

ГЕНЕТИЧНА МІНЛИВІСТЬ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ГЕНОМ БЕТА-АМІЛАЗИ

Проблема генетичної стабільності рослинного матеріалу гібридного походження набула останнім часом гострої актуальності [1]. Інтрогресивні лінії пшениці беруть початок від віддалених гібридів, і природним є питання, чи супроводжується їхня цитологічна стабільність стабільністю генетичною. Бета-амілазу було обрано через легкість ідентифікації компонентів електрофоретичного спектру та добру вивченість їхнього генетичного контролю у генотипу озимої м'якої пшениці Аврора, на генетичному тлі якого було створено низку інтрогресивних ліній [2]. Їхній геном включе різні обсяги чужинного хроматину від *Aegilops speltoides* (SS), *Ae. umbellulata* (UU), *Ae. sharonensis* ($S^{sh}S^{sh}$). Електрофоретичний спектр ізоферментів бета-амілази генотипу Аврора складається з чотирьох компонентів (рис. 1). Компоненти 1 та 2 контролюються геном β -Amy-D1 (хромосома 4D), компонент 4 – геном β -Amy-B1 (4A) та компонент 6 – геном β -Amy-A1 (5A). Спектр Аврозиса крім компонентів 4 та 6 має специфічний, найбільш рухливий у спектрах пшеничних зразків, що досліджуються, компонент. Спектр Авролати має тільки компоненти 4 та 6, а спектр Авродеса від спектра Аврори майже не відрізняється з рухливістю нижнього подвійного компоненту.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал: 1) інтрогресивні лінії, походження яких пов'язано зі схрещуванням генотипу Аврора з одним з геномно-заміщених амфідиплоїдів, Авродесом (AABBSS), 13 ліній, Аврозисом (AABBS $^{sh}S^{sh}$), 16 ліній, Авролатою (AABBUU), 9 ліній, де AABB – тетраплоїдний компонент геному Аврори; 2) сорт озимої м'якої пшениці *Triticum aestivum* ($2n = 6x = 42$, AABBDD) Аврора та згадані амфідиплоїди; 3) диплоїдний вид *Aegilops sharonensis* ($2n = 14$, $S^{sh}S^{sh}$).

Електрофоретичний спектр β -амілази отримували за методикою Девіс. Спектр вивчали на шести зернівках, взятих від чотирьох рослин з кожної лінії. Праймери для ПЛР до гена β -амілази розробляли, аналізуючи Transcriptome Shotgun Assembly сиквенсу мРНК гену бета-амілази *Triticum aestivum* (номер

послідовності у GeneBank JP213065.1) із бази даних NCBI [3]. Для генерації праймерів використовували сервіс PrimerBLAST. Реакцію ПЛР проводили за методом tdПЛР (touch down).

Результати та обговорення

Порівняння спектрів всіх вивчених генотипів показало, що між ними в жодному випадку не було мінливості за компонентом 4, який властивий генотипу Аврора та контролюється геном β -Amy-B1 (4A). Тому з подальшого розгляду він був виключений. Серед інтрогресивних ліній були такі, що мають алелі β -Amy, які не властиві ні Аврорі, ні геномно-заміщеному амфідиплоїду, отже є новими. За геном β -Amy-D1 таких ліній було 2, 1 та 4 серед похідних Авродесу, Аврозису та Авролати, відповідно, для гена β -Amy-A1 – 5, 4 та 2. Деякі лінії виявилися поліморфними за алелями одного гена, тобто, суворо кажучи, чистими лініями не є. Беручи до уваги походження ліній, слід було очікувати, що будь-яка з них за геном β -Amy-D1 буде виявляти наявність або алелю «12», властивого генотипу Аврори, або чужинного алелю для ліній – похідних Аврозису та Авродесу. Для ліній – похідних Авролати компоненти «12» можуть бути відсутні (нуль-алель). За геном β -Amy-A1 в лініях очікували наявність лише одного алелю «6», властивого генотипу Аврори, адже за хромосомами геномів А та В схема створення ліній заміщень та перебудов не передбачала. Отримані результати від очікуваних відрізнялись. Спектри ліній res16, res60, res106 та res254 не мали компонентів 1 та 2, їхній алельний стан за геном β -Amy-D1 було записано як "0", що є легітимним лише для res254, похідної Авролати.

Лінії res214, res221 та res243 мали компонент 3 (рис. 1), рухливість якого дещо менша за компоненти 1 та 2. Цей алель не притаманний жодному з ініціальних компонентів схрещування при створенні інтрогресивних ліній, отже є новим у цьому матеріалі. Те саме стосується компонентів 5 та 7 спектру бета-амілази (рис. 1), які не були властивими ні Аврорі ні амфідиплоїдам, від яких було отримано інтрогресивні лінії. Їхне

походження не може бути пов'язано з перезапиленням досліджуваних ліній з сторонніми генотипами. Про це свідчить наявність двох хромосом із супутниками, що характерно для сорту Аврори, замість чотирьох, властивих всім генотипам м'якої пшениці, які не мають транслокації 1RS/1BL. Отже, походження нових алелів пов'язане з якимось внутрішньогеномними процесами, такими як нелегітимна пшенично-пшенична рекомбінація, дія транспозонів та інші процеси, які супроводжують становлення геному гібридного походження [1, 4, 5]. Деякі лінії виявляють внутрішньолінійну мінливість. Це показує, що лінія тепер не є однорідною та складається з субліній, які відрізняються за алелями одного з генів β -Аму. За спектром бета-амілази лінію характеризували за результатом вивчення чотирьох рослин. Ті лінії, які за даними вивчення виглядають стабільними, цілком можливо такими не є, просто насіння було взято від рослин, які не відрізнялися за генами β -Аму-А1 та β -Аму-Д1.

Алельність нових генів визначали генетичним аналізом з використанням 19-ти популяцій F₂ від схрещування інтрогресивних ліній одна з однією. Генотипи рослин F₂ встановлювали за спектрами насінин F₃. Було з'ясовано, що компоненти 1 і 2, 3 та 0 контролюються алельними генами, тобто алелями гена β -Аму-Д1, а компоненти 5 та 7 – алелями гену β -Аму-А1.

Лінії різного походження порівняли за частотою появи в них нового алелю за кожним з двох генів бета-амілази. Через маленькі вибірки у всіх випадках для статистичного порівняння використовували точний критерій Фішера. Всі три групи ліній, що походять від різних геномно-заміщених форм, не відрізнялися одна від однієї за частотою виникнення зміни за геном β -Аму-А1. Щодо гена β -Аму-Д1, не відрізнялися одна від однієї групи ліній-похідних Авродеса та Аврозиса. Після їхнього об'єднання від них із статистичною достовір-

ністю при $p < 0,05$ відрізнялась більшою частотою зміни алелю «1 і 2» на алель «3» група ліній-похідних Авролати ($P = 0,041$). На наш погляд, такі результати є наслідком невеликої кількості досліджених груп і можуть стати іншими при тотальному дослідженні всіх ліній з нашої колекції.

При вивченні популяцій F₂ було зафіксовано феномен, який поки зрозуміти не вдається. У 7 комбінаціях схрещування з 19, судячи зі спектрів насінин F₃, деякі рослини F₂ мали не два, а три алелі гену β -Аму-Д1. У всіх таких комбінаціях у якості одного з компонентів схрещування брала участь лінія – похідна Аврозису з гаметоцидною хромосомою 4S^{sh}, що є гомеологічною хромосомі 4D, на якій знаходиться β -Аму-Д1. Крім того, розщеплення за алелями β -Аму-Д1 було значно зсунуто на користь гетерозигот у порівнянні з кожною гомозиготою. Аналогічну картину спостерігали на результатах розщеплення за геном β -Аму-А1: наявність рослин F₂, які, судячи з їхніх нащадків F₃, повинні були мати не два алелі гена β -Аму-А1. Звичайно, для обох генів третій алель був новим, не властивим жодному з генотипів, які були засновниками ліній. Оскільки для гену β -Аму-А1 можна було відрізнити всі гомозиготи від гетерозигот, було перевірено та відкинуто припущення про стійку гетерозиготність ліній з гаметоцидною хромосомою, як наслідок хромосомних аберацій, викликаних дією гена *Gc*: гетерозигот серед рослин ліній знайдено не було. Серед гібридів не було жодного спектру з компонентами, які відповідають трьом алелям, 5, 6 та 7. Це примушує зробити припущення, що зміна алелю бета-амілази, яка призводить до появи на спектрі нового компоненту, відбувається при формуванні гамет гібридом, гемізиготним за хромосомою 4S^{sh}, а в генотипі рослини F₂ такого алелю не було. Можна припустити, що і для гена β -Аму-Д1 поява нових алелів відбувається протягом гаметогенезу і їх не було у рослині F₂.

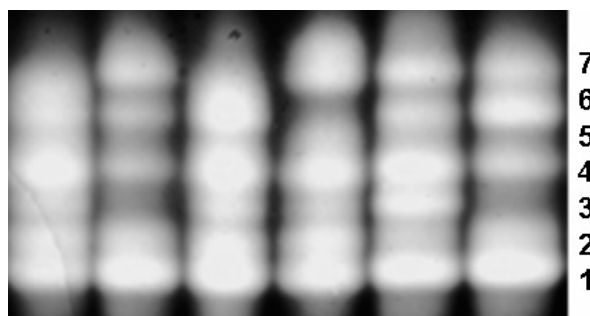


Рис. 1. Електрофоретичний спектр β -амілази інтрогресивних ліній пшениці

Виникає питання, чи пов'язана поява нових компонентів спектру зі змінами у нуклеотидній послідовності гена β -амілази, чи ми маємо справу зі змінами, які у сучасній генетиці називають епігенетичними, або з результатами посттрансляційної модифікації білка. Для отримання та порівняння спектрів ампліконів після ПЛР сформували дві групи ліній-похідних Аврозиса: з гаметоцидною хромосомою або її частиною – з геном *Gc* (res115, res117, res118, res127, res128) та без неї (res121, res122-1, res122-2, res130, res132, res139, res141, res148). Підбір праймерів відбувався таким чином, щоб послідовності, що будуть ампліфікуватися, перекривалися між собою і повністю вкривали всю послідовність гену (рис. 2). Тим не менш, до прикінцевих ділянок гену на 5'-кінці (1785–1931 н.) підібрати праймери не вдалось через те, що жодна із створених для цієї послідовності пар, не відповідала обраним нами вимогам до праймерів. Ампліфікація фрагментів гену β -амілази Аврори дає два компоненти для праймерів NAmu3, NAmu4, NAmu5, NAmu7, для решти – один компонент. ДНК егілопса Шарона ампліфікується подвійним компонентом лише парою праймерів NAmu4. Для праймерів NAmu5 та NAmu7 утворюється один амплікон, важкий, з праймером NAmu3 – також один, але легкий. З праймером NAmu12 ампліфікація не відбувається, отже між послідовностями пшениці та егілопсу, які відповідають цій парі праймерів, є розбіжності. Для ДНК Аврозиса ця розбіжність вже не має значення, оскільки для ампліфікації ДНК цей геном має не один ген β -амілази, як егілопс, а три: два на хромосомах 4A та 5A, а один у геномі *S^{sh}*. Спектр ампліконів ДНК Аврозиса відрізняється від спектра Аврори лише

за праймером NAmu5, один компонент, важкий, замість двох. Коли на спектрах ДНК Аврори та Аврозису наявні два продукти ампліфікації, а таку картину дають чотири пари праймерів з дев'яти використаних, обидва компоненти мають однакову інтенсивність флуоресценції. На нашу думку, два амплікона формуються через те, що гексаплоїдний геном має три ортологічних гени β -амілази, між нуклеотидними послідовностями яких можуть бути розбіжності, в тому числі делеції або інсерції. В такому випадку, кількість нуклеотидів, яка знаходиться між лівим та правим праймером, буде в різних генах різною і при збереженні ідентичності послідовностей, з якими гібридується праймер, будуть утворюватися продукти різної маси, отже кількість ампліконів збільшуватиметься. Утворення двох ампліконів ДНК диплоїдного егілопсу може свідчити про існування у геномі псевдогена $\psi\beta$ -Amy. Можливість наявності псевдогенів як чинника виникнення другого амплікона для низки праймерів не може бути відкинута і для гексаплоїдних генотипів.

Для характеристики інтрогресивних ліній досліджували ДНК від 2–6 рослин окремо. Проте це були не саме ті рослини, для яких визначали електрофоретичний спектр β -амілази, тому зіставити зміни у спектрах ампліконів та спектрах бета-амілази ми могли лише в узагальненому для лінії вигляді. Перш за все лінії оцінювались на внутрішньолінійну мінливість між рослинами. При цьому відсутність амплікона у спектрі не розглядали як прояв поліморфізму, якщо така відсутність характеризувала спектри, отримані за кількома праймерами для однієї і тієї самої рослини. В такому випадку піддавалась сумніву специфічність картини.

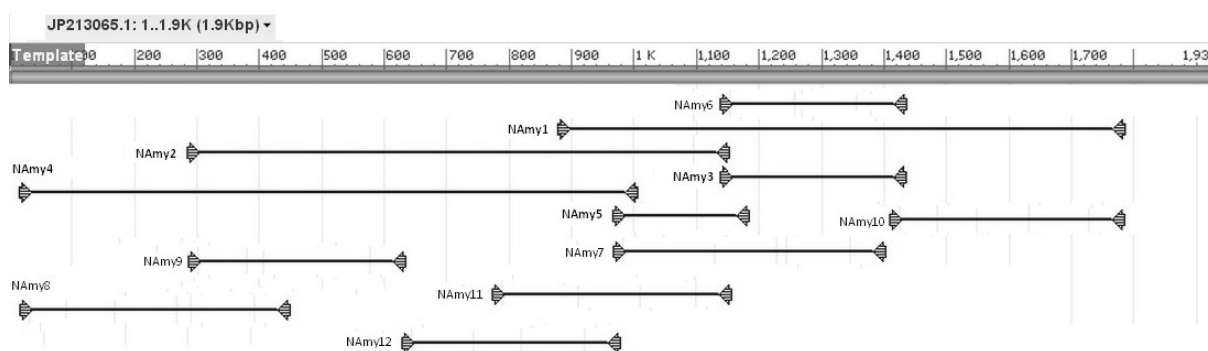


Рис. 2. Розташування послідовностей (лінії, обмежені стрілками), що фланкуються зазначеною парою праймерів на основі сиквенсу TSA гену β -амілази *Triticum aestivum* JP213065.1 (суцільна лінія згори)

Крім того, поліморфним вважався продукт, якщо частота його більш рідкісного варіанта (в даному випадку – відсутність продукту) була $\geq 0,05$ (довірча імовірність 95%). За цими двома критеріями, мономорфні продукти ампліфікації для всіх ліній отримуються для трьох праймерів з тих п'яти, що дають поодинокий амплікон: NAmu2, NAmu9, NAmu12. Крім того, виявлено поліморфізм за участю нового компоненту спектра, який утворюється з парою праймерів NAmu4 (рис. 3).

Сегмент гена, що фланкується праймерами NAmu2, включає обидва сегменти, що фланкуються парами праймерів NAmu9 та NAmu12 (рис. 2). Можна припустити, що цей сегмент є консервативним та однаковим для всіх генів бета-амілази. Тому у гексаплоїдів він ампліфікується поодиноким продуктом, мономорфним навіть в тих лініях, для яких було встановлено наявність нових компонентів спектру бета-амілази «5» та «7», що контролюються геном *β -Amy-A1*.

Праймер NAmu5 – єдиний, за яким ДНК Аврори та Аврозису дають різні результати: два амплікони для Аврори та один – для Аврозису. Лінії, які за даними попереднього вивчення [6] мають у складі хромосому 4S^{sh} (res117, res118, res127, res141) або її плече з геном *β -Amy-S^{sh}1* (res115) мають на спектрі один важкий амплікон, як у Аврозису та егілопса Шарона. ДНК решти ліній, без заміщень 4S^{sh}/4D, утворює два амплікони. Зрозуміло, що легкий компонент 1 утворюється за рахунок гена *β -Amy-D1*, тому його й немає в спектрі Аврозиса. Отже, ми знайшли пару праймерів, специфічних до гена *β -Amy-D1*, які можна використовувати далі при його аналізі.

Спектри бета-амілази лінії res121, res122, res141, res148, для яких показано появу нового амплікону з праймером NAmu4, або не відрізняються від спектру Аврори, або мають новий компонент на зимограмі ферменту, що контролюється геном *β -Amy-A1*. Перші дві лінії остисті, дві останні – напівостисті. Нами було показано раніше, що розвиток остей у інтрогресивних ліній Аврори зв'язаний зі зміною домінантного стану гена *B1*, локалізованого на хромосомі 5A, і, за результатами мікросателітного аналізу, це могло бути наслідком певних перебудов цієї хромосоми [7]. Ген *β -Amy-A1* розташований на цій самій хромосомі. Не можна виключити, що пара праймерів NAmu4, ПЛР з якими дає продукт, не властивий прабатьківським геномам ліній, є специфічними до гена *β -Amy-A1*. Тоді їх можна використовувати для подальшого вивчення змін у нуклеотидних послідовностях цього гена.

Висновки

Вивчення електрофоретичних спектрів бета-амілази в інтрогресивних лініях м'якої пшениці та зразках, які брали участь у ініціальних схрещуваннях, виявило наявність компонентів спектру, не властивих жодному з компонентів схрещування. Генетичний аналіз з використанням F₂ та F₃ від 19 комбінацій схрещування між різними інтрогресивними лініями показав, що алелі, які кодують нові компоненти спектру, є членами алельних серій генів *β -Amy-A1* та *β -Amy-D1*.

Три групи ліній, що походять від різних геномно-заміщених амфідиплоїдів, не відрізнялись одна від одної значуще за частотою виникнення змін за генами бета-амілази.

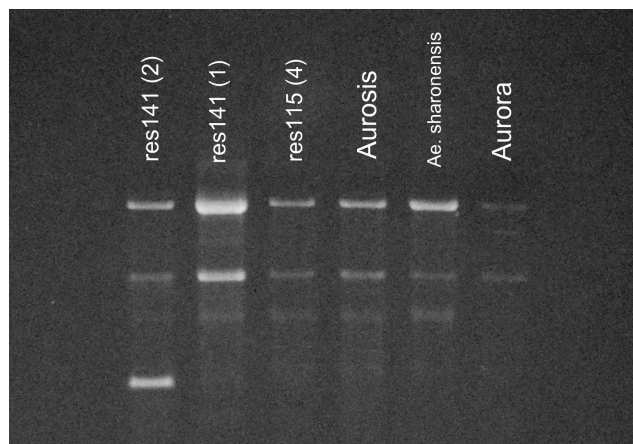


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гену бета-амілази, що фланкується парою праймерів NAmu4. Найлегший компонент на лівому спектрі – новий

Порівняння спектрів ампліконів, отриманих із праймерами до різних частин гена бета-амілази для ДНК Аврори, Аврозиса, егілопса Шарона та інтрогресивних ліній

показало, що нуклеотидні послідовності гена у деяких ліній відрізняються одна від одної у гені β -Amy-D1 та, можливо, β -Amy-A1.

Література

1. Zhao N., Xu L., Zhu B., Li M., Zhang H., Qi B., Xu C., Han F., Liu B. Chromosomal and genome-wide molecular changes associated with initial stages of allohexaploidization in wheat can be transit and incidental // *Genome*. – 2011. – 54, N 8. – P. 692–699.
2. Антонюк М.З., Терновская Т.К. Изоферменты бета- и альфа-амилазы для идентификации генетического материала трех видов *Aegilops*, включенного в геном мягкой пшеницы // *Цитология и генетика*. – 1995. – 29, N 2. – С. 3–9.
3. TSA: *Triticum aestivum* contig07261.TraeRec mRNA sequence [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/346480564>
4. Bento M., Tomas D., Viegas W. Silva M. Retrotransposons represent the most labile fraction for genomic rearrangements in polyploid plant species // *Cytogenet Genome Res*. – 2013. – 140. – P. 286–294.
5. Yuan Zh., Liu D., Zhang L., Zhang L., Chen W., Yan Z., Zheng Y., Zhang H., Yen Y. Mitotic illegitimate recombination is a mechanism for novel changes in high-molecular-weight glutenin subunits in wheat-rye hybrids [Електронний ресурс] // *PLoS One*. – 2011. – 6 (8). – Режим доступу: DOI: 10.1371/journal.pone.0023511.
6. Antonyuk M.Z., Bodylyova M.V., Ternovskaya T.K. Genome structure of introgressive lines *Triticum aestivum/Aegilops sharonensis* // *Cytology and Genetics*. – 2009. – 43. – N 6. – С. 58–67.
7. Антонюк М.З., Прокопик Д.О., Мартиненко В.С., Терновська Т.К. Ідентифікація генів-промоторів остистості в інтрогресивній лінії *Triticum aestivum / Aegilops umbellulata* // *Цитология и генетика*. – 2012. – 46, № 3. – С. 10–19.

NAVALIHINA A.G. ANTONYUK M.Z., TERNOVSKA T.K.

National University of Kyiv-Mohyla Academy, Ministry of Education, Ukraine, 04070, Kyiv, H. Skovoroda str., 2, e-mail: tern@ukma.kiev.ua

GENETIC VARIABILITY OF COMMON WHEAT INTROGRESSIVE LINES FOR BETA-AMYLASE GENE

Aims. To explore electrophoretic spectra of beta-amylase in common wheat introgressive lines and explain the nature of spectra variability. **Methods.** PAAG, agarose gel electrophoresis, PCR, bioinformatical and statistical methods. **Results.** In beta-amylase electrophoretic spectra of introgressive wheat lines new components that were absent in the spectra of initial crosses, have appeared. Alleles encoding new components of the spectrum are members of allelic series of β -Amy-A1 and β -Amy-D1 genes. Three groups of lines that include introgressions from three *Aegilops* species do not differ in the frequency of changes in beta-amylase genes. Comparison of amplicon spectra after PCR showed pairs of primers that can be used to analyze changes in sequences of β -Amy-D1 and presumably, β -Amy-A1. **Conclusions.** Introgressive lines variability, that lies in the appearance of new components in electrophoretic spectra of beta-amylase has a genetic basis. It is associated with changes in gene sequences of β -Amy-D1 and conceivably, β -Amy-A1. **Key words:** genetic variability, wheat introgressions, beta-amylase, PCR analysis.

УДК 579.873.71:577.152.24:004.9

ПОЛИЩУК Л.В., ЛУКЪЯНЧУК В.В.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.Л. Заболотного НАН Украины, Украина, Д03680, Киев МСП, ул. Акад. Заболотного, 154, e-mail: LVPolishchuk@ukr.net

ГОМОЛОГИЯ ПЕРВИЧНОГО СТРОЕНИЯ ГЛИКОЗИЛТРАНСФЕРАЗ БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПУТИ ЛАНДОМИЦИНОВ У СТРЕПТОМИЦЕТОВ

В настоящее время полностью определено нуклеотидное строение и организация более 5 тысяч бактериальных хромосом и продолжаются

работы над последовательностями еще нескольких тысяч. Для многих штаммов продуцентов антибиотиков полностью определено