

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ**

БАВОЛ АНДРІЙ ВАСИЛЬОВИЧ



УДК 561.143.6.581.085.144

**КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ НА СТІЙКІСТЬ ДО
GAEUMANNOMYCES GRAMINIS VAR. *TRITICI***

03.00.15 – генетика

**Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук**

Київ-2010

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. На врожайність пшениці, важливої сільськогосподарської культури України, впливає багато чинників, у тому числі рівень стійкості до хвороб. Кореневі гнилі вважаються одними з найбільш небезпечних хвороб цієї культури. Офіобольозна коренева гниль, збудником якої є *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, поширена по всій території України, за невеликим виключенням (Новохатка та ін., 1990). Слід врахувати, що збитки від неї значно вищі ніж ті, що наводяться в літературі, оскільки хвороба часто протікає в прихованій формі, коли збудник розвивається в судинах коренів рослин, закупорюючи їх, проте зовні не виявляється.

Одним з найбільш екологічно безпечних та дешевих засобів боротьби є вирощування стійких сортів. Проте джерел стійкості до патогену в роді *Triticum* до цього часу не знайдено (Freeman, Ward, 2004). Гени стійкості до даного збудника є у вівса, проте ці види надто віддалені, щоб здійснити їх перенесення класичними методами. Враховуючи те, що використання традиційних методів селекції у даному випадку неможливе, починають використовувати нетрадиційні підходи, зокрема біотехнологічні (Анапиев и др., 2002). У зв'язку з цим, значні перспективи може мати технологія клітинної селекції, головна перевага якої полягає в можливості ведення добору нових генотипів у контрольованих умовах, зокрема на селективному фоні, створеному за участі токсичних продуктів життєдіяльності патогенних мікроорганізмів. Експериментально доведено, що стійкі до біотичних факторів генотипи можна добирати в культурі *in vitro* і залучати їх до селекційного процесу (Lu et al., 2000; Калашникова, 2003; Yang et al., 2006). На основі застосування методів селекції *in vitro* у пшениці вже одержано рослини, стійкі до фузаріозу (Волощук, 2006), септоріозу (Джос, Калашникова, 2000; Лаврова, 2002) та гельмінтоспоріозу (De Cristaldo et al., 1997). Це свідчать про можливість використання біотехнологічних підходів для розширення генетичного потенціалу та поліпшення існуючих генотипів.

Застосування методів клітинної селекції потребує поглибленого вивчення низки теоретичних та методичних питань. Зокрема, недостатньо досліджені генетична активність метаболітів патогенів, а також взаємозв'язки прояву стійкості на рівні клітин, тканин і цілого організму. Важливим є вивчення особливостей індукції морфогенезу і соматональної мінливості в селективних умовах. На сьогодні ще недостатньо відомостей про мінливість геному пшениці *in vitro* та впливу умов культивування на спадковий апарат клітин. Разом з тим, вивчення особливостей геномної мінливості культивованих клітин за дії стресових чинників та отриманих з таких культур рослин-регенерантів буде сприяти встановленню специфічних генетичних механізмів, які обумовлюють мінливість в процесі клітинної селекції та отримання стійких форм. Вирішення цих питань є основою для вдосконалення біотехнологічних прийомів розширення генетичного потенціалу пшениці і отримання стійких генотипів. Крім того, проведення таких робіт є актуальним не тільки в зв'язку із біотехнологічними

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України,
м. Київ

Науковий керівник :

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Дубовна Оксана Василівна,
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
старший науковий співробітник відділу генетичних
основ гетерозису

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Тищенко Олена Миколаївна,
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
виконувач обов'язки завідувача відділу генетичної
інженерії

кандидат біологічних наук, старший науковий
співробітник

Спірідонова Катерина Василівна,

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
старший науковий співробітник відділу генетики
клітинних популяцій

Захист дисертації відбудеться "18" березня 2010 р. о 12⁰⁰ годині на
засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.212.01 при Інституті фізіології
рослин і генетики НАН України за адресою: 03022, Київ, вул. Васильківська,
31/17

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту фізіології рослин і
генетики НАН України за адресою: 03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17

Автореферат розіслано "15" лютого 2010р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



Мордерер Є.Ю.

аспектами застосування нових підходів у селекції, але й для розвитку фундаментальних питань мутагенезу, генетики та молекулярної біології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась у відділі генетичних основ гетерозису Інституту фізіології рослин і генетики НАН України за темою НДР “Розробка біотехнологічних основ використання екологічно безпечних речовин для індукції стійкості рослин до хвороб” (№ держ. реєстрації 0107U004025, 2007-2011 рр.).

Мета та задачі дослідження. Метою роботи було отримання *in vitro* стійких до *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* рослин пшениці та дослідження особливостей мінливості геному *Triticum aestivum* L. у процесі добору стійких форм.

Відповідно до цієї мети були поставлені такі завдання:

1. Оптимізувати умови калосоутворення і регенерації в культурі різних типів експлантів та дослідити вплив біологічно активних речовин на процеси морфогенезу.
2. Розробити ефективну систему селекції *in vitro* м'якої пшениці на стійкість до *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* у культурі верхівок пагонів проростків.
3. Вивчити особливості впливу метаболітів патогену на генетичну структуру клітинних популяцій калосів пшениці у процесі добору стійких форм та рівень плідності рослин-регенерантів.
4. Дослідити поліморфізм ДНК калосних ліній пшениці, стійких до культурального фільтрату *G. graminis* var. *tritici*, та індукованих з них рослин-регенерантів.
5. Провести комплексну оцінку стійкості отриманих рослин до збудника офіобольозної кореневої гнилі.

Об'єкт досліджень – стійкість м'якої пшениці до офіобольозної кореневої гнилі.

Предмет досліджень – селекція *in vitro* *Triticum aestivum* L. на стійкість до метаболітів *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*.

Методи досліджень. Методи культури тканин рослин, клітинної селекції, цитологічні та проточної цитометрії, ISSR–ПІП, електрофорез ДНК в агарозних гелях, фітопатологічні та методи статистичної обробки даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше біотехнологічним шляхом отримано рослини м'якої пшениці, стійкі до офіобольозної кореневої гнилі. Розроблено комплекс біотехнологічних прийомів, що дозволило удосконалити процес отримання рослин м'якої пшениці *de novo* із тканин вегетативних органів та підвищити регенераційну здатність калосних культур, стійких до культурального фільтрату (КФ) *G. graminis* var. *tritici*.

Вперше на цитологічному рівні вивчено дію токсичних метаболітів *G. graminis* var. *tritici* на клітини калосних культур м'якої пшениці. З'ясовано, що генотоксична дія КФ проявляється у кластогенних пошкодженнях структури хромосом та спричиняє загибель клітин шляхом некрозу. Встановлено, що стійкі до КФ лінії, характеризуються стабільно-гетерогенною структурою клітинних

популяцій, постійним рівнем (5-7%) і схожим типом структурних перебудов хромосом. Показана цитологічна нестабільність рослин-регенерантів, отриманих зі стійких до КФ калюсів.

Вперше показано, що стійкі до КФ *G. graminis* var. *tritici* калюсні лінії пшениці характеризуються наявністю змін у нуклеотидних послідовностях ДНК. У таких форм виявлено специфічні ISSR-амплікони довжиною 2347 пн та 1745 пн, Ці амплікони, також наявні у стійких рослин-регенерантів R₀ та рослин R₁, що може свідчити про потенційну можливість їх використання, як маркерів стійкості до офіобользу.

Наукова новизна підтверджена патентом на винахід.

Практичне значення одержаних результатів. Одержано рослини пшениці, стійкі до *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, які можливо використовувати як джерела стійкості до офіобользової кореневої гнилі. Розроблені методи добору *in vitro* та оцінки генотипів пшениці на стійкість до офіобользу можуть застосовуватися, як елементи біотехнологічних, молекулярно-генетичних та селекційних програм.

Обґрунтовано та запропоновано до практичного використання спосіб підвищення регенераційної здатності калюсних ліній м'якої пшениці, стійких до КФ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, який дозволяє прискорити процес отримання стійких до офіобользової кореневої гнилі рослин-регенерантів та збільшити їх кількість.

Одержані результати вносять вклад у розробку генетичних основ клітинної селекції пшениці. Матеріали дисертації можуть представляти інтерес для наукових закладів генетико-селекційного напрямку та бути використані при викладанні генетики і біотехнології рослин у вузах.

Особистий внесок здобувача. Результати досліджень, представлені у дисертації, одержано автором роботи у відділі генетичних основ гетерозису Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням Бавола А. В. Вибір об'єкту і напрямку досліджень, аналіз та інтерпретацію отриманих результатів проведено спільно з науковим керівником – д.б.н. О. В. Дубровоною. Автором особисто досліджені цитологічні та молекулярно-генетичні особливості експериментального матеріалу; розроблено систему клітинної селекції; проведено добір та оцінку стійких форм. Окремі експерименти та аналізи виконано спільно із співробітниками відділів генетичних основ гетерозису та генетичної інженерії ІФРГ НАН України. Ці дані викладено в спільних публікаціях, авторство здобувача в яких складає 60-90 %.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були представлені та доповідались на VIII з'їзді Українського товариства генетиків і селекціонерів (Алушта, 2007); III International young scientists conference: Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution (Odessa, 2007); X Конференції молодих дослідників "Сучасний стан і пріоритети розвитку фізіології рослин, генетики та біотехнології" (Київ, 2007); IV та V Міжнародній конференції "Фактори експериментальної еволюції організмів" (Алушта, 2008, 2009); III

Международной научной конференции: “Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений” (Минск, 2008); IX International Conference “The Biology of plant cells in vitro and biotechnology” (Zvenigorod, 2008), V Міжнародній конференції “Геном рослин” (Одеса, 2008), I Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих учених “Фундаментальні та прикладні дослідження в біології” (Донецьк, 2009); Международной научно-практической конференции “Теоретические основы применения биотехнологии, генетики и физиологии растений в современной селекции растений и растениеводстве” (Минск, Люблин, 2009); IV з’їзді Українського товариства фізіологів рослин (Київ, 2009), а також доповідались на наукових семінарах відділу генетичних основ гетерозису та генетичної інженерії ІФРГ НАН України.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 18 наукових праць. З них: 6 статей у провідних фахових виданнях, 11 публікацій – у матеріалах та тезах конференцій і з’їздів, 1 патент України.

Обсяг та структура дисертації. Дисертація викладена на 173 сторінках машинописного тексту, складається з вступу, п’яти розділів, узагальнення, висновків та списку посилань (302 джерела). Робота містить 22 таблиці та 37 рисунків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

У розділі висвітлено досягнення вітчизняних та зарубіжних учених з клітинної селекції пшениці на стійкість до біотичних та абіотичних стресових чинників довкілля. Розглянуто основні принципи, напрямки, можливості та проблеми клітинної селекції на стійкість до хвороб, зокрема кореневих гнилей. Приділено увагу методам оцінки і добору *in vitro*. Наведено сучасні уявлення про мінливість геному рослин в культурі тканин, детально висвітлено причини і механізми таких змін. Узагальнено відомості про соматоклональну варіабельність рослин-регенерантів і практичне значення останньої.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для введення в культуру *in vitro* використовували зріле та незріле насіння м’якої пшениці сортів Смуглянка, Колумбія, Солоха, Веснянка, Переяславка, Подольанка, Зимоярка та Хуторянка. Насіння пророщували на модифікованому живильному середовищі МС (Murashige, Skoog, 1962) без фітогормонів. Материнські рослини культивували в скляному посуді, об’ємом 200 мл, в який було розлито по 30 мл середовища.

Культура калусної тканини була отримана із різних типів екплантів (листіків, верхівки пагона) рослин, попередньо вирощених в умовах *in vitro*, а також незрілих зародків, виділених з інтактних рослин. Для індукції калусу використовували середовище МС та регулятори росту – 2,4-Д і піклорам у концентраціях 0,5-2,0 мг/л. Подальше культивування отриманих калусних

культур здійснювали на безгормональному середовищі МС. Калос вирощували при освітленні 3-4 клк, відносній вологості повітря 70% і 16-годинному фотоперіоді.

Для отримання клітинних ліній, стійких до метаболітів *G. graminis* var. *tritici*, застосовували пряму та ступінчасту клітинну селекцію. У роботі використовували калос, індукований з верхівок пагонів 3-добових проростків сорту Зимоярка. Для проведення клітинної селекції калоси масою 3-5 мг висаджували в чашки Петрі (по 40 в кожній) у 10 повторностях. В якості селективного агента використовували культуральний фільтрат *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, який отримували при вирощуванні високовірулентних штамів гриба на рідкому поживному середовищі Чапека. КФ стерилізували шляхом пропускання через фільтр з діаметром пор 0,22 мкм та додавали до модифікованого середовища МС.

Для індукції морфогенезу стійкі калосні лінії переносили на модифіковане регенераційне середовище МС, доповнене КФ (50%). Після 3 тижнів культивування морфогенний калос висаджували на свіже середовище без КФ. Калос, що утворював пагони, переносили на середовище для укорінення, яке містило 0,2 мг/л НОК. Укорінені пагони пересаджували в стерильний пісок і поміщали у вологу камеру на 7-14 діб та по мірі розвитку переносили в ґрунт.

Цитогенетичний аналіз калосів та рослин-регенерантів здійснювали, виключаючи передфіксаційний вплив на мітоз. Готували тимчасові давлені препарати за стандартною методикою (Паушева, 1988). Частоту та типи хромосомних перебудов визначали паралельно з підрахунком числа хромосом у клітинах. Генотоксичну дію культурального фільтрату виявляли шляхом аналізу частот виникнення різних типів цитогенетичних аномалій у клітинах калосних культур. Для вивчення рівня плідності рослин-регенерантів та дослідження генетичної структури клітинних ліній використовували автоматичний аналізатор "Partec" (Німеччина).

Молекулярно-генетичний аналіз калосних ліній пшениці, стійких до культурального фільтрату *G. graminis* var. *tritici*, індукованих з них регенерантів та рослин R_1 , здійснювали за допомогою ISSR-методу. ДНК калосних культур та рослин екстрагували згідно методики Деллапорта (Dellaport et al., 1983). Ампліфікацію здійснювали за описаною схемою (Roder et al., 1998). У дослідженнях застосовували 34 довільних ISSR-праймери, з ди-, три-, тетра- та пентануклеотидними мотивами, що показали свою ефективність при аналізі злакових культур (Ma et al., 1996). Продукти ампліфікації розділяли в 2%-вому агарозному гелі з додаванням бромистого етидію. Для оцінки поліморфізму та визначення рівня дивергенції між досліджуваними об'єктами дані ISSR-Г.ЛП були представлені у вигляді матриці бінарних ознак. Точний розмір фрагментів ДНК визначали за допомогою пакету прикладних програм TotalLab v2.01 (Nonlinear Dynamics), відносно маркера молекулярної маси. Поліморфізм спектрів ПЛП оцінювали методом попарного незваженого кластерування з арифметичним усередненням (UPGMA) за допомогою пакету прикладних програм POPGENE v1.32 (Yeh et al., 1999). Дендрограму генетичних відстаней за Жаккардом (Sneath,

Socal, 1973) між досліджуваними об'єктами будували з використанням програми MEGA v3.1 (Kumar et al., 2005).

Для виявлення ступеня фрагментації ДНК здійснювали електрофорез сумарної ДНК в 1,5%-вому агарозному гелі, що містив 0,5 мкг/мл бромистого етидію, в 1xTBE буфері за напруги 3-4 В/см протягом 4-6 год.

Оцінку стійкості рослин-регенерантів до збудника офіобольозної кореневої гнилі здійснювали, поміщаючи їх на середовище МС з 50% КФ. Стійкість рослин R₁ оцінювали шляхом пророщування насіння на фільтрувальному папері, змоченому культуральним фільтратом (100%), за допомогою методу агарових дисків (Bateman, 1988; Крючкова, 2005), а також на штучному інфекційному фоні в умовах вегетаційних дослідів.

Експериментально отримані дані обробляли за допомогою методів статистичного аналізу (Доспехов, 1985; Лакин, 1990).

РОЗРОБКА СИСТЕМИ *IN VITRO* ДЛЯ ОТРИМАННЯ РОСЛИН ПШЕНИЦІ, СТІЙКИХ ДО ОФІОБОЛЬОЗУ

Для проведення робіт з отримання стійких до стресових чинників рослин біотехнологічним шляхом потрібно мати ефективну систему *in vitro*, яка ґрунтується на використанні певного типу експланта. Незрілі зародки є традиційним експлантом у пшениці, проте їх застосування має ряд обмежень, оскільки вони доступні тільки короткий проміжок часу протягом вегетаційного періоду, а калюсні культури, отримані з них, швидко втрачають регенераційний потенціал (Ozgen et al., 1996; Machii et al., 1998). Останнім часом значно зріс інтерес до листових сегментів та верхівок пагонів проростків, як найбільш перспективних експлантів для злакових культур (Sharma et al., 2005; Haliloglu, 2006; Vu et al., 2007). Перевагою даних типів експлантів є можливість подолання генотипічних особливостей форм, що характеризуються низьким регенераційним потенціалом, а також отримання значної кількості вихідного матеріалу за короткий час. Враховуючи це, у наших дослідженнях ми використовували різні типи експлантів, зокрема незрілі зародків інтактних польових рослин, ізольованих на 12-15 добу після запилення, базальні сегменти листків стерильних 2-6-добових проростків, розміром 1-2 мм (листові експланти), а також верхівки пагонів стерильних 1-3-добових проростків, розміром 1,2-2 мм.

Введення пшениці в культуру in vitro. Для введення в культуру *in vitro* застосовували як експланти, отримані з інтактних рослин, що вирощувалися в умовах відкритого ґрунту, так і відокремлені з проростків, попередньо отриманих у стерильних умовах. Незрілі зернівки та зріле насіння поверхнево стерилізували відповідно до розроблених нами способів (Бавол та ін., 2008). За такого підходу ефективність стерилізації складала 90-98%. Життєздатність насіння (співвідношення кількості пророслих насінин до загальної кількості висаджених) за такого способу стерилізації складала 90-100% і не відрізнялася у різних сортів.

Дослідження впливу типу та віку експланта на частоту калюсогенезу та регенерації пагонів. Нами показано, що досліджувані сорти м'якої пшениці в

культури незрілих зародків характеризуються низькою здатністю як до індукції морфогенного калюсу, так і до регенерації пагонів. Найбільша частота утворення морфогенного калюсу виявлена у озимих сортів Смуглянка та Веснянка, і складала $35,0 \pm 1,4\%$ та $31,4 \pm 1,3\%$ - відповідно. У вищезгаданих сортів виявилось досить ефективним застосування низькотемпературної обробки ($+4\text{ }^\circ\text{C}$) незрілого насіння протягом двох діб, що дозволило підвищити частоту утворення морфогенного калюсу у них до 51-55%. Найбільшу частоту регенерації серед досліджених форм мали озимі сорти Смуглянка та Веснянка – $22,1 \pm 1,2\%$ і $20,3 \pm 1,1\%$ відповідно, а також сорти-дворучки Зимоярка і Хуторянка - по $17,2 \pm 1,0\%$.

Експерименти по вивченню чинників, які впливають на процеси дедиференціації та диференціації клітин листового експланта, підтвердили, що ембріогенний потенціал культури тканин листка злаків, визначається віком листка, його положенням на пагоні, а також розміром експланта. Частота утворення морфогенного калюсу була найбільшою у експлантів сорту Веснянка ($17,2 \pm 1,0\%$) та у сортів-дворучок Зимоярка і Хуторянка – $12,5 \pm 0,9\%$, отриманих з проростків тридобового віку, та поступово знижувалася із збільшенням віку проростків – частота калюсогенезу з листових сегментів шестидобових проростків була найменшою (2-5%). Отримані дані показали, що найбільша регенераційна здатність також була притаманна калюсам, індукованим з листових експлантів, відокремлених з тридобових проростків, зокрема для сорту Зимоярка ця величина складала $7,3 \pm 0,4\%$, а для сортів Смуглянка та Хуторянка $6,2 \pm 0,3\%$. Проте така частота регенерації пагонів є недостатньою для проведення робіт із клітинної селекції.

В якості експлантів ми також використовували верхівку пагона 1-3 добових проростків. Найбільша частота утворення морфогенного калюсу спостерігалась у озимих сортів Смуглянка ($31,2 \pm 1,3\%$), Веснянка ($30,2 \pm 1,3\%$) та сортів-дворучок Зимоярка ($24,3 \pm 1,2\%$) і Хуторянка ($22,1 \pm 1,1\%$). Подібно до листових сегментів, максимальною регенераційною здатністю характеризувались калюси, отримані з верхівок пагонів тридобових проростків. Найбільша частота їх регенерації відмічена у сортів Зимоярка та Хуторянка – $14,4 \pm 0,9\%$ і $13,9 \pm 0,9\%$ відповідно.

Оптимізація складу живильного середовища для підвищення частоти калюсогенезу та регенерації пагонів. Для підвищення частоти калюсоутворення ми використовували модифіковане середовище МС-2/3, яке додатково містило аспарагінову кислоту (150 мг/л), азотнокисле срібло (10 мг/л) та піклорам (4-аміно-3,5,6-трихлорпіколінова кислота) (2 мг/л). Калюси, отримані на цьому середовищі з верхівки пагона проростка зберігають життєздатність та морфогенну активність довше (в середньому на 3 пасажі) порівняно з культурами іншого походження. Для індукції регенерації пагонів нами було використано модифіковане середовище МС-3/7, яке додатково містило аспарагінову кислоту (150 мг/л), азотнокисле срібло (10 мг/л), гліцин (3 мг/л), аденін (20 мг/л), піклорам (0,5 мг/л) та БАП (1 мг/л), що дозволило підвищити частоту регенерації з калюсних культур, отриманих з верхівки пагона на $39,4\text{--}96,5\%$, що достовірно не поступається частоті регенерації з калюсу, індукованому з незрілих зародків.

Зокрема, частота регенерації пагонів у культурі верхівок пагонів проростків сорту Зимоярка досягала 28,3±1,3%.

Дослідження впливу хітозану на калусоутворення з експлантів верхівки пагона проростка, ріст калусних культур та процеси регенерації пагонів показало, що процеси морфогенезу залежать від концентрації полісахариду в середовищі і його молекулярної маси. Відповідно до отриманих результатів, хітозан з молекулярною масою 10 кДа має здатність стимулювати ріст калусних культур пшениці та регенерацію пагонів у концентрації 25 мкг/мл.

Таким чином, у результаті проведеної роботи нами розроблена система *in vitro*, яка включає: схему стерилізації вихідного матеріалу, використання як ексланта верхівки пагона тридобових проростків, модифіковані живильні середовища для калусогенезу і регенерації пагонів, що була використана для проведення робіт з клітинної селекції пшениці на стійкість до *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*.

СЕЛЕКЦІЯ *IN VITRO* ПШЕНИЦІ НА СТІЙКІСТЬ ДО *GAEUMANNOMYCES GRAMINIS* VAR. *TRITICI*

На першому етапі досліджень була визначена токсичність культурального фільтрату, залежно від часу культивування гриба *G. graminis* var. *tritici*. Виявлено, що найбільша його токсичність спостерігається на 55-60 добу культивування, тому у подальшій роботі використовували КФ саме цього строку вирощування. Також була визначена чутливість калусної тканини м'якої пшениці до різних концентрацій селективного агента в живильному середовищі. Відмічено, що наявність навіть мінімальної концентрації 10% КФ у живильному середовищі пригнічувало ріст калусів, зменшувало приріст їх маси, викликало появу некротичних плям брунатного або чорного забарвлення. Концентрація 70% селективного чинника виявилася летальною. Найбільш оптимальною для подальшої роботи була доза 50% КФ. За такої концентрації залишалися життєздатними ~10% калусів. Для отримання форм, стійких до метаболітів *G. graminis* var. *tritici*, застосовували пряму та ступінчасту клітинну селекцію.

Пряму клітинну селекцію проводили за наступною схемою: 1 пасаж на середовищі з сублетальною концентрацією КФ (50%) – 1 пасаж на контрольному середовищі (без КФ). Таким чином проведено чотири цикли добору і відібрано 7 штаблів, які зберігали здатність рости на селективному середовищі. З них було отримано 4 стійкі лінії (№ 2, 7, 19 та 24), які не тільки мали приріст маси на селективному середовищі (табл. 1), а й зберігали морфогенетичний потенціал.

Поряд з експериментами по прямому перенесенню на селективні середовища, проводили ступінчасту селекцію за схемою: 1 пасаж на селективному середовищі з КФ (30%) → 1 пасаж на контрольному середовищі (без КФ) → 1 пасаж на селективному середовищі з КФ (40%) → 1 пасаж на контрольному середовищі (без КФ) → 1 пасаж на селективному середовищі з КФ (50%) → 1 пасаж на контрольному середовищі (без КФ) → 1 пасаж на селективному середовищі з КФ (50%) → 1 пасаж на контрольному середовищі (без КФ). У

результаті послідовного добору виділено варіанти, які характеризувались здатністю до росту на селективному середовищі з КФ (50%) та стабільно зберігали ознаку стійкості протягом 4 пасажів.

Таблиця 1

Відносний приріст сирі маси у стійких до культурального фільтрату *G. graminis* var. *tritici* калюсних ліній пшениці

Лінія	Маса калюсу, г ($M \pm m$)		
	7 доба	14 доба	21 доба
Контроль	0,06 \pm 0,01	-	-
Лінія 2	0,21 \pm 0,03	0,37 \pm 0,06	0,47 \pm 0,07
Лінія 7	0,11 \pm 0,03	0,22 \pm 0,05	0,29 \pm 0,05
Лінія 19	0,23 \pm 0,04	0,31 \pm 0,04	0,40 \pm 0,04
Лінія 24	0,19 \pm 0,04	0,25 \pm 0,05	0,33 \pm 0,05

Методом ступінчастої селекції було відібрано 32 стійкі калюсні варіанти, проте в подальшому з них не вдалося отримати рослини-регенеранти, оскільки у таких форм спостерігався ризогенез, або ж утворювалися пагони, які поступово припиняли свій ріст, і не утворювалося повноцінне коріння.

Для диференціації стійких та нестійких клітинних ліній також був використаний один із показників наявності незворотних змін в ядрі клітин – фрагментація ДНК. Показано, що під впливом КФ *G. graminis* var. *tritici*, на відміну від стійких ліній, у ДНК нестійких форм спостерігалась інтенсивна деградація з утворенням неперервного спектра фрагментів широкого діапазону молекулярних мас (рис. 1).

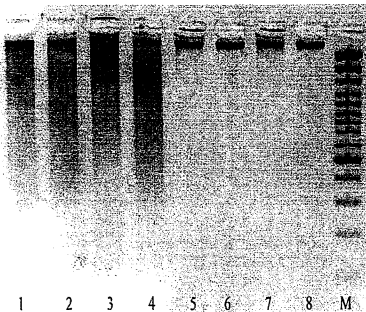


Рис. 2. Електрофореграма сумарної ДНК калюсів, що культивувались на селективному середовищі: 1-4 – нестійкий калюс; 5-8 стійкі клітинні лінії (лінії 2, 7, 19, 24 – відповідно), М - маркер молекулярної маси (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder).

Зазначимо, що олігонуклеосомної фрагментації ДНК, що характерна для прогрованої загибелі клітин, не спостерігалось. Це свідчить про те, що культуральний фільтрат *G. graminis* var. *tritici* викликає загибель клітин пшениці шляхом некрозу. Крім того ступінь фрагментації ДНК може бути використана як критерій добору стійких клітинних форм.

Проблема отримання рослин із стійких клітинних ліній є однією із найбільш важливих та складних у клітинній селекції. Регенерація з таких форм значно ускладнена, а частота індукції рослин дуже низька (Калашникова, 2003). У наших дослідженнях частота регенерації рослин на середовищі МС-3 зі стійких до КФ клітинних ліній була на рівні 2-5%, що достовірно нижче ніж у контролі, де цей показник складав 28%. Для підвищення регенераційної здатності стійких калюсних культур м'якої пшениці та збільшення кількості рослин-регенерантів, нами було модифіковано середовище МС-3/7 (Патент України № 42324), що дозволило підвищити частоту регенерації до 10-22%.

Для масового укорінення пагонів найкращим виявилось середовище МС з половинним вмістом макроелементів та НОК у концентрації 1 мг/л. Через 15-20 діб на такому середовищі отримували ~60% рослин-регенерантів з повноцінною кореневою системою.

Оцінка стійкості рослин до офіобольозної кореневої гнилі. Для аналізу отриманих форм була проведена комплексна оцінка стійкості рослин до збудника офіобольозу та його метаболітів. Із 56 отриманих ліній R_1 – 4 виявились стійкими (середній бал ураження кореневої системи збудником офіобольозу складав 0-0,5), 17 – мали середній бал ураження 0,6-1,5, а інші за цим показником достовірно не відрізнялися від рослин вихідного сорту (середній бал ураження кореневої системи рослин сорту Зимоярка збудником офіобольозу складав 2,5). Аналіз насіння R_2 методом агарових дисків підтвердив стійкість рослин до збудника офіобольозу та показав, що середній бал ураження кореневої системи рослин R_2 не перевищує значення, отримані для рослин R_1 .

Таким чином, вперше біотехнологічним шляхом отримано рослини пшениці, стійкі до *G. graminis* var. *tritici*.

МІНЛИВІСТЬ ГЕНОМУ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ У ПРОЦЕСІ ДОБОРУ СТІЙКИХ ДО ОФІОБОЛЬЗУ ФОРМ

Цитогенетичний та цитометричний аналіз калюсних культур. Цитогенетичний аналіз калюсних культур показав високий ступінь гетерогенності і наявність значних розходжень у характері протікання цитологічних процесів між калюсами, що вирощувалися на контрольному та селективному середовищах. Вже у першому пасажі відмічено достовірне збільшення числа поліплоїдних клітин (>6х) до 26,1±4,1%, в той час, як в контролі цей показник складав 12,6±3,3% (рис. 3).

Поряд з поліплоїдизацією спостерігалось достовірне збільшення кількості анеуплоїдних клітин до 15,2±3,9%, порівняно з 5,8±2,4 % у контролі. Це явище пов'язане із втратою хромосом у мітозі й часто супроводжувалося наявністю мікроядер поблизу інтерфазних ядер. У цілому, популяції клітин калюсу як контрольного, так і того, що вирощувався на селективному середовищі, є досить гетерогенними за числом хромосом, кількість яких у клітинах складала від 7 до понад 84.

На селективному середовищі у калосів визначається значна кількість клітин з відхиленнями від нормального процесу мітозу. Виявлено як хромосомні аберації, так і порушення веретена поділу у вигляді багатополосних мітозів. Відмічено клітини з двома та більше ядрами, а також клітини з фрагментованими ядрами. Кількість клітин з аномаліями поділу у калосів на селективних середовищах коливалась від 15 до 18 відсотків, у той час як у контролі їх число не перевищувало 6%, хоча спектр аномалій мітозу був приблизно однаковим.

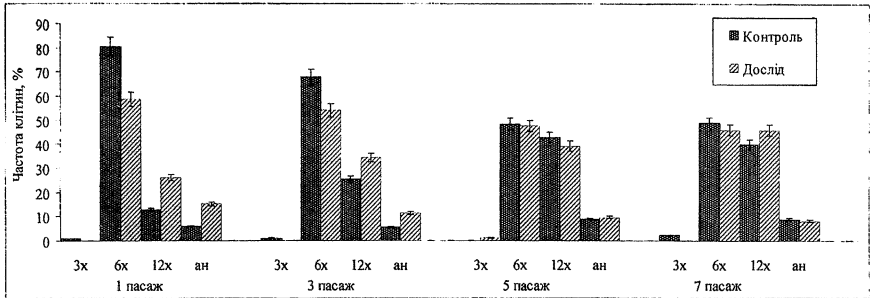


Рис. 3 Розподіл за числом хромосом у клітинах калусних культур пшениці в процесі культивування на контрольному та селективному середовищах (на прикладі лінії №2): по вертикалі – частота клітин, %; по горизонталі – кількість клітин з числом хромосом (ан – анеуплоїдні клітини).

В анафазах відмічено хроматидні й хромосомні мости, одиничні та парні фрагменти, а також множинні порушення, що свідчить про наявність мутаційного процесу, який викликає порушення цілісності хромосом. У першому пасажі кількість клітин з абераціями у контрольному калюсі була на рівні $2,9 \pm 1,7\%$, в той час, як у калюсах, що культивувалися на селективному середовищі, відмічено достовірне збільшення їхнього числа до $13,7 \pm 3,4\%$ (рис. 4).

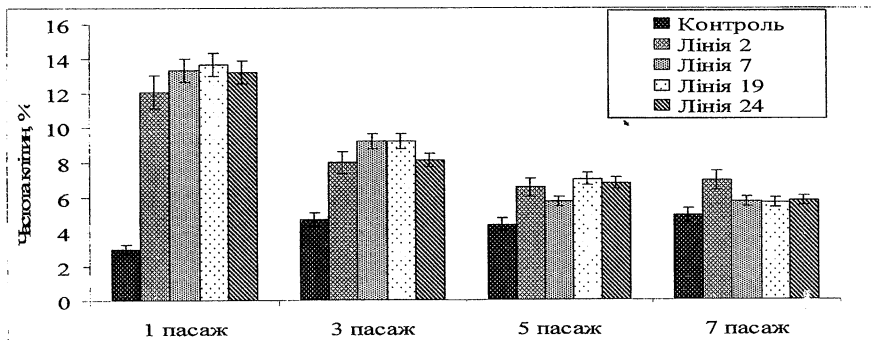


Рис. 4. Частота аберацій хромосом в калусних культурах пшениці, що вирощувалися на селективному середовищі.

Слід зазначити, що сумарна кількість аберантних анафаз з фрагментами становить понад 66 %, тобто у спектрі клітинних пошкоджень переважають “свіжі” розриви. Достовірне збільшення їхньої кількості свідчить про значний генотоксичний вплив культурального фільтрату на хромосомний апарат клітин і його кластогенний ефект у сублетальній концентрації.

Подальше культивування калюсів, що вирощувалися на різних середовищах, супроводжувалося поліплоїдизацією культур. Протягом перших пасажів цей процес інтенсивніше відбувався у калюсів, що перебували в селективних умовах.

Починаючи з 5 пасажу, кількість поліплоїдних клітин у калюсах, що вирощувалися на контрольному та селективному середовищах, достовірно не відрізнялась, частота хромосомних аберацій практично не змінювалася. Певна стабілізація калюсних культур за рівнем хромосомних перебудов може свідчити про те, що пройшов добір клітинної популяції, пристосованої до росту на селективному середовищі.

Гетерогенність стійких калюсних ліній за рівнем плоідності клітин була підтверджена методом проточної цитометрії.

Аналіз рівня плоідності рослин-регенерантів, отриманих із стійких клітинних ліній. При цитологічному дослідженні регенерантів, отриманих із стійких калюсних ліній, виявлені рослини різного рівня плоідності (табл. 2). 7 з 33 проаналізованих рослин-регенерантів, мали відмінний від гексаплоїдного набір хромосом.

Таблиця 2

Плоідність рослин-регенерантів R_0 , отриманих із стійких калюсних ліній пшениці

Клітинна лінія	Кількість вивчених рослин, шт.	Гексаплоїди	Міксоплоїди	Анеуплоїди
№2	13	10	2	1
№7	5	4	1	-
№19	9	7	1	1
№24	6	5	1	-

Отримані дані були підтвержені нами за допомогою методу проточної цитометрії, який засвідчив, що більшість рослин-регенерантів, індукованих із стійких до КФ калюсних ліній є гексаплоїдами, однак було виявлено і міксоплоїдні рослини.

*Молекулярно-генетичний поліморфізм клітинних ліній пшениці, стійких до КФ *Gaemantopus graminis* var. *tritici*, та регенерантів з них.* При дослідженні отриманих калюсних ліній, стійких до КФ *G. graminis* var. *tritici*, було виявлено та проаналізовано 227 чітких ISSR-фрагмента. Із них 65 (28,6%) були поліморфними. Залежно від праймера число поліморфних ампліконів варіювало від 1 до 13. Розмір таких фрагментів складав від 261 до 2846 пн.

Для порівнянні калюсів, що не зазнавали селективного тиску та стійких калюсних ліній, розраховували значення генетичних відстаней (D_j) за Жаккардом по 227 ISSR-локусам. Відповідно до отриманих даних була складена дендрограма (рис. 5), на якій можна виділити два чітко відокремлені кластери.

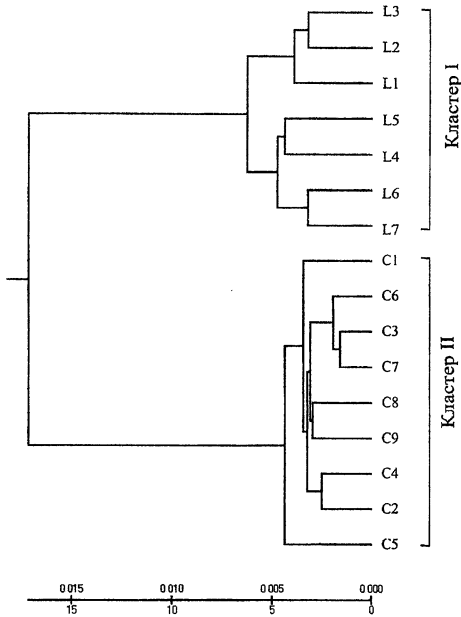


Рис. 5. Дендрограма генетичних відстаней між калюсами, що не зазнавали селективного тиску (C1-C9) та стійкими до КФ *G. graminis* var. *tritici* лініями (L1-L7), побудована за даними аналізу 227 ISSR-локусів

Перший з виявлених кластерів повністю відповідав групі ліній, отриманих шляхом клітинної селекції (L1-L7), а другий – групі калюсів, які не зазнавали селективного тиску (C1-C9). Одержані результати свідчать, що за клітинної селекції зміни геному м'якої пшениці, які виникають в культурі *in vitro* носять спрямований характер.

У стійких калюсів виявлено специфічні зміни у нуклеотидних послідовностях ДНК. 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 ISSR 7 (5'-TCTCTCTCTCTCTCG-3') та 1745 пн - праймер ISSR 12 (5'-AGAGAGAGAGAGAGATC-3'), а також відсутністю амплікону довжиною 1108 пн - праймер ISSR 15 (5'-ACACACACACACACC-3') (рис. 6).

Для кількісної оцінки ступеня поліморфізму та визначення рівня дивергенції між стійкими регенерантами та рослинами вихідного сорту, була розрахована матриця значень D_j по 227 локусам. Виявилось, що всі стійкі регенеранти формували один кластер, а рослини вихідного сорту утворювали окрему гілку. Генетична відстань між вихідними рослинами та регенерантами складає 0,4907-0,5388. В той же час, максимальне значення цієї величини

всередині кластеру (між рослинами-регенерантами) було 0,2168 а мінімальне - 0,0693.

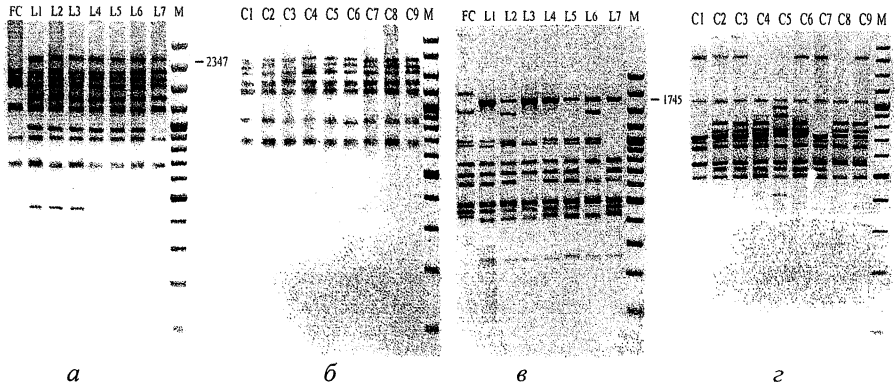


Рис. 6. Спектри продуктів ампліфікації ДНК: а, б - праймер ISSR 7; в, г - праймер ISSR 12; FC – вихідний каллус; L1-L7 – калюсні лінії, стійкі до КФ *G. graminis* var. *tritici*; C1-C9 – калюси того ж віку, які не зазнавав дії КФ; М - маркер молекулярної маси (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder). З правої сторони відмічено розмір поліморфних фрагментів, пн

Слід зазначити, що в спектрах продуктів ампліфікації стійких рослин-регенерантів, також були виявлені амплікони довжиною 2347 пн (праймер ISSR 7) та 1745 пн (праймер ISSR 12). Наявність цих фрагментів була встановлена і в ISSR-спектрах рослин R_1 (рис. 7).

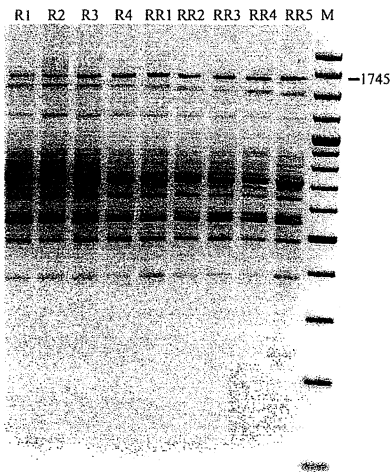


Рис. 7. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК з праймером ISSR 12: R1-R4 – рослини-регенеранти; RR1-RR5-рослини R_1 ; М - маркер молекулярної маси (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder). З правої сторони відмічено розмір поліморфного фрагменту, пн

Наявність певних ампліконів у всіх стійких форм - як клітинних ліній, так і рослин може свідчити про їхній безпосередній зв'язок з ознакою стійкості. Ці

амплікони потенційно можуть бути використані як маркери стійкості до офіобользу.

ВИСНОВКИ

Експериментально доведено можливість отримання біотехнологічним шляхом стійких до *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* рослин м'якої пшениці. На цитологічному та молекулярно-генетичному рівні досліджено особливості структурно-функціональної мінливості геному *Triticum aestivum* L., яка виникає у процесі культивування *in vitro* за дії біотичного стресового чинника.

1. Розроблено комплекс біотехнологічних прийомів, що дозволило удосконалити процес отримання рослин м'якої пшениці *de novo* із тканин вегетативних органів.
2. Вперше одержано рослини пшениці, стійкі до *G. graminis* var. *tritici*, які можливо використовувати як джерела стійкості до офіобользової кореневої гнилі.
3. З'ясовано, що генотоксична дія КФ *G. graminis* var. *tritici* на калюсні культури виявляється у кластогенних пошкодженнях структури хромосом та спричиняє загибель клітин шляхом некрозу.
4. Встановлено, що стійкі калюсні лінії, характеризуються стабільно-гетерогенною структурою клітинних популяцій, постійним рівнем (5-7%) і схожим типом структурних перебудов хромосом. Для таких ліній властивий подібний тип розвитку – збільшення ступеня поліплоїдизації, порівняно з контролем на перших етапах культивування.
5. Сомаклональна мінливість регенерантів, отриманих із стійких до КФ *G. graminis* var. *tritici* калюсів виявляється, зокрема, різним рівнем плідності рослин.
6. Вперше показано, що стійкі до культурального фільтрату *G. graminis* var. *tritici* калюсні лінії пшениці характеризуються наявністю специфічних ампліконів довжиною 2347 та 1745 пн. Ці амплікони також виявлено у стійких регенерантів R₀ та рослин R₁, що може свідчити про потенційну можливість їх використання як маркерів стійкості до офіобользу.
7. За допомогою ISSR-аналізу встановлено поліморфізм ДНК стійких та нестійких калюсних ліній. Згідно генетичних відстаней по Жаккарду, використовуючи метод попарного незваженого кластерування з арифметичним усередненням, стійкі форми виділено в окремий кластер, що дозволяє зробити припущення, що зміни геному м'якої пшениці за клітинної селекції носять спрямований характер.
8. Запропоновано до практичного використання спосіб підвищення регенераційної здатності калюсних ліній м'якої пшениці, стійких до КФ *G. graminis* var. *tritici*, який дає змогу прискорити процес отримання стійких до офіобользової кореневої гнилі рослин-регенерантів та збільшити їх кількість.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Бавол А. В. Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці / А. В. Бавол, О. В. Дубровна, І. І. Лялько // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. -2007, - Т. 5, №1-2. -С. 3-10. *(Особистий внесок здобувача - отримано культуру верхівки пагона проростків та індуковано рослини-регенеранти, написано основну частину тексту).*
2. Бавол А. В. Добір та цитологічний аналіз стійких до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* клітинних ліній пшениці та регенерантів з них / А. В. Бавол, О. В. Дубровна, І. І. Лялько // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів -2008. - Т. 6, №2 –С. 191-200. *(Особистий внесок здобувача - здійснено цитогенетичний аналіз, написано основну частину тексту статті).*
3. Бавол А. В. Регенерація рослин із різних типів експлантів м'якої пшениці / А. В. Бавол, О. В. Дубровна, І. І. Лялько // Физиология и биохимия культурных растений. -2008. –Т.40, № 2. – С. 150-156. *(Особистий внесок здобувача - отримано культури різних типів експлантів, здійснено аналіз отриманих даних та написано основну частину тексту статті).*
4. Бавол А. В. Поліморфізм ДНК клітинних ліній пшениці, стійких до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, за використання ISSR-методу / А. В. Бавол, А. В. Злацька // Физиология и биохимия культурных растений. -2009. –Т.41, № 1. –С. 69-74. *(Особистий внесок здобувача - сплановано експерименти, здійснено аналіз отриманих результатів, взято участь у написанні статті).*
5. Бавол А. В. Селекція *in vitro* м'якої пшениці на стійкість до *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* / А. В. Бавол, О. В. Дубровна, І. І. Лялько // Физиология и биохимия культурных растений. -2009. – Т.41, № 4. –С. 314-320. *(Особистий внесок здобувача - здійснено добір та аналіз стійких клітинних ліній пшениці, написано основну частину тексту статті).*
6. Бавол А. В. Молекулярно-генетичний поліморфізм клітинних ліній пшениці, стійких до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, та регенерантів з них / А. В. Бавол, О. В. Дубровна // Цитологія і генетика. - 2009. – т.43, № 5. –С. 28-34. *(Особистий внесок здобувача - проведено ISSR-аналіз клітинних ліній пшениці та рослин-регенерантів, здійснено розрахунок генетичних відстаней, участь у написанні статті та підготовці її до друку).*
7. Пат. 42311 України МПК (2009) А01Н4/00 Спосіб підвищення регенераційної здатності калюсних культур м'якої пшениці, стійких до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* / Бавол А. В., Дубровна О. В., Лялько І.І.; заявник і патентовласник Інститут фізіології рослин і генетики НАН України. - № u200901624; заявка 11.03.2008; опубл. 25.06.2009, Бюл. №12. *(Особистий внесок здобувача - проведено експериментальну роботу та аналіз отриманих результатів, взято участь у підготовці матеріалів).*

8. Бавол А. В. Особливості процесів морфогенезу в культурі листкових експлантів озимої пшениці/ А. В. Бавол, О. В. Дубровна, І. І. Лялько // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Збірник наук. праць. - Київ: Логос. - 2007. - Т.2. - С. 444-448. *(Особистий внесок здобувача - отримано культуру листкових експлантів, здійснено аналіз отриманих даних, написано основну частину тексту статті).*
9. Бавол А. В. Вплив хітозану на ріст і розвиток калкусних культур м'якої пшениці / А. В. Бавол, О. В. Дубровна, І. І. Лялько // Фактори експериментальної еволюції організмів: Збірник наукових праць. - Київ: Логос. - 2008. - Т.5. - С. 249-253. *(Особистий внесок здобувача - сплановано експерименти, здійснено аналіз отриманих даних, написано основну частину тексту статті).*
10. Дубровная О. В. Регуляция процессов морфогенеза в культуре *in vitro* пшеницы / О. В. Дубровная, А. В. Бавол, И. И. Лялько // Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений: III Международная научная конференция. Минск, 14-16 мая 2008 г. / Научно-практический центр "Биоресурсы", Центральный ботанический сад. - Минск, 2008. - С. 232-235. *(Особистий внесок здобувача - виконано частину експерименту, участь у аналізі результатів, написано частину тексту статті).*
11. Бавол А. В. Цитогенетичний та молекулярно-генетичний аналіз клітинних ліній м'якої пшениці, стійких до культурального фільтрату *G. graminis* var. *tritici*/ А. В. Бавол, О. В. Дубровна, І. І. Лялько // Геном рослин: V міжнародна конференція. Одеса, 13-16 жовтня 2008 р. / Українське товариство генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова, Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН [та ін.]. - Одеса, 2008. - С. 45-48. *(Особистий внесок здобувача - здійснено цитогенетичний та молекулярно-генетичний аналіз, написано частину тексту статті).*
12. Дубровна О. В. Вплив еліситорів різної природи на процеси морфогенезу в культурі *in vitro* м'якої пшениці / О. В. Дубровна, А. В. Бавол, І. І. Лялько // Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку: збірник наукових праць / НАН України, Інститут фізіології рослин і генетики, Укр. т-во фізіологів рослин; голов. ред. В. В. Моргун. - К.: Логос, Т. 2. - 2009. - С. 564-569. *(Особистий внесок здобувача - участь в обговоренні та інтерпретації отриманих даних, написано частину статті).*
13. Бавол А. В. Изменчивость генома пшеницы при клеточной селекции на устойчивость к культуральному фильтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* / А. В. Бавол, О. В. Дубровная, И. И. Лялько, А. В. Злацкая // Фактори експериментальної еволюції організмів: збірник наукових праць. - Київ: Логос. - 2009. - Т. 7. - С. 83-90. *(Особистий внесок здобувача - проведений цитогенетичний та молекулярно-генетичний аналіз клітинних ліній пшениці та регенерантів, написано частину статті).*
14. Бавол А. В. Геномная изменчивость мягкой пшеницы при клеточной селекции на устойчивость к метаболитам *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* / А.В. Бавол, О. В. Дубровная, И. И. Лялько // Теоретические основы применения биотехнологии, генетики и физиологии растений в современной селекции

растений и растениеводство: Международная научно-практическая конференция. Брянск (Белоруссия) – Люблин (Польша), 29 июня - 8 июля 2009 г. / ГОУ ВПО Брянский государственный университет им. акад. И. Г. Петровского [и др.] – Брянск, 2009. -С. 8-13. (*Особистий внесок здобувача – сплановано експерименти, проаналізовано отримані дані та підготовлено статтю до друку*).

15. Бавол А. В. Порівняння процесів морфогенезу в культурі незрілих зародків та листових експлантів пшениці // Сучасний стан і пріоритети розвитку фізіології рослин, генетики та біотехнології: X міжнародна конференція молодих вчених. Київ, 25-26 жовтня, 2007р./ Інститут фізіології рослин і генетики НАН України. -Київ, 2007р -С. 146-147.

16. Baval A. Callus induction from different types of explants of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) // Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution: Materials of III international young scientists conference. Odesa, May 15-18, 2007 / Ministry of Education and Science of Ukraine, Mechnikov Odesa National University [et al.] – Odesa, 2007. –P. 10-11.

17. Baval A. *In vitro* selection for improved plant resistance to take-all of wheat / A. Baval, O. Dubrovna, I. Lyalko // The Biology of plant calls in vitro and biotechnology: IX International Conference. Zvenigorod, September 8-12, 2008 / Russian Academy of Science, K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS [et al.]. –Moscow, 2008. – P.26-27.

18. Бавол А. В. Дослідження генетичної мінливості культури тканин м'якої пшениці за клітинної селекції на стійкість до офіобольозу /Фундаментальні та прикладні дослідження в біології: I міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених. Донецьк, 23-26 лютого 2009 р. / Донецький національний університет, Студентське наукове товариство [та ін.]. –Донецьк, 2009. –С. 355-356.

АНОТАЦІЯ

Бавол А. В. Клітинна селекція м'якої пшениці на стійкість до *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.0015 – генетика. – Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ, 2010.

Дисертацію присвячено розробці технології отримання *in vitro* рослин м'якої пшениці, стійких до збудника офіобольозу *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* та вивченню особливостей мінливості геному даної культури за дії біотичного стресу.

У процесі досліджень розроблено комплекс біотехнологічних прийомів, що дозволило удосконалити процес отримання рослин м'якої пшениці *de novo* із тканин вегетативних органів та підвищити регенераційну здатність калюсних культур м'якої пшениці, стійких до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*.

Методом прямої клітинної селекції здійснено добір калюсних ліній пшениці сорту Зимоярка, стійких до культурального фільтрату *G. graminis* var. *tritici*. З них індуковано рослини-регенеранти та отримано насіннєве покоління R₁ та R₂. Проведена комплексна оцінка стійкості рослин до збудника офіобольозної кореневої гнилі в умовах лабораторних та вегетаційних дослідів.

Цитологічним та проточної цитометрії методами вивчено особливості впливу метаболітів патогену на генетичну структуру клітинних популяцій калюсів пшениці у процесі добору стійких форм та рівень плоідності рослин-регенерантів.

За використання ISSR-аналізу досліджено поліморфізм ДНК калюсних ліній пшениці, стійких до культурального фільтрату *G. graminis* var. *tritici*, індукованих з них рослин-регенерантів та насіннєвого покоління R₁. Показано, що стійкі до *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* форми пшениці характеризуються наявністю специфічних змін у нуклеотидних послідовностях ДНК.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., клітинна селекція, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, цитогенетична мінливість, ISSR-аналіз.

АННОТОЦІЯ

Бавол А. В. Клеточная селекция мягкой пшеницы на устойчивость к *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.0015 – генетика. – Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев, 2010.

Диссертационная работа посвящена разработке технологии получения *in vitro* растений мягкой пшеницы, устойчивых к возбудителю офиоболлеза *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici*, и изучению особенностей изменчивости генома данной культуры при действии биотического стресса.

В ходе работы разработан комплекс биотехнологических приемов, который включает: оптимизацию схемы стерилизации исходного материала и состава питательных сред для индукции каллусогенеза и регенерации растений, а также тип и оптимальный возраст экспланта, что позволило усовершенствовать процесс получения растений мягкой пшеницы *de novo* из тканей вегетативных органов.

Методом прямой клеточной селекции получены устойчивые к культуральному фильтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* каллусные линии, которые не только имели природную массу на селективной среде, но и сохраняли морфогенный потенциал. Из полученных клеточных линий были индуцированы растения-регенеранты. Разработан и экспериментально апробирован способ повышения регенерационной способности устойчивых форм, который позволяет ускорить процесс получения растений-регенерантов и увеличить их количество. Проведена комплексная оценка растений к возбудителю офиоболлезной корневой гнили в условиях лабораторных и вегетационных опытов.

Исследованы особенности цитогенетической изменчивости клеточных популяций каллусных культур мягкой пшеницы в процессе культивирования на

селективной среде. Выявлено, что генотоксическое действие КФ на каллусные культуры проявляется в кластогенных нарушениях структуры хромосом и приводит к гибели клеток путем некроза. Показано, что устойчивые клеточные линии, характеризуются относительно постоянным уровнем (5-7%) и подобным типом структурных перестроек хромосом. Изучена цитологическая изменчивость растений-регенерантов, полученных из устойчивых клеточных линий.

С помощью ISSR-анализа изучен полиморфизм ДНК каллусных линий пшеницы, устойчивых к культуральному фильтрату *G. graminis* var. *tritici*, индуцированных из них регенерантов и растений R₁. Показано наличие у устойчивых к *G. graminis* var. *tritici* форм пшеницы специфических изменений в нуклеотидных последовательностях ДНК. У таких форм выявлены специфические ампликоны размером 2347 пн и 1745 пн, которые потенциально могут быть использованы как маркеры устойчивости к офиоболлезу.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., клеточная селекция, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, цитогенетическая изменчивость, ISSR-анализ.

ABSTRACT

Bavol A. V. *In vitro* selection of wheat for resistance to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. – Manuscript.

Thesis for a PhD degree in Biology, speciality 03.00.15 – Genetics. – Institute of Plant Physiology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, 2010.

The thesis is devoted to the development of the *in vitro* technique of obtaining wheat plants, resistant to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and studying of the peculiarities of genome variability of this crop at biotical stress.

It was established the complex of biotechnological methods, which has allowed to improve the process of obtaining bread wheat plants *de novo* from the tissues of vegetative organs and increase regeneration ability of the cellular cultures, which resistance to culture filtrate of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*.

The cellular lines of wheat cultivar Zimoyarka, resistance to culture filtrate of *G. graminis* var. *tritici* has been obtained using selection *in vitro*. It was attained the seed generation R₁. The complex estimation of plants R₀ and R₁ to the *G. graminis* var. *tritici* in the laboratory and vegetative experiments has been studied.

The peculiarities of phytopatogen metabolites action on genetical structure of callus cells population during selection of resistant forms and the level of ploidy of plant-regenerants has been elucidated, using cytological and flow cytometric analysis.

DNA polymorphism of the cellular lines of wheat resistant to the culture filtrate of *G. graminis* var. *tritici*, and the plant-regenerants, that were induced from them as well as R₁ plants, has been studied with the use of the method of ISSR-analysis. Specific changes in DNA sequences were detected in resistant calluses.

Key words: *Triticum aestivum* L., *in vitro* selection, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, cytogenetical variability, ISSR-analysis.

Підп. до друку 08.02.2010. Формат 60×90¹/₁₆. Папір. офс. Гарнітура “Таймс”. Друк. офс.
Ум. друк. арк. 0,9. Обл.-вид. арк. 0,9. Наклад 100 прим. Зам. 55.

Віддруковано у видавництві “ЛОГОС” з оригіналів автора.
Свідоцтво ДК № 201 від 27.09.2000 р.
01030, Київ-30, вул. Богдана Хмельницького, 10, тел. 235-6003