

МЕХАНІЗМИ ВЗАЄМОДІЇ ТА ЕКСПРЕСІЇ ГЕНЕТИЧНИХ СИСТЕМ

ДУБОВЕЦ Н.И., БОНДАРЕВИЧ Е.Б., СОЛОВЕЙ Л.А., ШТЫК Т.И.,
СЫЧЕВА Е.А.

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,

Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: N.Dubovets@jgc.bas-net.by

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ИНТРОГРЕССИИ ХРОМОСОМ D-ГЕНОМА ПШЕНИЦЫ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ КОЛОСА РЕКОМБИНАНТНЫХ ФОРМ ГЕКСАПЛОИДНЫХ ТРИТИКАЛЕ

Ранее нами были получены данные, свидетельствующие о перспективности синтеза гексаплоидных тритикале с множественными D(A)- и D(B)-замещениями хромосом [1, 2]. Было показано, что формы, содержащие 3–4 межгеномных замещения, характеризуются высокой цитологической стабильностью и, как следствие этого, сохраняют в своем кариотипе интродуцированные хромосомы D-генама в ряду последующих поколений, имеют более высокое содержание белка и улучшенное качество клейковины. В то же время по основным показателям продуктивности формы с реконструированным кариотипом (вне зависимости от количества пар замещенных хромосом), как правило, уступали “чистым” гексаплоидным тритикале. В связи с этим на линейном материале были начаты работы по исследованию эффектов различных типов модификаций ядерного генома тритикале на экспрессию признаков продуктивности.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили линии гексаплоидных тритикале с D(A)- и D(B)-замещениями хромосом, выделенные из гибридного материала от скрещивания различных форм 8х- х 4х-тритикале (таблица).

Комбинация скрещивания	Линия	Типы межгеномных замещений хромосом
25АД20 х ПРАТ21	М I(1)-1	1D(1A), 2D(2B), 6D(6B)
	М I(1)-2	1D(1A), 2D(2B)
	М II(3)-1	1D(1A), 2D(2B), 3D(3A), 6D(6B)
	М II(3)-2	1D(1A), 2D(2B), 3D(3A) и 6D(6A)
	MY(5)-1	1D(1A), 2D(2B) (T5RS.5AL)
	MY(5)-2	1D(1A), 2D(2B)
ПРАО1 х ПРАТ72	4(2)-1	1D(1A), 2D(2A), 4D(4B), 7D(7A)
	4(2)-2	2D(2A), 4D(4B), 7D(7A)
ПРАД20 х ПРАТ72	8	1R(1A), 3D(3B), 4D(4B)

Гибридный материал был маркирован с использованием молекулярно-цитогенетических маркеров (С-бэндов) [3].

Результаты и обсуждение

Для оценки возможных эффектов интрогрессии в кариотип тритикале пары хромосом 6D было проведено сравнительное исследование линий MI(1)-1 и MI(1)-2, первая из которых содержала 1D(1A), 2D(2B) и 6D(6B), а вторая — 1D(1A) и 2D(2B)-замещения хромосом.

По морфологическим признакам колоса линии отличаются друг от друга незначительно (рисунок 1). Можно лишь отметить, что у линии MI(1)-1 в меньшей степени выражена остистость и наблюдается более выраженное сужение колоса к вершине, что присуще колосьям веретеновидной формы. Кроме того, линия MI(1)-1 характеризуется более плотным колосом: среднее значение этого показателя у нее равно 2,43 против 2,17 у линии MI(1)-2. Различия по длине колоса между линиями недостоверны.

Достоверные различия между линиями наблюдались по таким показателям продуктивности колоса, как число колосков в колосе (при $P < 0,001$), число цветков в колосе ($P < 0,05$) и количество зерен в колосе ($P < 0,01$). Среднее значение первого показателя выше у линии с тремя замещениями ($27,17 \pm 0,33$ против $23,56 \pm 0,23$), а второго и третьего — у линии с двумя замещениями ($78,03 \pm 1,87$ и $72,83 \pm 1,18$; $46,13 \pm 1,55$ и $41,1 \pm 1,06$). Линия MI(1)-2 характеризуется также лучшей озерненностью колоса (59,12 против 56,4) и лучшей массой 1000 зерен (47,4 против 43,1).

На основании полученных данных можно сделать вывод, что присутствие в кариотипе гексаплоидных тритикале 6D(6B)-замещения хромосом в определенной степени оказывает негативное влияние на экспрессию ряда признаков продуктивности растений. Отмеченный негативный эффект может быть вызван как интрогрессией пары хромосом 6D, так и удалением из кариотипа растений пары хромосом 6B. Для выяснения вопроса, какое из этих двух событий наиболее значимо, было проведено сравнительное исследование линий MII(3)-1 и MII(3)-2, содержащих три идентичных замещения



Рис. 1. Зрелые колосья линий
а) MI(1)-1; б) MI(1)-2



Рис. 2. Зрелые колосья линий
а) MII(3)-1; б) MII(3)-2



Рис. 3. Зрелые колосья линий
а) №4(2)-1; б) №8; в) MIII(2)

[1D(1A), 2D(2B), 3D(3A)] и различающихся по четвертому — у первой линии хромосома 6D заменила 6B, а у второй — 6A.

Различия между этими линиями (в отличие от двух предыдущих) проявлялись уже на уровне морфологических признаков колоса. Колосья первой линии имели красную окраску и цилиндрическую форму, в то время как колосья второй линии были белыми веретеновидной формы (рисунок 2). При практически одинаковой плотности колоса (2,16 и 2,12) высоко достоверные различия (при $P < 0,001$) наблюдались по длине колоса: у линии МП(3)-1 среднее значение этого признака составило $10,32 \pm 0,16$, а у линии МП(3)-2 — $11,25 \pm 0,12$. При таком же уровне значимости достоверные различия отмечены по остальным признакам продуктивности колоса (число колосков в колосе, число цветков в колосе, количество зерен в колосе, озерненность колоса). При этом линия с 6D(6A)-замещением хромосом по всем этим показателям превосходила линию с 6D(6B)-замещением. Единственное исключение составил признак “масса 1000 зерен”, который у первой линии был равен 47,0 г, а у второй — 37,4 г. Изложенное свидетельствует о том, что снижение продуктивности растений линии МП(1)-1 не связано с наличием дополнительной пары хромосом 6D, а является следствием отсутствия в их кариотипе пары хромосом 6B. Исходя из этого можно сделать вывод о том, что интрогрессию в кариотип гексаплоидных тритикале хромосомы 6D предпочтительнее осуществлять в виде 6D(6A)-замещения.

Определенный интерес для нас представляло также исследование эффектов присутствия в кариотипе 6х-тритикале хромосомы 4D. Известно, что хромосомы четвертой гомеологической группы пшеницы содержат гены, ответственные за высоту растений: на хромосоме 4A расположен ген *Rht 1*, на хромосоме 4D — *Rht 2*. Рecessивные аллели этих генов наиболее широко используются в селекции на короткостебельность. При этом показано, что объединение их в одном генотипе приводит к суммированию положительного эффекта. Отмечается также, что при таком объединении наибольший вклад в сокращение высоты растений и одновременное удлинение колоса вносит локализованный на хромосоме 4D ген *Rht 2* [4].

В нашем материале у трех линий (4(2)-1, 4(2)-2 и 8) хромосома 4D замещает 4B. Эффекты такого замещения могут быть как положительными, так и отрицательными, в зависимости от аллельных вариантов присутствующих в линиях генов *Rht*.

Проведенное исследование показало, что у всех трех вышеперечисленных линий наблюдается существенное увеличение длины колоса растений, что особенно характерно для линий 4(2)-1 и 4(2)-2, имевших среднее значение этого признака на 4–5 см выше, чем у линий из комбинации скрещивания 25АД20 х ПРАТ 21. В то же время обе линии характеризовались низким значением показателя “плотность колоса” (1,78 и 1,85), что, безусловно, отразилось на проявлении таких признаков, как количество зерен в колосе и масса зерна с колоса. Последняя у обеих линий едва превысила 1 г. Посред-

ственным оказалось также значение такого важного в селекционном плане показателя, как масса 1000 зерен — 30,6 и 31,2.

У линии 8 значение признака “длина колоса” было в среднем на 1,5–3 см больше, чем у линий из комбинации скрещивания 25АД20 х ПРАТ 21, но на 2–3 см ниже, чем у 4(2)-1 и 4(2)-2 (рисунок 3). Несмотря на некоторое увеличение плотности колоса, линия характеризовалась более низкими (по сравнению с линиями 4(2)-1 и 4(2)-2) значениями таких показателей, как число колосков в колосе ($25,83 \pm 0,40$ против $27,53 \pm 0,26$ и $27,33 \pm 0,24$), число цветков в колосе ($80,23 \pm 1,58$ против $87,40 \pm 1,43$ и $84,50 \pm 1,51$), количество зерен в колосе ($28,97 \pm 2,22$ против $35,73 \pm 2,58$ и $35,80 \pm 2,69$). Масса зерна с колоса в среднем составила 0,83 г, а масса 1000 зерен — 28,8 г. Столь низкие показатели продуктивности этой линии, скорее всего, связаны с наличием четырех доз хромосомы 1R.

Полученные данные свидетельствуют о том, что интрогрессия в кариотип 6х-тритикале хромосомы 4D приводит к существенному увеличению длины колоса, однако, положительной корреляции между этим признаком и продуктивностью колоса в нашем материале не отмечено. К тому же у исследованных форм наблюдается увеличение высоты растений, вследствие чего они склонны к полеганию. Отмеченные эффекты можно объяснить тем, что использованные в скрещиваниях отцовские формы октоплоидных тритикале (доноры хромосом D генома) содержат доминантный аллель гена *Rht 2*.

Исходя из того, что у тритикале структурные перестройки между хромосомами пшеницы и ржи являются довольно редким событием, определенный интерес представляло сравнительное исследование линий MY(5)-1 и MY(5)-2, содержащих 1D(1A)- и 2D(2B)-замещения и различающихся по наличию у первой линии пары aberrантных T5RS.5AL хромосом. Обнаруженная в гибридном материале aberrантная хромосома образовалась в результате центрического слияния двух телосом — 5RS и 5AL, которые, в свою очередь, возникли вследствие misdivision унивалентных хромосом в анафазе мейоза. В итоге мы имеем линию, тетрасомную по короткому плечу хромосомы 5R и нуллисомную по короткому плечу хромосомы 5A. Произошедшие структурные преобразования хромосом не отразились на экспрессии морфологических признаков растений, но оказали определенное негативное влияние на их продуктивность. Линия MY(5)-2 имела достоверно более высокие (при $P < 0,01$) показатели длины колоса ($9,48 \pm 0,25$ против $8,5 \pm 0,2$), числа колосков в колосе ($22,2 \pm 0,37$ против $20,5 \pm 0,37$), числа цветков в колосе ($61,03 \pm 1,67$ против $54,2 \pm 1,41$) и количества зерен в колосе ($44,07 \pm 1,83$ против $37,53 \pm 0,94$). Единственным исключением, как и в случае с двумя предыдущими линиями, явилась масса 1000 зерен — у линии с aberrантной хромосомой она оказалась выше (50,9 г против 47,6 г), что, скорее всего, связано с более низкой озерненностью колоса. Следует, однако, отметить тот факт, что по ряду признаков продуктивности линия MY(5)-1 ничуть не уступала и даже превосхо-

дила некоторые замещенные линии из комбинации скрещивания 25АД20 х ПРАТ 21.

Выводы

Представленные выше результаты исследований с одной стороны наглядно демонстрируют возможность использования созданного нами линейного материала для изучения эффектов интрогрессии хромосом D-генома пшеницы в кариотип 6х-тритикале, а с другой стороны свидетельствуют о том, что межгеномные замещения могут иметь значимый эффект на проявление не только качественных, но и полигенно наследуемых количественных признаков. Полученную информацию следует учитывать в работах по интрогрессивной гибридизации при разработке стратегии реконструкции кариотипа тритикале с целью улучшения ряда хозяйственно-полезных признаков культуры.

Литература

1. Дубовец Н.И., Дымкова Г.В., Сычева Е.А., Соловей Л.А., Штык Т.И. О перспективности синтеза гексаплоидных тритикале с множественными межгеномными замещениями хромосом пшеницы // “Проблемы производства продукции растениеводства и пути их решения”. Материалы международной научно-практ. юбилейной конфер., посвящ. 160-ти летию БСХА. Горки. 7–9 июня 2000.— С. 212–216.

2. Dubovets N.I., Dymkova G.V., Solovej L.A., Shtyk T.I., Bormotov V.E. A study on spring hexaploid triticales with mixed wheat component of karyotype // Proc. 5th International Triticale Symposium, Poland.— 2002.— P. 303–310.

3. Бадаев Н.С., Бадаева Е.Д., Большева Н.Л., Зеленин А.В. Идентификация хромосом А и D геномов пшеницы с использованием замещений и перестроек между гомеологами у пшеницы и тритикале // Докл. Акад. Наук СССР. 1983.— Т.273, №4.— С. 994–996.

4. Worland, T., J.W. Snape. Genetic basis of worldwide wheat varietal improvement // The world wheat book: A history of wheat breeding, Lavoisier Publishing, Paris.— 2001.— P. 59–100.

Резюме

Проведен сравнительный анализ основных элементов продуктивности колоса у линий тритикале с разными типами межгеномных замещений хромосом. Показано, что в работах по реконструкции ядерного генома растений методами хромосомной инженерии следует уделять внимание не только эффектам интродуцированных хромосом, но и учитывать последствия удаления из кариотипа соответствующих гомеологов.

A comparative analysis of basic spike productivity elements was made in triticales lines with various types of intergenomic chromosome substitutions. It was shown that in research works on reconstruction of plant nuclear genome by chromosome engineering methods, attention should be paid to not only effects of introduced chromosome but also to consequences of removing appropriate homeologs from the karyotype.

ДЬЯЧЕНКО Л.Ф.¹, ТОПТИКОВ В.А.¹, ТОЦКИЙ В.Н.¹, СИЧКАРЬ В.И.²,

¹Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова

Украина, 65058, Одесса, Шампанский пер., 2, e-mail: diachenkolff@mail.ru

²Селекционно-генетический институт НААНУ,

Украина, 65036, Одесса, Овидиопольская дор., 3

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ СПЕКТРОВ ЭСТЕРАЗЫ ЛИСТЬЕВ В ОНТОГЕНЕЗЕ СОИ

Соя — одно из самых важных сельскохозяйственных растений благодаря высокому содержанию в ней белка, жира и ее способности фиксировать атмосферный азот [1]. В перспективе она может стать одной из главных культур в Украине [2]. Жизненный цикл сои состоит из нескольких этапов, которые регулируются как внешними факторами (питание, длина дня, интенсивность и качество света, температура), так и внутренними составляющими, которые находятся под контролем растительных гормонов [3]. На каждом этапе онтогенеза создается база для успешного прохождения последующего этапа роста и развития, при этом компенсировать недостатки предыдущего этапа практически невозможно [4]. Все эти процессы обеспечиваются дифференциальной экспрессией генетических систем. Ранее было показано динамичное изменение экспрессивности значительной части изоформ пероксидазы в онтогенезе сои [5]. Целью данной работы явилось изучение онтогенетических особенностей экспрессивности разных изоформ эстеразы.

Материалы и методы

Материалом служили 20 сортов сои, из которых 9 условно обозначили как “скороспелые” (Устя, Медея, Юг-30, Диона, Л-2 (Орел), Валентиа, Блискавица, Аннушка, Спринт — период вегетации 85–95 дней), а 11 — “раннеспелые” (Аметист, Елена, Марьяна, Селекта, Киевская 98, Припять, Рось, Романтика, Степовичка, Ксения, Георгина) — продолжительность вегетации 95–110 дней.

Листья для экстракции эстеразы отбирали на трех стадиях развития растений: I — появление первого тройчатого листа, II — начало цветения, III — начало созревания бобов. Для исключения влияния фактора старения листа для анализа фермента отбирали самый последний развернутый лист. Экстрагирование, разделение в полиакриламидном геле и визуализацию эстеразы проводили по ранее описанным методикам [6–7]. Анализ электрофореграмм проводили по компьютерной программе АнаИС, с помощью которой для каждой изоформы определяли удельный вес, площадь и интенсивность окрашивания (в условных единицах — пикселях) соответствующих полос. Статистическую обработку данных проводили в Excel. Оценку внутреннего разнообразия спектров проводили по формуле [8]:

$$K_D = \log_2 N / \sum p_i^2,$$

где K_D — показатель разнообразия спектра, N — количество фракций в спектре, p_i — удельный вес в спектре каждой фракции, выраженный в долях.