

УДК 575.22

Шпильчин В. В., Терновська Т. К.

ЗМІНА ПРОЯВУ ОЗНАКИ ВОСКОВА ОСУГА У ГЕНЕРАЦІЯХ АМФІДИПЛОЇДІВ ПІДТРИБИ *TRITICINAE*

Неочікувану зміну прояву ознаки воскова осуга спостерігали на двох штучностворених амфідиплоїдах *Triticinae*: Авротика та Міоза. За кілька генерацій після створення серед зелених рослин почали з'являтися блакитні та рослини із зеленим колосом на блакитному стеблі. Відсутність воскової осуги може бути спричинена лише геном *Iw2*, який потрапив до складу геному амфідиплоїдів від егілопсів. Гібриди F_1 від рецiproкного схрещування зелених та блакитних рослин виявлялися, як правило, зеленими. Співвідношення між фенотипними класами у F_2 не відповідало розщепленню $(3 \text{ зеленіх} : 1 \text{ блакитна})^n$ через надлишок блакитних рослин. Застосування SSR-праймерів, специфічними до хромосоми 2D, для різних форм амфідиплоїдів у всіх випадках дало продукти ампліфікації, хоча цей ген не належить до складу геному жодного амфідиплоїда. Успадкування ознаки не можна пояснити жодною з моделей успадкування за Менделем. Причиною може бути будь-який прояв нестабільності геному, а також епігенетичні механізми генетичної мінливості.

Ключові слова: амфідиплоїди, структура геному, воскова осуга, генетична нестабільність, мікросателітний аналіз.

Вступ

Утворення воскової осуги у пшеничних рослин контролюється кількома домінантними генами промоторами та інгібіторами [1, 2]. Це гени *W1* та *W2*, розташовані на хромосомі 2BS (коротке плече хромосоми 2B) та 2B. Також є ген *Ws*, що знаходиться на хромосомі 1BL (довге плече хромосоми 1B) [3]. Окрім цього, ген *W2* має кілька алелів: *W2a* та *W2b*. Показано, що перший алель зумовлює утворення воскової осуги у *Ae. Tauschii*, а другий – у сорту Chinese Spring [4]. Гени *Iw1*, *Iw2* та *Iw3* є епістатичними інгібіторами воскової осуги. Вони розташовані на хромосомах 2B, 2D та 1BL, відповідно [3]. Ген *Iw3* забезпечує формування рослин із зеленим колосом та листям із восковою осугою [5]. Відомо, що будь-який інгібітор є епістатичним до будь-якого гена промотора воскової осуги, тому від схрещування рослин із восковою осугою з рослинами, які її не мають, у першому поколінні повинні формуватися гібриди без осуги, якщо один компонент схрещування без осуги мав один з генів-інгібіторів. Дослідження геномно-заміщених форм м'якої пшениці, контрастних за даною ознакою, показало неочікуваний характер успадкування і прояву цієї ознаки. Аналогіч-

на ситуація спостерігається при вивченні інших штучно створених пшеничних амфідиплоїдів [6].

У статті представлена характеристика амфідиплоїдів, контрастних за ознакою воскова осуга щодо можливих перебудов у хромосомах 2B та 2D, встановлених за допомогою мікросателітного аналізу, та результати дослідження спектру гліадинових білків. Також наведено результати гібридологічного аналізу штучних амфідиплоїдів та їхніх нащадків.

Матеріали та методи

У дослідженні було використано такі рослинні матеріали: амфідиплоїди Авротика (AABBTT) та Міоза (AABVM¹M¹), контрастні за ознакою воскова осуга. Авротика 2, яка не має воскової осуги (зелена), Авротика 2, що має воскову осугу (блакитна), і, відповідно, Міоза зелена та Міоза блакитна; сорт м'якої пшениці Аврора з восковою осугою та амфідиплоїд Авротика 1 без воскової осуги.

ДНК із паростків зазначеного рослинного матеріалу виділяли з застосуванням методики на основі СТАБ буфера [7]. З виділеною ДНК проводили полімеразно-ланцюгову (ПЛР) реакцію

з праймерами мікросателітних локусів, специфічних до 2В та 2D хромосом. Застосовано 6 пар праймерів до короткого та довгого плечей 2В хромосоми (*Xcfd238-2BS*, *Xbarc13-2BS*, *Xbarc318-2BS*, *Xbarc200-2BS*, *Xwmc317-2BL* та *Xwmc361-2BL*), а також 7 пар праймерів до короткого та довгого плечей 2D хромосоми (*Xcfd56-2DS*, *Xbarc159-2DL*, *Xbarc297-2DS*, *Xcfd43-2DS*, *Xcfd17-2DS*, *Xgdm35-2DS* та *Xbarc124-2DS*). Реакційна суміш для проведення ПЛР [8] об'ємом 25 мкл містила 250 нМ кожного праймера відповідного локусу, 50 нг ДНК, 0,2 мМ dATP, dCTP, dTTP, dGTP; 1,5 мМ MgCl₂, 1,2 од. Taq-полімерази (Fermentas) у рекомендованому виробником буфері. Після прогрівання протягом 3 хв при 94 °С проводили 30 циклів ПЛР у такому режимі: 1) денатурація – 94 °С – 1 хв; 2) гібридація – 50–60 °С (залежно від праймера) – 1 хв; 3) елонгація – 72 °С – 2 хв. Після закінчення циклів – 72 °С – 10 хв фінальної елонгації.

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили у вертикальному 6 %-му поліакриламідному гелі (ПААГ) за денатуруючих умов з використанням ТВЕ буферу. Для електрофорезу брали 10 мкл реакційної суміші ПЛР і змішували її з таким самим об'ємом буферу нанесення такого складу: 99 % формамід, 0,025 М EDTA, рН 8,0, бромфеноловий синій, ксиленціанол. Зразки прогрівали 3 хв за температури 95 °С на водяній бані, після чого їх вміщували на лід. Після проходження електрофорезу гелі забарвлювали за допомогою нітрату срібла [9].

Виділення та електрофоретичне розділення гліадинів виконували за такою методикою. Для екстракції гліадинів половинки зернівок подрібнювали, потім заливали 150–200 мкл 70 % етанолу. Через 1,5 год. екстракції відбирали 60 мкл супернатанту і випаровували. Сухий осад розчиняли у 50 мкл розчину 5,5 М сечовини. Витримували близько 30 хв. Електрофорез гліадинів проводили в модифікованій системі Бжезинського. Тривалість електрофорезу 6–6,5 год. Нанесли 20 мкл екстракту в одну слоту. Умови розділення: 300 В, 10 мА – 30 хв, 300 В, 30 мА – до кінця електрофорезу (розрахунок на дві частини гелю). Фіксацію і фарбування гелю здійснювали у розчині кумасі, ацетону та трихлороцтової кислоти [10].

Результати та обговорення

Особливості прояву ознаки наявності/відсутності воскової осуги у штучностворених амфідиплоїдах пояснюється походженням цього рослинного матеріалу. Авротика (ААВВТТ) походить від схрещування тетраплоїдного компонента ААВВ м'якої озимої пшениці сорту Аврора (*Triticum aestivum*, ААВВDD) з диплоїдним

видом *Aegilops mutica* (ТТ) [11]. Сорт Аврора, на відміну від егілопсу, вкритий восковою осугою. Отже, її геном містить принаймні один із домінуючих генів-промоторів воскової осуги на хромосомах 1В чи 2В і не має домінуючого гена-інгібітора на хромосомі 2D. Ініціальний амфідиплоїд Авротика мав зелений колір, тобто воскової осуг не було. Виходячи з його походження, відсутність цієї ознаки може бути спричинена тільки геном *Iw2*, який увійшов до складу геному амфідиплоїда від егілопсу [3]. Амфідиплоїд ААВВТТ одразу розщепився на три морфологічно різні форми: Авротика 1, яка нічим не відрізнялася від ініціального амфідиплоїда, Авротика 3 з більш рихлим колосом та Авротика 2, яка мала на колосі невеликі остеподібні відростки. Саме в Авротикі 2 за кілька генерацій серед зелених рослин почали з'являтися блакитні, тобто і колос, і листя були вкриті восковою осугою. Набагато пізніше, через 8–10 років, блакитні рослини почали з'являтися серед зелених рослин Авротики 1. За всіма іншими ознаками морфології, фізіології, а також деякими біохімічними генами блакитні рослини не відрізнялись від зелених. Виняток становили гени, що кодують гліадини (рис. 1). Блакитна форма амфідиплоїда є константною, зелена у кожній генерації вищеплює блакитні рослини.

Різниця в гліадиновому спектрі контрастних за восковою осугою рослин Авротики 2 добре помітна в ω -зоні (рис. 1); продукти цієї зони контролюються генами, розташованими у хромосомах першої гомологічної групи [10]. Спектри форм Авротики 2 з осугою та без осуги відрізняються одне від одного та від спектрів Авротики 1 та Аврори. Так, компоненти 3 та 6 наявні в Авротикі 1 та Авротикі 2 (зелені рослини), компонент 5 характерний виключно для останньої, а компонент 8, навпаки, у цієї рослин відсутній. Спектри обох форм Авротики 2 характеризуються наявністю компонента 9, якого немає у спектрах двох інших рослин. Компоненти 10, 11, 14, 15 наявні тільки у Авротикі 1, а компоненти зі слабкою активністю, 12 та 13, – у Авротикі 2 (блакитна рослина). За 17 та 21 компонентом контрастні форми Авротики 2 також розрізняються. Продемонстрована різниця в гліадинових спектрах рослин Авротики 2 вказує на наявність внутрішніх геномних перебудов, які, можливо, мають вплив на систему генів, що відповідають за ознаку воскова осуга.

Амфідиплоїд Міоза (ААВВМ'М') походить від схрещування лінії твердої пшениці *Mutiko italicum* (*T. durum*, ААВВ), що має воскову осугу, з диплоїдом *Ae. comosa* (М'М') без осуги. Ініціальний амфідиплоїд осуги не мав. Отже, геном М' має інгібітор воскової осуги *Iw2* у хромосомі

другої групи, який у складі генома амфідиплоїда пригнічував дію промотора осуги, притаманного 2В або 1В хромосомі лінії твердої пшениці. За кілька генерацій серед зелених рослин почали з'являтися блакитні, та рослини з зеленим колосом на блакитному стеблі, які не відрізнялись від зеленої форми за жодною з інших ознак, в тому числі за біохімічними маркерами [6].

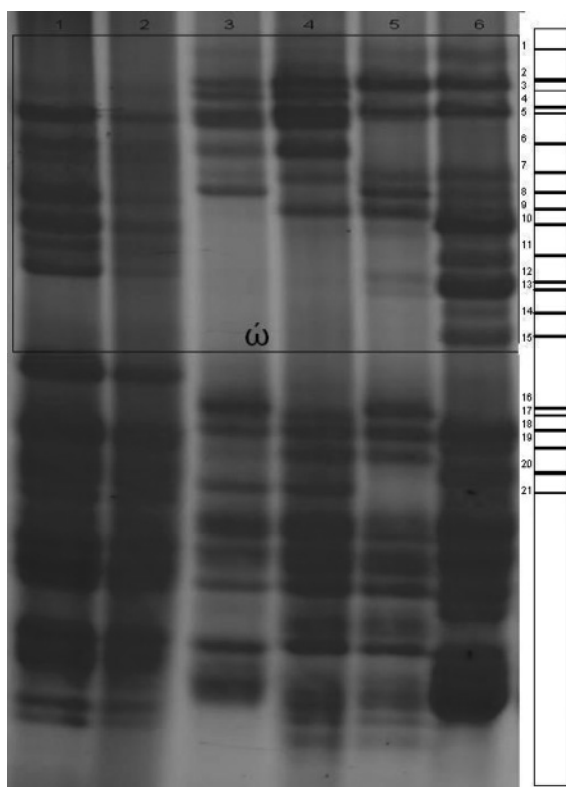


Рис. 1. Електрофоретичний спектр гліадинів окремих рослин: 1 – Міоза (зел.); 2 – Міоза (бл.); 3 – Авротика 1; 4 – Авротика 2 (зел.); 5 – Авротика 2 (бл.); 6 – Аврора

Ні Авротика, ні Міоза не утворюють природні гібриди з м'якою пшеницею при сумісному вирощуванні. Штучне запилення амфідиплоїдів пилюком м'якої пшениці дає невисокий відсоток

гібридів F_1 , які морфологічно значно відрізняються від амфідиплоїдів та є самостерильними. Результати гібридологічного аналізу свідчать, що гібриди F_1 Авротика (зел.) \times Авротика (бл.) та Міоза (зел.) \times Міоза (бл.) у реципроках були, як правило, зеленими, хоча існували й винятки (табл. 1).

Незважаючи на домінуючу природу ознаки зеленого колір, співвідношення між фенотипними класами у F_2 не відповідало ні моно-, ні полігенному розщепленню (3 зелених : 1 блакитна)ⁿ через надлишок блакитних рослин. Серед рослин F_2 від блакитних F_1 переважали зелені [6]. Фенотип F_1 Авротика 2 з колосом без воскової осуги \times Авротика з восковою осугою збігався з материнським компонентом схрещування. Появу блакитних форм амфідиплоїдів не можна пояснити перезапиленням через самостерильність F_1 від схрещування Авротика та Міози з м'якою пшеницею. Успадкування ознаки не можна пояснити жодною з моделей успадкування за Менделем. Причиною може бути будь-який прояв нестабільності генома, а також епігенетичні механізми генетичної мінливості.

Застосування SSR-праймерів, специфічних до хромосоми 2D, для різних форм амфідиплоїдів у всіх випадках дало продукти ампліфікації, хоча цей ген не входить до складу генома жодного амфідиплоїда. Це свідчить про геномну неспецифічність застосованих мікросателітних маркерів. Серед семи SSR-маркерів хромосоми 2D (шість для короткого та один для довгого плечей) тільки один (*Xbarc124-2DS*) (рис. 2) дав різні продукти ампліфікації у зеленій та блакитній форм Міози. Всі форми Авротика з праймерами до цього локусу, як і зі всіма іншими, специфічними для 2D хромосоми, мали однакові продукти ампліфікації, які, проте, відрізнялися від продукту Аврора.

За літературними даними, локус *Xbarc124* міститься на короткому плечі хромосоми 2D на відстані 0,9 сМ від гена *Iw2* [12]. Спектри усіх

Таблиця 1. Характеристика компонентів схрещування та гібридів F_1 від схрещування рослин Авротика та Міози з різними градаціями ознаки

Комбінація схрещування	Характеристика		
	материнського компонента	батьківського компонента	рослин F_1
(Авротика 1 \times Авротика 2) F_1	Зелений	Блакитний	Зелені
(Авротика 1 \times Авротика 1) F_1	Зелено-блакитний	Зелений	Зелені
(Авротика 1 \times Авротика 1) F_1	Зелений	Блакитний	Блакитні
(Авротика 2 \times Авротика 1) F_1	Блакитний	Зелений	Зелені
(Авротика 2 \times Авротика 2) F_1 \times (Авротика 1 \times Авротика 1) F_1	Блакитний	Зелено-блакитний	Блакитний
(Авротика 2 \times Авротика 2) F_1	Зелено-блакитний	Блакитний	Зелено-блакитний
(Міоза \times Міоза) F_1	Зелений	Блакитний	Блакитний
(Міоза \times Міоза) F_1	Блакитний	Зелений	Зелений

зразків мають добре виражений середній компонент. Верхні компоненти характерні для обох форм Міози та Аврори. Окрім цього, форма Міози з восковою осугою має нижній компонент, що і відрізняє її як від Міози без осуги, так і від інших зразків.

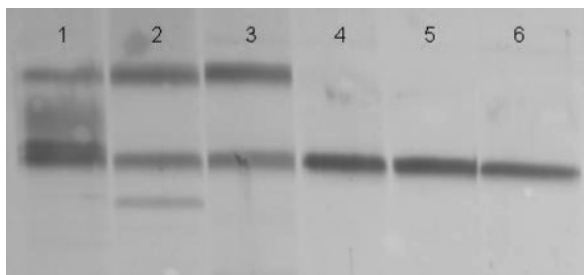


Рис. 2. Спектри компонентів ампліфікації ДНК рослин із праймерами до мікросателітного локусу *Xbarc124-2DS*: 1 – Міоза (зел.); 2 – Міоза (бл.); 3 – Аврора; 4 – Авротика 2 (зел.); 5 – Авротика 2 (бл.); 6 – Авротика 1

Серед шести SSR-маркерів хромосоми 2В (чотири для короткого та два для довгого плечей) три (*Xcfd238-2BS*, *Xbarc318-2BS*, *Xwmc361-2BL*) (рис. 3–5) дали різні продукти ампліфікації у зеленій та блакитній формах Міози.

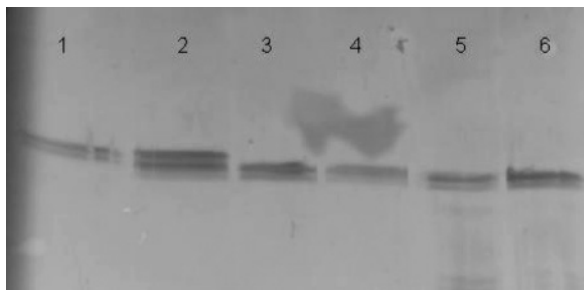


Рис. 3. Спектри компонентів ампліфікації ДНК рослин з праймерами до мікросателітного локусу *Xcfd238-2BS*: 1 – Міоза (зел.); 2 – Міоза (бл.); 3 – Аврора; 4 – Авротика 2 (зел.); 5 – Авротика 2 (бл.); 6 – Авротика 1

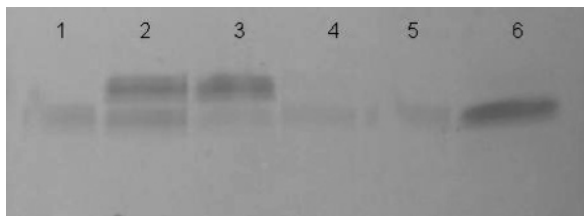


Рис. 4. Спектри компонентів ампліфікації ДНК рослин з праймерами до мікросателітного локусу *Xbarc318-2BS*: 1 – Міоза (зел.); 2 – Міоза (бл.); 3 – Аврора; 4 – Авротика 2 (зел.); 5 – Авротика 2 (бл.); 6 – Авротика 1

На електрофоретичному спектрі усіх зразків з праймерами локусу *Xcfd238* наявний чіткий подвійний продукт. Проте у Міози з восковою осугою також є верхній компонент, який відрізняє його від інших зразків.

У спектрах Міози з восковою осугою та Міози без воскової осуги з праймерами до мікросателітного локусу *Xbarc318* наявний верхній компонент. За нижнім компонентом зразки не відрізняються.

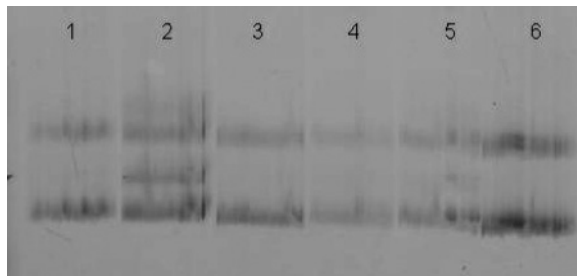


Рис. 5. Спектри компонентів ампліфікації ДНК рослин із праймерами до мікросателітного локусу *Xwmc361-2BL*: 1 – Міоза (зел.); 2 – Міоза (бл.); 3 – Аврора; 4 – Авротика 2 (зел.); 5 – Авротика 2 (бл.); 6 – Авротика 1

Усі шість зразків мають однакові верхні та нижні компоненти спектрів із праймером до мікросателітного локусу *Xbarc318*, проте у зразку Міоза (бл.) наявний середній компонент спектра, який відрізняє його від інших.

Таким чином, застосування мікросателітного аналізу показало різницю для маркерів, локалізованих на короткому плечі 2D хромосоми та обох плечах хромосоми 2В контрастних зразків Міози, хоча гени-промотори воскової осуги розташовані на короткому плечі. Отримані результати дають змогу припустити наявність внутрішньохромосомної перебудови, яка відрізняє зелену та блакитну форми цих рослин. У різних за восковою осугою форм Авротика 2 всі перевірені мікросателітні локуси були однакові, хоча саме ці зразки різнилися за гліадиновими спектрами, що вказує на залучення у мінливість хромосом першої гомеологічної групи. Отже, результати ампліфікації геномної ДНК різних генотипів із праймерами до мікросателітних повторів, специфічних до хромосом 2В та 2D, не показують, що зміна експресії критичного гена супроводжується зміною алелів мікросателітних маркерів, розташованих в тому самому плечі хромосоми.

Висновки

За наведеними результатами можна зробити тільки один висновок: успадкування ознаки, що досліджується, не можна пояснити жодною з моделей успадкування, які впливають із наших знань про міжгалецьку взаємодію генів та розщеплення гібридних рослин. Причиною явища, що спостерігається, може бути будь-який прояв нестабільності генома, а також епігенетичні механізми генетичної мінливості.

Література

1. McIntosh R. A. Catalogue of gene symbols for wheat. – Режим доступу: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassListAction.do;jsessionid=F54FF94AC5CB6B149335AA526372A781.lb1?geneClassificationId=133>. – Назва з екрана.
2. McIntosh R. A. Catalogue of gene symbols for wheat. – Режим доступу: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassListAction.do;jsessionid=F54FF94AC5CB6B149335AA526372A781.lb1?geneClassificationId=183>. – Назва з екрана.
3. Tsunewaki K. Production of near-isogenic lines of common wheat for glaucousness and genetic basis of this trait clarified by their use / K. Tsunewaki, K. Ebana // *Genes and Genetic Systems*. – 1999. – Vol. 74. – P. 33–41.
4. Pukhalskiy V. A. Genetic analysis of spike waxlessness in a line of common wheat *Triticum aestivum* L. / V. A. Pukhalskiy, I. V. Iordanskaya, E. D. Badaeva, E. N. Bilinskaya // *Russian Journal of Genetics*. – 1999. – Vol. 35. – P. 1050–1054.
5. Dubcovsky J. Seed-storage-protein loci in RFLP maps of diploid, tetraploid, and hexaploid wheat / J. Dubcovsky, M. Echaide, S. Giancola, M. Rousset, M. C. Luo, L. R. Joppa, J. Dvorak // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1997. – Vol. 95. – P. 1169–1180.
6. Шпильчин В. В. Фенотипний поліморфізм за ознакою воскова осуґа серед представників підтриби *Triticinae* / В. В. Шпильчин, М. З. Антонюк, Т. К. Терновська // *Наукові записки НАУКМА. Біологія та екологія*. – 2010. – Т. 106. – С. 3–8.
7. Murray M. G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M. G. Murray, W. F. Thompson // *Nucleic Acids Research*. – 1980. – Vol. 8. – P. 4321–4325.
8. Röder M. S. A microsatellite map of wheat / M. S. Röder, V. Korzun, K. Wendehake // *Genetics*. – 1998. – Vol. 149. – P. 2007–2023.
9. Benbouza H. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels / H. Benbouza, J.-M. Jacquemin, J.-P. Baudoin // *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* – 2006. – Vol. 10. – P. 77–81.
10. Антонюк М. З. Створення та генетичне маркування ліній пшениці з хромосомами трьох видів егілопсу : дис. на здобуття наук. ступня канд. біол. наук : спец. 03.00.15 / М. З. Антонюк // *Інститут агроекології та біотехнології*. – К., 1995. – 163 с.
11. Жиров Е. Г. Геномы пшеницы: исследование и перестройка : дис. на здобуття наук. ступня доктора біол. наук : спец. 03.00.15 / Е. Г. Жиров // *ВАСГНІЛІ Науково-дослідницький інститут сільського господарства ім. П. П. Лук'яненко*. – Краснодар, 1989. – 350 с.
12. Johnson E. B. Mapping the compactum locus in wheat (*Triticum aestivum* L.) and its relationship to other spike morphology genes of the *Triticeae* / E. B. Johnson, V. J. Nalam, R. S. Zemetra, O. Riera-Lizarazu // *Euphytica*. – 2008. – Vol. 163. – P. 193–201.

V. Shpylchyn, T. Ternovska

CHANGES IN APPEARANCE OF GLAUOUSNESS IN GENERATIONS OF AMPHIDIPOIDS IN THE *TRITICINAE* SUBTRIBE

*An unexpected change in the appearance of glaucousness was observed in two artificial amphidiploids of *Triticinae*: *Aurotica* (AABBTT) and *Miosa* (AABBMtMt). After several generations, blue plants and plants with a green spike on a blue stem started to appear among the green plants. Considering the origin of the amphidiploids, their intrinsic non-glaucousness can be caused only by the *Iw2* gene conferred to their genome by *Aegilops* species. F_1 hybrids from the reciprocal crossings of green and blue forms were generally green. The ratio of phenotypic classes in F_2 was different from (3 green : 1 blue)ⁿ because of an excess of blue plants. The SSR primers specific to chromosome 2D generated amplification products, though this genome is absent in any of our amphidiploids. The inheritance of the trait cannot be explained by any of the Mendelian inheritance models. The reason for this may lie in any expression of genomic instability or epigenetic mechanisms of genetic variation.*

Keywords: amphidiploids, genome structure, glaucousness, genetic instability, microsatellite analysis.

Матеріал надійшов 27.08.2011