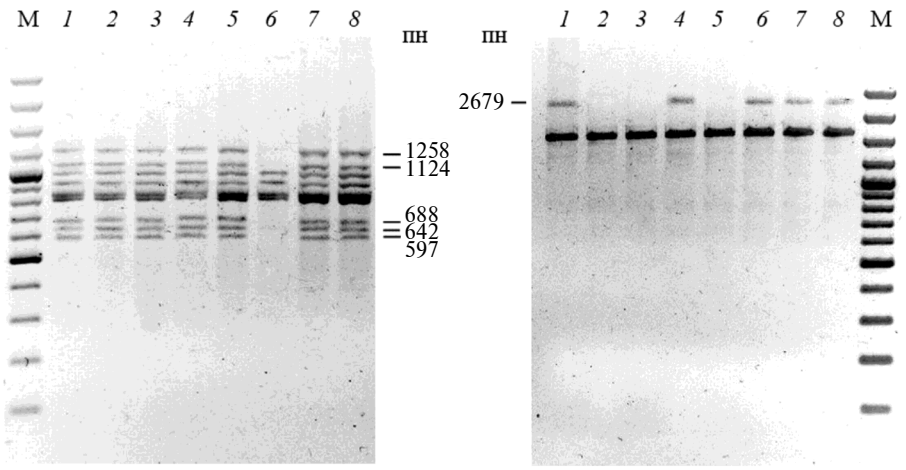
ТАБЛИЦЯ 1. Праймери для ISSR-аналізу, використані в дослідженні

Назва	Послідовність (5'→3')	Назва	Послідовність (5'→3')
ISSR 1	GA GA GA GA GA GA GA GA C	ISSR 18	GA GA GA GA GA GA GA T
ISSR 2	GGA GAG GAG AGG AGA	ISSR 19	AG AG AG AG AG AG AG AG G
ISSR 3	GAC AGA CAG ACA GAC A	ISSR 20	AG AG AG AG AG AG AG AG T
ISSR 4	GA GA GA GA GA GA GA GA	ISSR 21	AG AG AG AG AG AG AG AG CT
ISSR 5	TG TG TG TG TG TG TG TG G	ISSR 22	AG AG AG AG AG AG AG AG TA
ISSR 6	AC AC AC AC AC AC AC AC T	ISSR 23	G AG AG AG AG AG AG AG ATC
ISSR 7	TC TC TC TC TC TC TC TC G	ISSR 24	AG AG AG AG AG AG AG AG YC
ISSR 8	TC TC TC TC TC TC TC TC C	ISSR 25	CA CA CA CA CA CA CA CA RG
ISSR 9	AG AG AG AG AG AG AG AG C	ISSR 26	GT GT GT GT GT GT GT GT YA
ISSR 10	GGG TG GGG TG GGG TG	ISSR 27	AC AC AC AC AC AC AC AC YT
ISSR 11	GA GA GA GA GA GA GA GA CC	ISSR 28	AC AC AC AC AC AC AC AC YA
ISSR 12	AG AG AG AG AG AG AG AG TC	ISSR 29	CT CT CT CT CT CT CT CT CT G
ISSR 13	TG TG TG TG TG TG TG TG A	ISSR 30	AGC AGC AGC AGC AGC AGC T
ISSR 14	AC AC AC AC AC AC AC AC G	ISSR 31	CTC CTC CTC CTC CTC CTC A
ISSR 15	AC AC AC AC AC AC AC AC C	ISSR 32	GAG GAG GAG GAG GAG GAG C
ISSR 16	GT GT GT GT GT GT GT GT C	ISSR 33	ACC ACC ACC ACC ACC ACC G
ISSR 17	GA GA GA GA GA GA GA GA C	ISSR 34	AGC AGC AGC AGC AGC AGC G

На наступному етапі досліджували отримані калюсні лінії, стійкі до КФ *G. graminis* var. *tritici*, за допомогою відібраних праймерів.

Всього виявлено і проаналізовано 194 чітких ISSR-фрагменти. Із них 65 (33,5 %) були поліморфними. Залежно від праймера число поліморфних ампліконів змінювалось від 1 до 13. На рисунку наведено приклади отриманих спектрів продуктів ампліфікації з одним і п'ятьма поліморфними фрагментами. Розмір цих фрагментів варіював від 261 до 2846 пн (табл. 2).

Загалом для виявлення поліморфізму ДНК клітинних ліній, отриманих за допомогою клітинної селекції, праймери з динуклеотидним мотивом були ефективнішими, ніж праймери з три-, тетра- і пентануклеотидними повторами. Так, із використаних шести праймерів із три-, тетра- і пентануклеотидними послідовностями лише три були ефективними: ISSR 2 (GGAGA)n, ISSR 3 (GACA)n та ISSR 10 (GGGTG)n — відповідно



Спектри продуктів ампліфікації ДНК:

а — праймер ISSR 28 (5 поліморфних фрагментів); *б* — праймер ISSR 17 (1 поліморфний фрагмент); M — маркер молекулярної маси (100 bp Plus DNA Ladders, «Fermentas»); *1* — первинний калюс; *2—8* — калюс, стійкий до КФ *G. graminis* var. *tritici*

1, 5 і 4 поліморфні амплікони. Поліморфізм виявлено за допомогою чотирьох праймерів (ISSR 1, ISSR 11, ISSR 17, ISSR 23) із динуклеотидним мотивом (GA)n (нуклеотидна послідовність перших трьох наведених праймерів на 3′-кінці містить селективні послідовності − C або CC), два

ТАБЛИЦЯ 2. Молекулярно-генетична мінливість, виявлена за допомогою ISSR-аналізу

№	Праймер	Число ампліконів		Розмір поліморфних фрагментів, пн
		загальне	поліморфних	
1	ISSR 1	10	2	960, 1035
2	ISSR 2	11	1	391
3	ISSR 3	8	5	261, 406, 484, 725, 1111
4	ISSR 5	13	6	448, 690, 785, 795, 845, 1010
5	ISSR 7	10	4	460, 1000, 1390, 2347
6	ISSR 10	10	4	510, 1100, 1149, 1175
7	ISSR 11	10	2	674, 780
8	ISSR 12	14	13	270, 447, 469, 495, 650, 720, 757, 827, 1014, 1042, 1575, 1745, 2212
9	ISSR 13	4	2	509, 1785
10	ISSR 14	10	2	1039, 1799
11	ISSR 15	6	1	1108
12	ISSR 17	2	1	2679
13	ISSR 21	13	4	869, 944, 1479, 1673
14	ISSR 22	11	7	370, 528, 617, 654, 997, 1052, 1067
15	ISSR 23	8	3	1245, 2545, 2846
16	ISSR 25	14	3	525, 850, 943
17	ISSR 28	9	5	597, 642, 688, 1124, 1258

(ISSR 5, ISSR 13), що містили (TG)n послідовності та три (ISSR 12, ISSR 21, ISSR 22) з повтором (AG)n. Для виявлення поліморфізму ефективними були і три праймери (ISSR 14, ISSR 15, ISSR 28) з п'яти, що містять динуклеотидні мотиви (AC)n, та по одному з повторами (TC)n і (CA)n — відповідно ISSR 7 і ISSR 25.

Отже, поліморфізм у спектрах продуктів ампліфікації досліджуваних клітинних ліній виявлено за використання 17 праймерів. В умовах експерименту застосування саме цих праймерів дало змогу виявити зміни на молекулярно-генетичному рівні у калюсних лініях пшениці, стійких до КФ *G. graminis* var. *tritici*.

Слід зазначити, що відмінності між ISSR-спектрами досліджуваних калюсів полягали не тільки в наявності чи відсутності фрагментів, а й у різному ступені інтенсивності флюоресценції однакових за електрофоретичною рухливістю ампліконів. Варіації інтенсивності одного й того самого ISSR-фрагмента в спектрах досліджуваних зразків можливо пов'язані з неоднаковим числом копій ділянок ДНК, що багаторазово повторюються. Отже, виявлений нами поліморфізм ДНК у калюсних лініях, отриманих за допомогою клітинної селекції, можна пояснити не тільки процесами, пов'язаними з якісними змінами геному (делеції, вставки, заміни основ), а й зміною числа копій (ампліфікацією) певних ділянок ДНК.

1. *Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І.* Регенерація рослин із різних типів експлантатів м'якої пшениці // Физиология и биохимия культ. растений. — 2008. — **40**, № 2. — С. 150—156.
2. *Козыренко М.М., Фисенко П.П., Артюкова Е.В.* Анализ генетического разнообразия сортов и сомаклональных линий культурной сои (*Glicine max* (L.) Merr.) методом маркирования межмикросателлитных последовательностей (ISSR) // Биотехнология. — 2007. — № 1. — С. 3—13.
3. *Кузнецова О.И., Аш О.А., Хартина Г.А., Гостимский С.А.* Исследование растений-регенерантов гороха (*Pisum sativum* L.) с помощью молекулярных RAPD- и ISSR-маркеров // Генетика. — 2005. — **41**, № 1. — С. 71—77.
4. *Кунах В.А.* Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
5. *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. — **86**. — P. 705—712.
6. *Leroy X.J., Leon K., Branchard M.* Plant genomic instability detected by microsatellite primers // Electronic J. of Biotechnol. — 2000. — **3**. — P. 140—148.
7. *Leroy X.J., Leon K., Hily J.M. et al.* Detection of in vitro culture-induced instability through inter-simple sequence repeat analysis // Theor. and Appl. Genet. — 2001. — **102**. — P. 885—891.
8. *Ma Z.Q., Roder M., Sorrells M.E.* Frequencies and sequence characteristics di-, tri- and tetranucleotide microsatellites in wheat // Genome. — 1996. — **39**. — P. 123—130.
9. *Pauly M.H., Shane W.W., Gengenbach B.G.* Selection for bacterial blight phitotoxin resistance in wheat tissue culture // Crop. Sci. — 1987. — **27**, N 2. — P. 340—344.
10. *Roder M.S., Korzun V., Wendehake K. et al.* A microsatellite map of wheat // Genetics. — 1998. — **149**. — P. 2007—2023.
11. *Rostiana O., Niwa M., Marubashi W.* Efficiency of inter-simple sequence repeat PCR for detecting somaclonal variation among leaf-culture-regenerated plants of horseradish // Breeding Sci. — 1999. — **49**. — P. 245—250.
12. *Shawla H.S., Wenzel G.* In vitro selection of barley and wheat for resistance against *Helminthosporium sativum* // Theor. and Appl. Genet. — 1987. — **74**. — P. 841—845.
13. *Shawla H.S., Wenzel G.* Resistant wheat plants against *Helminthosporium sativum* from embryo derived callus cultures // Wheat Inf. Serv. — 1989. — **69**, N 1. — P. 8—12.

Отримано 10.07.2008

ПОЛИМОРФИЗМ ДНК КАЛЛЮСНЫХ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ, УСТОЙЧИВЫХ К КУЛЬТУРАЛЬНОМУ ФИЛЬТРАТУ *GAEUMANNOMYCES GRAMINIS* VAR. *TRITICI*, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ISSR-МЕТОДА

А.В. Бавол, А.В. Злацкая

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследовали полиморфизм в спектрах продуктов амплификации ДНК каллюсных линий пшеницы, устойчивых к культуральному фильтрату (КФ) *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Показаны высокие надежность и информативность метода ISSR-ПЦР для анализа клеточных линий пшеницы, устойчивых к КФ. Наиболее эффективными оказались праймеры с динуклеотидными мотивами (GA)n, (AC)n, (TG)n и (AG)n. Праймеры с три-, тетра- и пентануклеотидными повторами оказались менее эффективными.

DETECTION OF DNA POLYMORPHISM OF CELLULAR LINES OF WHEAT RESISTANT TO *GAEUMANNOMYCES GRAMINIS* VAR. *TRITICI* CULTURE FILTRATE, THROUGH INTER-SIMPLE SEQUENCE REPEAT ANALYSIS

A.V. Bavol, A.V. Zlatska

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The efficiency of ISSR-PCR method for analysis of resistant to culture filtrate cellular lines of wheat is shown. Among 34 ISSR-primers with di-, tri-, tetra- and pentanucleotide repeats, applied in present work, 17 appeared effective for detection of polymorphism between lines. The most effective were primers with dinucleotide repeats (GA)n, (AC)n, (TG)n and (AG)n.

Key words: *Triticum aestivum* L., ISSR analysis, DNA polymorphism, cellular lines, culture filtrate.