

ЦИТОЛОГІЧНА СТАБІЛЬНІСТЬ ТА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ З ГАМЕТОЦИДНОЮ ХРОМОСОМОЮ 4S¹ ТА ЇХ ГІБРИДІВ

Інтрогресивні лінії м'якої пшениці *T. aestivum/Ae. sharonensis* з гаметоцидною хромосомою 4S¹, а також без неї, вивчено щодо їх цитологічної стабільності, схожості насіння та фертильності гібридів F₁ від схрещування цих ліній з інтрогресивними лініями іншого походження та сортами м'якої пшениці. Показано, що незважаючи на певну цитологічну нестабільність ліній та їх гібридів та знижену схожість насіння більшості ліній вони можуть бути застосовані у схрещуванні з іншими інтрогресивними лініями та сортами м'якої пшениці у якості індуктора хромосомних перебудов через формування еуплоїдних рослин з певним рівнем фертильності.

Вступ

М'яка пшениця як вид є збідненою на гени стійкості до численних хвороб, а також до дії абіотичних стресів. Джерелом потрібних генів можуть стати її численні родичі з дикорослої флори [1]. Передача чужинних генів до геному пшениці є складним процесом, і серед методів, що їх нині використовують для зміни геному пшениць і злаків, домінують методи хромосомної інженерії. Одним з придатних засобів передачі чужинних генів до геному пшениці є індукція транслокацій чужинних хромосом на хромосоми пшениці за допомогою дії гаметоцидних генів [2, 3]. Гаметоцидні гени викликають руйнування хромосом чоловічих і жіночих гамет, що їх не містять, коли такі гамети формуються рослиною, гетерозиготною за гаметоцидним геном. У результаті цього гетеро- і гемізиготи рослини виявляють часткову стерильність. Крім того, гаметоцидні гени викликають руйнування хромосом при утворенні зиготи у тому випадку, коли пилко, який містить гаметоцидний ген, запліднює гамету, яка його не містить [4–6]. Гаметоцидні хромосоми є джерелом виникнення хромосомних аберацій, які передаються нащадкам і закріплюються у поколіннях. [7, 8]. Гаметоцидні гени, їх локалізація і вплив на генетичний матеріал є предметом великого інтересу дослідників, які працюють над інтрогресією чужинного матеріалу до геному пшениці. Інтрогресивні лінії м'якої пшениці, що несуть гаметоцидну хромосому, і гібриди між цими лініями та м'якою пшеницею стали інструментом для часткової інтрогресії через індукцію транслокацій чужинних хромосом на хромосоми пшениці.

Гаметоцидний ген хромосоми 4S¹ вважається одним з найбільш сильних за здатністю викликати руйнування хромосом. Це може обмежува-

ти його застосування у дослідах з хромосомної інженерії пшениці. У статті наведено результати дослідження, виконаного з метою встановити, чи можна використовувати лінії з гаметоцидною хромосомою 4S¹ як індуктора хромосомних перебудов у гібридах між носіями окремих інтрогресій від різних родичів м'якої пшениці без катастрофічного впливу на фертильність гібридів першого покоління, адже за умов їх стерильності подальша робота з ними виявляється неможливою.

Матеріал та методи

Було досліджено 26 ліній *T. aestivum/Ae. sharonensis*, які несуть (11 ліній) чи не несуть (15 ліній) хромосому 4S¹, сорт м'якої пшениці Аврора, гібриди F₁ різного походження та їх насінневі нащадки F₂. Для отримання гібридів F₁ у якості чоловічих компонентів схрещування використано інтрогресивні лінії *Triticum aestivum/Aegilops sharonensis*, до складу генома яких входить (шість ліній) чи не входить (чотири лінії) гаметоцидна хромосома 4S¹. Наявність чи відсутність 4S¹ хромосоми було встановлено завдяки використанню молекулярно-генетичного маркера, гена β -*Amy*-1, з урахуванням картини асоціації хромосом у M1 мейозу материнських клітин пилку у гібридів досліджуваних ліній із сортом м'якої пшениці Аврора. Жіночими компонентами схрещування слугували гібриди F₁, отримані від схрещування інтрогресивних ліній *T. aestivum/Ae. speltoides* та *T. aestivum/Ae. umbellulata* із сортом Аврора, 3 комбінації; інтрогресивних ліній *T. aestivum/Ae. speltoides* та *T. aestivum/Ae. umbellulata* одна з однією у будь-якому напрямку, 13 комбінацій; інтрогресивних ліній *T. aestivum/Ae. speltoides* та *T. aestivum/Ae. sharonensis* у будь-якому напрямку, 6 комбінацій,

інтрогресивних ліній *T. aestivum/Agropyrum glaucum* із сортом м'якої пшениці Одеська 267, 2 комбінації. Гібриди, отримані від схрещування вказаних гібридів F_1 із інтрогресивними лініями, що мали (група 1) чи не мали (група 2) гаметоцидну хромосому, не мусили бути одноманітними через гібридну природу жіночого компонента схрещування. Тому насіння F_2 збирали та піддавали аналізу від кожної рослини F_1 окремо.

Для перевірки схожості насінин ліній та контролю кількості хромосом 100 насінин пророщували у чашках Петрі до стадії 3-6-денних паростків. Визначали схожість кожної лінії, потім підраховували кількість хромосом у рослин, що дали корінці. Кількість хромосом встановлювали на стадії метафаза мітозу на давлених препаратах первинних корінців, приготовлених за стандартною для пшениці методикою [9]. Кількість насінин F_2 коливалась від 36 до 215 за наявності.

Кожна рослина F_1 була охарактеризована за ознакою фертильності. Для цього підраховували кількість колосків у кожної рослини і кількість зерен у цих колосках, а також очікувану кількість зерен такій кількості колосків. Передбачається, що кожен колосок повинен містити мінімум 2 зерна. Отже, для розрахунку кількість колосків множили на два. Після цього знаходили співвідношення реальної кількості зерен до очікуваної (частка), яке використовували як показник фертильності кожної рослини.

Статистичну обробку результатів виконано з використанням методів роботи з параметричними та непараметричними змінними залежно від наявності нормального розподілу варіантів за ознакою, що вивчається [10].

Результати та обговорення

Схожість насіння інтрогресивних ліній коливалась від $19 \pm 3,92$ до $87 \pm 3,34$ % (табл. 1) проти 100% схожості сорту Аврора. Це певною мірою відображає вплив геномних перебудов, які відбулися у лініях порівняно з геномом сорту Аврора, на нормальну життєдіяльність рослин. Спостереження метафазних пластинок мітозів у корінцях показало велику різницю між лініями та сортом Аврора. Серед паростків сорту не було жодного анеуплоїда. Кількість хромосом серед паростків інтрогресивних ліній коливалась від 40 до 44 (табл. 1), а серед насінин F_2 від різного типу схрещувань із залученням інтрогресивних ліній, які вивчаються, – від 38 до 45. В обох випадках звичайним явищем були: наявність дицентричних хромосом, іноді більше двох у зразку, телоцентричних хромосом, дуже маленьких хромосом, які можна розглядати як результат демінуції хроматину. Крім того, деякі гібриди мали 3 та 4 хромосоми зі супутниками, в той час коли

сорт Аврора, рекурентний компонент схрещування при отриманні інтрогресивних ліній [11], має тільки 2 таких хромосоми.

Таблиця 1. Характеристика ліній щодо схожості насіння та кількості анеуплоїдних паростків, %

Лінія	Схожість	Анеуплоїдія	Лінія	Схожість	Анеуплоїдія
115	$44 \pm 4,96$	$23 \pm 6,65$	135	$34 \pm 4,73$	$10 \pm 5,44$
117	$71 \pm 4,54$	$23 \pm 5,22$	136	$44 \pm 4,96$	$13 \pm 5,31$
118	$51 \pm 5,00$	$19 \pm 5,66$	137	$87 \pm 3,34$	$4 \pm 2,18$
121	$19 \pm 3,92$	$11 \pm 7,59$	138	$27 \pm 4,44$	$6 \pm 5,06$
122	$39 \pm 4,88$	$12 \pm 5,42$	139	$48 \pm 5,00$	$7 \pm 3,98$
126	$44 \pm 4,96$	$9 \pm 4,52$	140	$46 \pm 4,98$	$11 \pm 4,83$
127	$48 \pm 5,00$	$9 \pm 4,52$	141	$33 \pm 4,70$	$19 \pm 7,16$
128	$67 \pm 4,70$	$21 \pm 5,05$	142	$56 \pm 4,96$	$14 \pm 4,81$
129	$54 \pm 4,98$	$13 \pm 4,85$	143	$86 \pm 3,47$	$3 \pm 1,90$
130	$61 \pm 4,88$	$24 \pm 5,98$	144	$67 \pm 4,70$	$10 \pm 3,78$
131	$38 \pm 4,85$	$8 \pm 4,65$	145	$42 \pm 4,94$	$4 \pm 3,14$
132	$80 \pm 4,00$	$17 \pm 4,52$	146	$32 \pm 4,66$	$5 \pm 4,12$
134	$78 \pm 4,14$	$11 \pm 3,82$	148	$38 \pm 4,83$	$24 \pm 7,80$

Примітка: лінії, що містять хромосому $4S^1$, підкреслено.

Отримані результати показують, що всі інтрогресивні лінії *T. aestivum/Ae. sharonensis* характеризуються цитологічною нестабільністю. Кількість анеуплоїдів коливалась від $3 \pm 1,90$ % до $24 \pm 7,80$ % в лінії (табл. 1) та від $37 \pm 5,01$ до $78 \pm 3,55$ – в гібридних паростків F_2 .

Наявність дицентричних хромосом, телоцентриків, маленьких хромосом та зайвих хромосом із супутниками спостерігається у паростків ліній як з гаметоцидною, так і без гаметоцидної хромосоми. Серед ліній з $4S^1$ хромосомою дицентрики мали лінії 115, 132, лінія 139 мала демінутивні хромосоми, лінії 117, 118, 127, 128 та 139 мали чотири пари супутникових хромосом замість двох. Серед ліній без $4S^1$ дицентрики є у лініях 121, 122, демінутивні хромосоми у лінії 129, лінії 130 та 132 мають зайві супутникові хромосоми. Показано, що гаметоцидний ген виявляє в гемізиготному або гетерозиготному стані гаметоцидну дію, яка проявляється в індукції розривів хромосом у гаметах, позбавлених гаметоцидного гена [12]. Очевидно, дія гаметоцидної хромосоми $4S^1$ пов'язана з реалізацією циклу міст-розрив-злиття під час мейотичних поділів. Цей процес мав реалізуватися під час створення інтрогресивних ліній при схрещуванні геномно-заміщеної форми Аврозис з рекурентним сортом м'якої пшениці Аврора [11].

Коефіцієнт кореляції Спірмена між схожістю насінин та кількістю анеуплоїдів серед паростків дорівнював $r_s = 0,05$. Це вказує на відсутність прямої залежності між кількістю хромосом у насінині та її здатністю до проростання й формування паростка. Отже, порушення у кількості та

структурі хромосом гаметоцидних ліній та їх гібридів порівняно з іншими лініями пшениці можуть бути цілком сумісні із нормальним ростом та розвитком рослин. Дані табл. 1 показують, що лінії, що характеризуються низьким відсотком анеуплоїдів, мають, тим не менш дуже низьку схожість, отже, вони можуть мати незбалансовані геноми. Встановити, які саме насінини не проростали, з нормальною кількістю хромосом чи анеуплоїди, не було можливим, адже кількість хромосом у насінин, які не проросли, встановити не вдалося. За схожістю насіння лінії із хромосомою 4S¹ не відрізнялася від ліній, де наявність цієї хромосоми не була нами визначена [13] ($t = 1,36$). За кількістю анеуплоїдів серед паростків між вказаними групами ліній відмінностей не виявилось також ($t = 1,28$). Це свідчить, що наявність чи відсутність гаметоцидної хромосоми у геномі може й не впливати на цитологічну стабільність лінії та здатність насіння до розвитку.

Результати оцінки фертильності гібридів F₁ від схрещування ліній *T. aestivum/Ae.sharonensis* представлені на рис. 1.

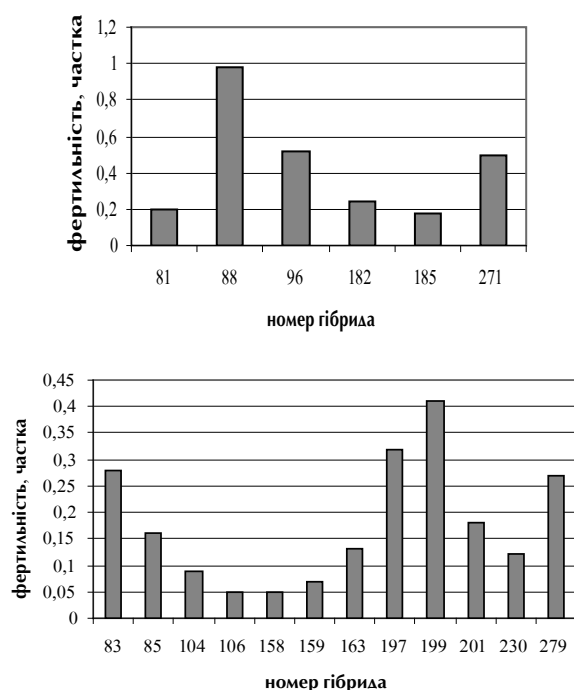


Рис. 1. Оцінка фертильності гібридів F₁. По осі абсцис вказано номери комбінацій схрещування, на осі ординат – оцінка фертильності, виражена як відношення фактичної кількості насінин до очікуваної. Батьківський компонент схрещування не містить (81–271) чи містить (83–279) гаметоцидну хромосому

Отримані дані оцінки фертильності перевірили щодо нормальності розподілу варіантів. Значення критерію χ^2 ($p < 0,001$) свідчить, що розподіл не є нормальним. Перевірка асиметрії по-

казала, що асиметрія виражена і значення коефіцієнта асиметрії ($As = 2,19 \pm 0,12$) є статистично достовірним. Отже, для всіх подальших порівнянь було використано непараметричні статистичні критерії.

Для перевірки припущення про залежність фертильності рослин від компонентів схрещування було виконано дисперсійний аналіз непараметричних ознак. Перевіряли три припущення: 1. Фертильність рослин залежить від присутності або відсутності у одного з батьків гаметоцидної хромосоми 4S¹. 2. Фертильність рослин залежить від походження гібридів F₁, які слугували материнським компонентом схрещування у досліджуваних комбінаціях (насіння F₂). У їх походженні брав участь або сорт м'якої пшениці, або інтрогресивна лінія. 3. Чи залежить фертильність від того, який саме сорт або яка саме лінія брали участь в утворенні гібридів F₁.

Для перевірки кожного з припущень було виконано однофакторний дисперсійний аналіз Крускала-Уоллеса для непараметричних ознак (табл. 2). Розбіжностей за фертильністю між групами гібридів, які містили чи не містили хромосому 4S¹ (перший рядок табл. 2) виявлено не було. Низьку фертильність гібридних рослин, як F₁, так і F₂, що несуть хромосому 4S¹, легко пояснити загибеллю частини гамет, що не мають цієї хромосоми. Гібриди другої групи не отримали гаметоцидної хромосоми від батьківського компонента схрещування (друга група гібридів). Проте лінії *T. aestivum/Ae.sharonensis*, які брали участь у їх утворенні, у своєму родоводі мали гібрид AABBD¹ з хромосомою 4S¹. Отже, наслідки аберантних подій, які відбувалися у геномі цього гібриду, проявляються і в наступних поколіннях, навіть у нащадків, які гаметоцидну хромосому не успадкували. Цей феномен можна означити загальним терміном «геномний стрес».

Таблиця 2. Результати дисперсійного аналізу Крускала-Уоллеса

Джерело мінливості	D	H	df	P
Наявність гаметоцидної хромосоми у батьківському компоненті схрещування	15158,5	3,35	1	>0,05
Родовід інтрогресивних ліній щодо виду егілопсу	108735,1	10,85	3	<0,05, >0,01
Природа материнського компонента схрещування	106484	37,71	4	<0,01

Перевірка третього припущення показала, що фертильність рослин F₂ не залежить від того, які саме інтрогресивні лінії чи сорти м'якої пшениці брали участь в утворенні гібриду F₁, який був материнським компонентом схрещування

для отримання гібридів, насіння F_2 від яких нами вивчалось (табл. 2, другий рядок).

Правильним виявилось друге припущення. Статистично значущою різницею фертильності ($p < 0,01$) характеризувались гібриди, материнський компонент яких походив від схрещування тільки інтрогресивних ліній (групи 3–5 на рис. 2) чи у родоводі були сорти м'якої пшениці (групи 6–7). Гібриди, до родоводу яких увійшли сорти м'якої пшениці, характеризувались більш низькою фертильністю. При порівнянні гібридів, які походили від схрещування виключно інтрогресивних ліній, без участі сортів м'якої пшениці (групи 8–11), розбіжності між групами виявились також статистично значущими, хоча й на більш низькому рівні. Проте різниця між груповими середніми рангами у цьому варіанті дисперсійного комплексу виявилась максимальною. Найвищою фертильністю характеризується група ліній 8, у походженні якої брали участь інтрогресивні лінії *T. aestivum*/*Ae. sharonensis*, найнижчою – група ліній 6, в походженні якої обов'язково брали участь лінії *T. aestivum*/*Ae. umbellulata*. Абсолютні, не рангові, значення фертильності (Me (медіана) = 0,15 для комплексу у цілому, $Me = 0,095$ для групи 6 та $Me = 0,20$ для групи 8 вказують на дуже низький відсоток зав'язування насіння, хоча не було жодної комбінації схрещування, від гібридів F_1 якої нам не вдалося б отримати хоча б кілька насінин.

Отже, дослідження показало, що фертильність гібридних рослин, отриманих від схрещування з інтрогресивними лініями *T. aestivum*/*Ae. sharonensis*, не корелює з присутністю чи відсутністю гаметоцидної хромосоми, так само, як і цитологічна стабільність та здатність до розвитку насінин самих інтрогресивних ліній.

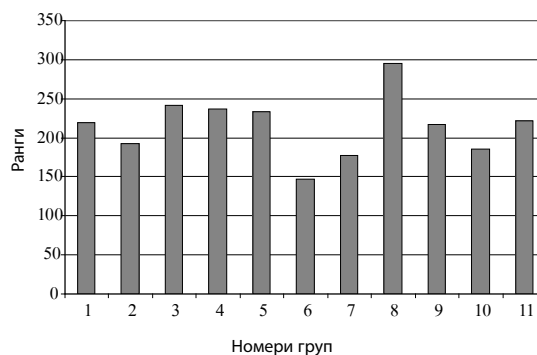


Рис. 2. Середні ранги за фертильністю гібридів різного походження; 1 – $4S^1$ у геномі присутня, 2 – $4S^1$ у геномі відсутня, 3–5 – гібриди F_1 материнського компонента схрещування були утворені за участю тільки інтрогресивних ліній, 6–7 – гібриди F_1 материнського компонента схрещування були утворені за участю сортів м'якої пшениці, 8–11 – в утворенні гібридів F_1 брали участь інтрогресивні лінії різного походження

Висновки

Інтрогресивні лінії м'якої пшениці *T. aestivum*/*Ae. sharonensis* та їх гібриди з інтрогресивними лініями іншого походження та сортами м'якої пшениці характеризуються цитологічною нестабільністю. Кількість хромосом коливається в межах 39–45, спостерігається наявність дицентриків, телоцентриків, демінутивних хромосом, зайвих хромосом із супутниками. Наслідком цитологічної нестабільності є знижена схожість насіння ліній. Фертильність гібридів F_2 від схрещування ліній *T. aestivum*/*Ae. sharonensis* з гаметоцидною хромосомою $4S^1$ та без неї коливається від 0,05 до 0,98 зерен на квітку, що дає змогу застосовувати лінії з гаметоцидною хромосомою як індуктори хромосомних перебудов у геномі інтрогресивних ліній м'якої пшениці.

1. Feuillet C. Cereal breeding takes a walk on the wild side / C. Feuillet, P. Langridge, R. Waugh // Trends in Genetics. – 2007. – Vol. 24, – N 1. – P. 24–32.
2. Endo T. R. Gametocidal chromosomes and their induction of chromosome mutations in wheat / T. R. Endo // Jpn. J. Genetics. – 1990. – N 65. – P. 135–152.
3. Endo T. R. Structural changes of rye chromosome 1R induced by gametocidal chromosome / T. R. Endo, M. Yamamoto, Y. Mukai // Jpn. J. Genetics. – 1994. – N 69. – P. 13–19.
4. Nasuda S. Gametocidal genes induce chromosome breakage in the interphase prior to the first mitotic cell division of the male gametophyte in wheat / S. Nasuda, B. Friebe, B. S. Gill // Genetics. – 1998. – V. 149. – P. 1115–1124.
5. Tsuimoto H. Molecular structure of a wheat chromosome end healed after gametocidal gene-induced breakage / H. Tsuimoto, T. Yamada, T. Sasakuma // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1997 – Vol. 94 – P. 3140–3144.
6. Endo T. R. Dissection of rye B chromosomes, and nondisjunction properties of the dissected segments in a common wheat background / T. R. Endo, Sh. Nasuda, N. Jones, Q. Dou, A. Akahori et al. // Genes & Genetic Systems. – 2008. – Vol. 83, N 1. – P. 23–30.
7. Endo T. R. The gametocidal chromosome as a tool for chromosome manipulation in wheat / T. R. Endo // Chromosome Research. – 2007. – N 15. – P. 67–75.
8. Chen Q. Structural changes of 2V chromosome of *Haynaldia villosa* induced by gametocidal chromosome 3C of *Aegilops triuncialis* / Q. Chen, A. Cao, Z. Qi, W. Zhang, P. Chen // Agricultural Sciences in China. – 2008. – V. 7, N 7. – P. 804–811.
9. Waning J. A modified method of counting chromosomes in root tip cells of wheat / J. Waning // Euphytica. – 1965. – 14, N 3. – P. 249–250.
10. Glantz S. A. Primer of Biostatistics. 5th Edition / S. A. Glantz. – New-York, McGraw-Hill. – 2002. – 437 p.
11. Жиров Е. Г. Передача пшенице *Triticum aestivum* L. хромосоми *Aegilops sharonensis* Eig., придающей ей устойчивость к мучнистой росе / Е. Г. Жиров, Т.К. Терновская // Генетика. – 1993. – Т. 29, N 4. – С. 639–645.
12. De Las Heras J. I. 5-azacytidine induces chromosomal breakage in the root tips of wheat carrying the cuckoo chromosome 4SL from *Aegilops sharonensis* / J. I. De Las Heras, I. P. King, J. S. Parker // Heredity. – 2001. – Vol. 87, N 4. – P. 474–479.
13. Antonyuk M. Z. Genome structure of introgressive lines *Triticum aestivum*/*Aegilops sharonensis* / M. Z. Antonyuk, M. V. Bodylyova, T. K. Ternovskaya // Cytology and Genetics. – 2009. – In press.

O. S. Mankovska, T. K. Ternovska, M. Z. Antonyuk

CYTOLOGICAL STABILITY AND VIABILITY OF INTROGRESSIVE LINES WITH GAMETOCIDAL CHROMOSOME 4S^L AND THEIR HYBRIDS

Summary. Common wheat introgressive lines T. aestivum/Ae. sharonensis with and without gametocidal chromosome 4S^L were studied as to their cytological stability, seed germination, and fertility of the F₁ hybrids from crossing of these lines with the introgressive цmyi of another pedigree and the common wheat varieties. Byizwey some cytological instability of the lines and their hybrids and reduced seed germination of most lines they were revealed suitable for use in crossing with another introgressive lines and common wheat varieties as inductor of chromosome rearrangement due to formation of euploid plants of certain fertility level.

УДК 618.2/3:611–018.54:618.29:612.014.24

Бадюк В. М., Білько Н. М., Баріляк І. Р.

ІМУНОРЕАКТИВНІСТЬ СИРОВАТКИ КРОВІ ВАГІТНИХ З ХРОМОСОМНОЮ ПАТОЛОГІЄЮ ПЛОДА

У статті представлені дані оригінального дослідження, що стосується вивчення імунореактивності (ембріотропних антитіл) сироватки крові вагітних із встановленою хромосомною патологією (ХП) плода. У вагітних з ХП плода не відмічено жодного випадку нормальної реактивності сироватки крові. У групі дослідження визначено зміну реактивності сироватки в бік збільшення продукції антитіл (АТ) проти колагену, білків S100 та MP65, що може розглядатись як потенційний маркер ХП плода для скринінгу вагітних.

Вступ

Плацента є анатомічним та імунним бар'єром між організмами матері та ембріона. Нині накопичено дані про участь гуморальних та клітинних механізмів у регуляції розвитку ембріона та плода [1]. Вдалося ідентифікувати деякі регуляторні антитіла (АТ) класу IgG, що синтезуються в материнському організмі, рівень яких виявляється критично важливим для нормального розвитку ембріона і плода людини. До таких «ембріотропних регуляторів» відносять, наприклад, АТ до основного білка мієліну, білків S100, АСВР14/18 (еволюційно консервативний білок, що належить до групи негістонових аніонних білків хроматину, міцно зв'язаних з ядерною ДНК) та MP65 (еволюційно консервативний мембранний білок, що бере участь у процесах міжклітинної адгезії; представник надродини імуноглобулінів). Було встановлено, що концентрація цих АТ у нормальних умовах (у здорових

жінок репродуктивного віку) підтримується у вузьких фізіологічних межах (в діапазоні 150–250 нг/мл у сироватці периферійної крові). У той же час у жінок, які мали проблеми з несприятливими закінченнями вагітностей, концентрація ембріотропних (ембріотоксичних) АТ виходить за експериментально встановлені межі фізіологічної норми [5].

Природні регуляторні антитіла синтезуються в організмі кожної здорової людини і беруть участь в регуляції активності клітин різних типів. Продукція таких антитіл у нормі підтримується у вузькому діапазоні. Вміст деяких відомих антитіл (IgG) можливо визначити за допомогою імуноферментних досліджень [8].

Для виявлення специфічних імунних змін, що можуть впливати на діяльність клітин різних типів, які визначають функціональну активність органів та тканин, з 1996 року в медичній практиці почали застосовувати методи групи ЕЛІ-тест (ELISA-detected probability of pathology) [7].