

АТИВНІСТЬ ТРАНСПОЗОНА ЯК ЧИННИК ВТРАТИ ФУНКЦІЇ ГЕНА *Iw2(T)* У НАЩАДКІВ ШТУЧНИХ АМФІДИПЛОЇДІВ *TRITICINAE*

Віддалена гібридизація є одним з найефективніших способів поповнення генетичного пулу культивованих видів за генами, що контролюють суттєві для селекції ознаки [1]. Створені за допомогою такого способу штучні пшеничні алогексаплоїди, які поєднують у собі генетичну інформацію від культурного сорту і дикорослого виду, є своєрідним «містком» у процесі передачі генів корисних ознак, наприклад, стійкості до біотичних та абіотичних факторів, до генофонду пшениці. Для цілеспрямованої та успішної роботи з такими об'єктами потрібно розуміти процеси, що відбуваються у гібридних геномах внаслідок геномного шоку, якій супроводжує об'єднання геномів, що не належать одному виду [2]. Стабілізація таких процесів триває роками, і наслідки перебудов проявляються у вигляді несподіваного прояву певних ознак та відхилення їхнього успадкування від класичних генетичних законів. У науковій літературі причиною таких явищ називають парамутації, зміну профілів метилування, активність міРНК та рух мобільних генетичних елементів [3–5].

Геномно-заміщений алогексаплоїд Авротіка (ААВВТТ), що містить тетра-компонент ААВВ геному сорту м'якої пшениці Аврора та геном ТТ від диплоїдного виду *Amblyopyrum muticum* (Boiss Eig), є мінливим за ознакою наявності/відсутності воскової осуги [6]. Прояв і успадкування цієї ознаки відбувається з порушенням законів Менделя, що, цілком ймовірно, є наслідком віддаленої гібридизації та виникнення геномного стресу. Саме тому воскова осуга була обрана нами як модельна ознака для вивчення внутрішньогеномних процесів у рослин з інтрогресивним геномом.

У попередніх роботах, на прикладі контрастних за восковою осугою амфідиплоїдів Авротіка, нами було показано, що розщеплення за геном інтересу (інгібітором воскової осуги) відбувається у геномі Т і контрастні за ознакою морфотипи Авротіки відрізняються за одним або двома генами [7]. Поява рослин, що мають воско-

ву осугу серед нащадків Авротіки 2, які не мали цієї ознаки, спостерігається регулярно, і може бути пояснена одночасним мутуванням генів: $Iw2(T) \rightarrow iw2(T)$ та $Iw3(T) \rightarrow iw3(T)$, що, очевидно, є наслідком молекулярних подій, спричинених геномним стресом. Нами було доведено, що ген *Iw2(T)* та мікросателітний локус *Xwms702* можуть бути зчепленими у хромосомі 2Т [8] та показана можливість застосування маркерної системи IRAP/REMAP для аналізу рослинного матеріалу щодо наявності перебудов, викликаних ретротранспозонами [9]. У цій роботі було здійснено спробу використати молекулярну маркерну систему, що ґрунтується на транспозонах та мікросателітних локусах (REMAP), для вирішення питання: чи не пов'язана втрата активності домінантного гена *Iw2(T)* – інгібітора воскової осуги на рослинах штучного амфідиплоїда з геномом АВТ з рухом транспозонів, активізація якого могла бути спричиненою об'єднанням чужинних геномів в межах штучно створеного.

Матеріали і методи

У роботі використовували наступний рослинний матеріал: сорт пшениці Аврора, штучні амфідиплоїди Авротіка 1 без воскової осуги (зелена), Авротіка 2 з восковою осугою (блакитна); гібриди F_4 від схрещування Авротіка 1 (зелена) х Авротіка 2 (блакитна), які є нащадками рослин F_3 , гомозиготних за алелями мікросателітних локусів, задіяних у роботі, та за генами, що контролюють ознаку наявності/відсутності воскової осуги.

Для пошуку відмінностей у геномах амфідиплоїдів з різними морфотипами за ознакою інтересу було використано технологію REMAP [10]. ДНК вказаних зразків ампліфікували з праймерами до довгих термінальних повторів ретротранспозонів *Sukkulla*, *Nikita*, *Sabrina* та трьох мікросателітних локусів. Для екстракції ДНК брали по 4 зернини з кожної рослини F_4 , пророщували та виділяли ДНК за модифікованою СТАВ-методикою [11]. Реакційна ПЛР-суміш

об'ємом 25 мкл містила 250 нМ кожного праймера, 50 нг ДНК, по 0,2 мМ кожного дезокси-трифосфату, 1,5 мМ MgCl₂, 1 U Taq-полімерази (ThermoScientific, Литва) у рекомендованому виробником буфері. Умови проходження ампліфікації (ампліфікатор Applied Biosystem 2700): 35 циклів, початкова денатурація – 94°C, 3 хв; денатурація – 94°C, 30 с; гібридизація – 56°C; елонгація – 72°C, 2 хв; кінцева елонгація – 72°C, 10 хв. Продукти ампліфікації у суміші 10–13 мкл ампліфікату з 1 мкл буфером нанесення (30 % гліцерину, бромфеноловий синій, ксиленціанол) розділяли у 1,7 %-ому агарозному гелі протягом 15–20 годин, параметри струму: 70 В, 95 мА. Продукти візуалізували за допомогою етидіум броміду.

Результати та обговорення

Рослинні зразки, обрані для дослідження, характеризуються відмінностями стосовно двох ознак: формування шару воскової осуги на рослинах, що досягли певної онтогенетичної стадії розвитку (Авротіка 2 та деякі лінії F₄) чи відсутність такого шару (Авротіка 1 та деякі лінії F₄) та алелів мікросателітних локусів *Xwms702*, *Xwms102*, *Xbarc124*, специфічних для хромосоми 2D пшениці [13, 14]. Для аналізу рослинного матеріалу, що відрізняється за ознакою наявності/відсутності воскової осуги, було підібрано низку комбінацій REMAP праймерів. Комбінації склалися з пари: праймер до мікросателітної послідовності та праймер до довгих термінальних повторів (LTR) або SINE-подібних послідовностей ретротранспозонів. Серед трьох використаних мікросателітних локусів *Xwms702*, за нашими даними, успадковується зчеплено з геном *Iw2(T)* (ген інтересу) [8], *Xwms102* розташовується поблизу гена інтересу, але у наших популяціях успадковується незалежно від нього [8], *Xbarc124*, за літературними даними [12], є зчепленим з геном *Iw2(D)*, який розташований на хромосомі пшениці 2D [12, 13]. З пари праймерів, фланкуючих мікросателіт, у всіх випадках було обрано лівий, *Xwms702 Forward*, *Xbarc124 Forward* та *Xbarc124 Forward*, оскільки саме в цьому випадку забезпечується добра ампліфікація в парі з відповідними праймерами до послідовностей ретротранспозонів *Sukkula*, *Nikita*, *Sabrina*, *RemapCAN*, *RemapGAN*, *IVit124* та *LTR6150*. Було перевірено 21 пару REMAP праймерів. Їхні 15 комбінацій, що давали продукт ампліфікації, та результати ампліфікації щодо кількості та розмірів продуктів у спектрах наведені в таблиці.

Таблиця 1

Комбінації REMAP праймерів і продукти ампліфікації

| Комбінація праймера | T(a) | Максимальна кількість продуктів ампліфікації | Розмір продуктів, п.н. |
|---------------------------|------|--|------------------------|
| <i>Xbarc124F/Sukkula</i> | 56 | 16 | 400–1400 |
| <i>Xbarc124F/Nikita</i> | 56 | 9 | 300–1200 |
| <i>Xbarc124F/REMAPGAN</i> | 56 | 6 | 380–1500 |
| <i>Xbarc124F/Sabrina</i> | 56 | 8 | 800–1600 |
| <i>Xbarc124F/RemapCAN</i> | 56 | 6 | 200–750 |
| <i>Xbarc124F/LTR6150</i> | 56 | 4–6 | 350–2000 |
| <i>Xwms102F/Sukkula</i> | 56 | 10 | 400–3000 |
| <i>Xwms102F/Nikita</i> | 56 | 5–6 | 600–3000 |
| <i>Xwms102F/Sabrina</i> | 56 | 7 | 550–2400 |
| <i>Xwms102F/RemapCAN</i> | 56 | 9–11 | 650–1800 |
| <i>Xwms702F/Sukkula</i> | 56 | 10 | 600–2200 |
| <i>Xwms702F/Nikita</i> | 56 | 5 | 650–3500 |
| <i>Xwms702F/Sabrina</i> | 56 | 4 | 1200–1500 |
| <i>Xwms702F/LTR6150</i> | 56 | 6 | 750–1700 |
| <i>Xwms702F/RemapCAN</i> | 56 | 6–7 | 400–2000 |

Інформативним є порівняння спектрів ампліконів, отриманих з REMAP-праймерами у цьому (рис.) та у попередньому дослідженні [9]. Тоді застосовували IRAP технологію, коли ампліфікація відбувалася лише між послідовностями до довгих термінальних повторів або SINE-подібних послідовностей ретротранспозонів, та REMAP-технологію, проте мікросателітні локуси, не були прив'язані до гена інтересу. Тоді кількість компонентів спектра була настільки велика, що це ускладнювало процес ідентифікації окремих ампліконів та знижувало у цілому роздільну здатність задіяних технологій для пошуку відмінностей за спектрами між морфологічно контрастними формами. У цьому дослідженні кількість розділених компонентів продуктів ампліфікації зменшилася значною мірою. Це можна пояснити більшою специфічністю REMAP системи, порівняно з IRAP, саме за рахунок наявності одного праймера, специфічного до конкретних мікросателітних послідовностей. Спектри, отримані за участю різних REMAP-праймерів, були переважно мономорфними. Єдиним виключенням стала пара праймерів *Xwms702F/RemapCAN*, що її застосування для ампліфікації ДНК давало зайвий компонент спектру на ДНК гібридних ліній з восковою осугою у порівнянні зі спектром ДНК з рослин, позбавлених воскового шару (рис.).

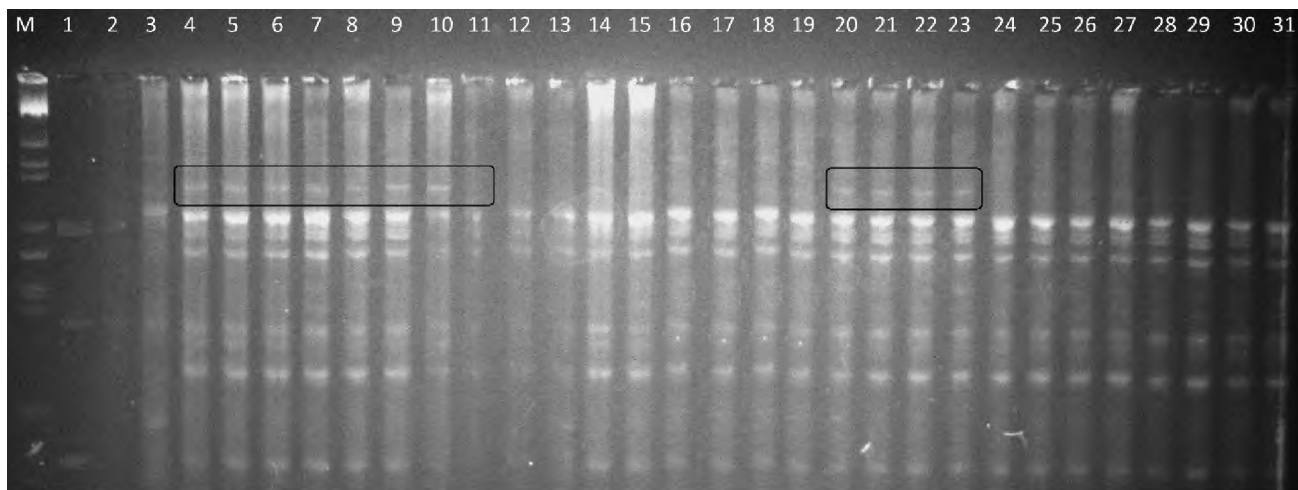


Рис. 1. Поліморфні спектри продуктів ампліфікації ДНК з REMAP праймером *Xwms702F/RemapCAN*. М – маркер молекулярних мас, 1 – Авротіка 2 блакитна; 2 – Авротіка 1 зелена; 3 – Аврора; 4, 5, 6, 7 – F₄ (блакитні); 8, 9, 10, 11, – F₄ (блакитні); 12, 13, 14, 15 – F₄ (зелені); 16, 17, 18, 19 – F₄ (зелені); 20, 21, 22, 23 – F₄ (блакитні); 24, 25, 26, 27 – F₄ (зелені); 28, 29, 30, 31 – F₄ (зелені)

Зареєстровано зменшення компонентів спектра у Аврори, Авротики 1 та Авротики 2 (батьківські форми) порівняно зі спектрами, отриманими на ДНК гібридних ліній. У той же час, деякі компоненти, що були у наявності у спектрах батьківських форм, у спектрах ДНК від гібридів відсутні. Цю особливість можна розглядати як приклад не адитивності елементів прояву геномної структури, коли аналізу піддаються геноми гібридного походження, про що неодноразова вказували дослідники при використанні різних молекулярних маркерних систем та різних гібридних геномів [15, 17]. У нашому випадку, це Авротіка порівняно з Авророю та гібриди F₄ від схрещування двох штучних амфідиплоїдів, контрастних за ознакою морфології рослин. Відмінність кількості компонентів батьківських форм та їхніх похідних можна пояснити більшою кількістю внутрішньо геномних перебудов, що могли відбутися у нащадків внаслідок активності мобільних генетичних елементів. З деякими праймерами, а саме з *Xbarc124F/LTR6150*, *Xwms102F/Nikita* та *Xwms102F/RemapCAN* окремі зразки мали відмінну кількість компонентів у спектрах, порівняно з іншими зразками. Так, зразок 6, що ампліфікувався з *Xbarc124F/LTR6150*, мав 4 компоненти замість 6; зразок 11, що ампліфікувався з *Xwms102F/Nikita*, мав додатковий довший компонент; зразок 14 мав два додаткових компоненти, порівняно з рештою зразків. Оскільки з іншими праймерами дані зразки не проявляють відмінностей у спектрах продуктів ампліфікації, то

можна припустити, що такі відмінності мають випадковий характер і пов'язані з особливостями будови окремих геномів.

Серед 15 пар REMAP праймерів, що ампліфікувалися зі зразками ДНК, лише з комбінацією *Xwms702F/RemapCAN* ми отримали відмінні спектри серед ДНК рослин, що розщеплюються за ознакою інтересу. Як продемонстровано на рисунку, у спектрах продуктів ампліфікації зразків 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, а також 20, 21, 22, 23, які є нащадками рослин F₃, що мають блакитний фенотип (наявність воскової осуги), присутній чіткий компонент розміром приблизно 2000 п.н. Цей компонент відсутній у спектрах зразків, що мають зелений фенотип (відсутність воскової осуги). З іншими комбінаціями праймерів до мікросателітних локусів – *Xbarc124F* та *Xwms102F/RemapCAN* не ампліфікував поліморфних продуктів. Локус *Xwms702* є зчепленим з геном *Iw2(T)*, тому можна припустити, що ампліфікація поліморфних продуктів у комбінації з праймером до довгих термінальних повторів ретротранспозонів *RemapCAN* прямо вказує на наявність перебудов, пов'язаних з активністю транспозонів поблизу даного гена. Це, у свою чергу, може бути причиною втрати домінантного стану гена *Iw2(T)* і причиною появи блакитного фенотипу.

Висновки

Враховуючі отримані результати та зважаючи на попередні дослідження, можна припустити, що однією з причин зміни прояву ознаки

наявність/відсутність воскової осуги у штучних амфідиплоїдах є геномні перебудови, викликані активністю мобільних генетичних елементів. На це вказує наявність поліморфних продуктів у електрофоретичних спектрах у результаті ампліфікації з праймером REMAP *Xwms702F/RemapCAn* ДНК рослин, контрастних за ознакою інтересу. Наявність у складі REMAP систе-

ми лівого праймеру до мікросателітного локусу *Xwms702F* дає можливість припустити, що генетичні перебудови відбулися саме поблизу гена *Iw2(T)*, у результаті чого в послідовних генераціях ми спостерігаємо втрату його інгібуючої функції та появу рослин, поверхня листків і колосу яких вкрита восковою осугою.

ЛІТЕРАТУРА

- Gill B.S., Friebe B.R., White F.F. Alien introgressions represent a rich source of genes for crop improvement // Proc Natl Acad Sci USA. – 2011. – 108. – P. 7657–7658.
- Feldman M., Levy A.A. Genome evolution in allopolyploid wheat—a revolutionary reprogramming followed by gradual changes // J. Genet. Genomics. – 2009. – 36. – P. 511–518.
- Kashkush K., Khasdan V. Large-scale survey of cytosine methylation of retrotransposons and the impact of readout transcription from long terminal repeats on expression of adjacent rice genes // Genetics. – 2007. – 177, N 4. – P. 1975–1985.
- Madlung A., Wendel J.F. Genetic and epigenetic aspects of polyploid evolution in plants // Cytogenet Genome Res. – 2013. – 140. – P. 270–285.
- Yaakov B., Kashkush K. Methylation, transcription and rearrangements of transposable elements in synthetic allopolyploids // Intern. J. of Plant Genomics. – 2011. doi:10.1155/2011/569826.
- Antonyuk M.Z., Shpylchyn V.V., Ternovska T.K. Permanent genetic variability in the introgressive lines and amphidiploids of *Triticaceae* // Cytology and Genetics. – 2013. – 47 (4). – P. 242–251.
- Шпильчин В.В., Терновська Т.К. Зміна прояву ознаки воскова осуга у генераціях амфідиплоїдів підтриби *Triticinae* // Наукові записки НаУКМА. Біологія та екологія. – 2011. – 119. – С. 3–7.
- Shpylchyn V.V., Antonyuk M.Z., Ternovska T.K. Genetic analysis of artificial amphidiploid Aurotica based on the glaucousness trait // Cytology and Genetics. – 2014. – 48, N 5. – P. 308–317.
- Шпильчин В.В., Терновська Т.К. Застосування технології IRAP та REMAP для пошуку поліморфізму серед амфідиплоїдів нестабільних за ознакою воскова осуга // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2013. – 12. – С. 181–182.
- Kalendar R., Schulman A. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting // NATURE PROTOCOLS. – 2006. – 1. – P. 2478–2484.
- Pervaiz Z.H., Turi N.A., Khaliq I. Methodology: a modified method for high-quality DNA extraction for molecular analysis in cereal plants // Genetics and molecular research : GMR. – 2011. – 10, N 3. – P. 1669–1673.
- Watanabe N., Takesada N., Shibata Y., Bam T. Genetic mapping of the genes for glaucous leaf and tough rachis in *Aegilops tauschii*, the D-genome progenitor of wheat // Euphytica. – 2005. – 144. – P. 119–123.
- Tsunewaki K., Ebana K. Production of near-isogenic lines of common wheat for glaucousness and genetics basis of the trait clarified by their use // Genes. Genet. Syst. – 1999. – 74. – P. 33–41.
- Ganal M.W., Röder M.S. Microsatellite and SNP markers in wheat breeding // Genomics Assisted Crop Improvement. Vol. 2. Genomic Applications in Crops / Eds R.K. Varshney, R. Tuberosa. – Springer, 2007. – P. 1–24.
- Bento M., Gustafson P., Viegas W., Silva M. Size matters in *Triticaceae* polymorphism: larger genomes have higher remodeling // Genome. – 2011. – 54. – P. 175–183.
- Tang Z.X., Fu S.L., Ren Z.L., Zhou J.P., Yan B.J., Zhang H.Q. Variations of tandem repeat, regulatory element, and promoter regions revealed by wheat-rye amphiploids // Genome. – 2008. – 51, No 6. – P. 399–408.
- Bento M., Gustafson P., Viegas W., Silva M. Genome merger: from sequence rearrangements in triticale to their elimination in wheat-rye addition lines. Theor. Appl. Genet. – 2010. – 121, No 3. – P. 489–497.

SHPYLCHYN V.V., MYKHAILYK S.YU., TERNOVSKA T.K.

National University of “Kyiv-Mohyla Academy”,

Ukraine, 04070, Kyiv, Skovorody str., 2, e-mail: vshpylchyn@gmail.com

TRANSPOSONS ACTIVITY AS A FACTOR OF LOSS *IW2(T)* GENE FUNCTION IN THE OFFSPRINGS OF ARTIFICIAL *TRITICINAE* AMPHIDIPOIDS

Aim. To check the possible role of retrotransposons in the variation initiation, which causes activity loss of *Iw²(T)* gene. **Methods.** REMAP-technic for detection changes in genetic sequences caused by transposon activity. **Results.** All hybrid lines which are considered to have an inactivated gene-inhibitor of glaucousness and are recessive mutants (*Iw²(T)*→*iw²(T)*) were characterized by appearance of additional component in the electrophoretic spectrum obtained with primers *Xwms702F/RemapCAn*. **Conclusions.** Possible molecular base of the mutation *Iw²(T)*→*iw²(T)* can be transposon movement, resulting in gene expression and release of a functional product.

Keywords: artificial wheat amphidiploids, glaucousness, *Amblyopyrum muticum*, REMAP, transposons.