

ЕВОЛЮЦІЯ ГЕНОМІВ У ПРИРОДІ ТА ЕКСПЕРИМЕНТІ

УДК 631.523:581.13

ЄФІМЕНКО Т.С.¹, ФЕДАК Ю.², АНТОНЮК М.З.¹, ТЕРНОВСЬКА Т.К.¹

¹ Національний університет «Києво-Могилянська Академія» МОН України,

Україна, 04070, м. Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: centaureinae@gmail.com

² Канадський інститут сільського господарства і продовольства. Східний центр дослідження злакових і олійних культур

ПОРІВНЯННЯ ХРОМОСОМ 5-Ї ГОМЕОЛОГІЧНОЇ ГРУПИ АВРОРИ ТА АВРОТИКИ З ВИКОРИСТАННЯМ СПЕЦИФІЧНИХ МІКРОСАТЕЛІТІВ

Диплоїдний вид *Aegilops mutica* (Т). – один із небагатьох, що досі майже не вніс свого вкладу до генетичного пулу пшениць, що культивуються. На сьогодні створено лише чужинно-додану та телосомно-додані лінії за участю його В-хромосоми [1]. Та всі його 7 пар А-хромосом увійшли до складу геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротика (ААВВТТ) на додаток до тетраплоїдного компоненту АВ сорту м'якої пшениці Аврора [2]. 20-річне спостереження за цим гексаплоїдом свідчить, що він був та залишається стійким до польових популяцій збудників борошнистої роси, всіх трьох видів іржи, септоріозу, фузаріозу та характеризується високою зимо-морозостійкістю. Нами розпочато роботу зі створення інтрогресивних ліній м'якої пшениці, які б включали різні обсяги хроматину цього егілопсу до геному Аврори, і отримано 237 нащадків F₂ від схрещування Авротика х Аврора, кількість хромосом в яких коливається в межах 41–43 та які стануть цитологічно стабільними лініями протягом одного-двох самозапилень [3]. Лінії варто вивчати щодо згаданих ознак стійкості до руйнівних чинників довкілля, в тому числі дії низьких температур. Відомо, що у м'якій пшениці здатність переносити вплив цього фактору пов'язують з хромосомами 5-ої гомологічної групи [4, 5]. Метою нашої роботи було вивчити хромосоми цієї групи Аврори (ААВВDD) та Авротика щодо можливості використання мікросателітних локусів, специфічних до хромосом 5А, 5В, 5D, для ідентифікації чужинних включень з геному Т.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал: сорт Аврора, амфідиплоїд Авротика. ДНК виділяли з листків дорослих рослин за методикою з буфером на основі СТАВ. Праймери добирали за літературними даними [6–8]. Було перевірено пар праймерів: для плеча 5AS – 18, 5AL – 44,

5BS – 8, 5BL – 20, 5DS – 6, 5DL – 16. ПЛІР проводили: 30 мкл реакційної суміші містила 250 нМ кожного праймера, 50 нг ДНК, по 0,2 мМ кожного дезокситрифосфату, 1,5 мМ MgCl₂, 1,2 у Taq-полімерази (Fermentas, Литва), умови проходження ампліфікації – у відповідності до рекомендацій оригіатора певного SSR-локусу.

Результати та обговорення

Продукти ампліфікації було отримано з ДНК Аврори та Авротика з кожною зі 112 перевірених пар праймерів. Виходячи із специфічності перевірених SSR-локусів до кожної з хромосом 5-ї гомологічної групи пшениці [6–8] та з геномного складу Авротика, який випливає з її походження (рис. 1) ми очікували такі результати. Спектри ампліфікації з праймерами, специфічними для хромосом 5А та 5В, не повинні розрізнятися для Аврори і Авротика, оскільки ці геноми у зазначених генотипах мають бути однаковими (рис. 2, *Xwmc524-5A*). З праймерами, специфічними для хромосоми 5D, суворо кажучи, продуктів з ДНК Авротика утворюватися не повинно, оскільки замість генома D вона має геном Т (рис. 2, *Xcfd189-5D*). Це було правильно для 46 локусів хромосоми 5А з 62 перевірених, 22 локусів хромосоми 5В з 28 перевірених та 2 локусів з 33 хромосоми 5D (рис. 3). Останнє відхилення від очікуваного найбільш виразне, проте легко пояснюється. По-перше, хромосоми D та Т геномів кон'югують майже регулярно [9, 10]. Отже рівень гомології в них достатній, щоб пояснити, що мікросателітні локуси, ідентифіковані як специфічні до геному D, виявились специфічними до геному Т також. Гомологія між вказаними геномами підтверджується і в нашій роботі: гібриди F₂ були самофертильними, чого ніколи не спостерігалось для гібридів від схрещування інших геномно-заміщених амфідиплоїдів, в яких хромосоми третього субгеному не кон'югували [2, 3].

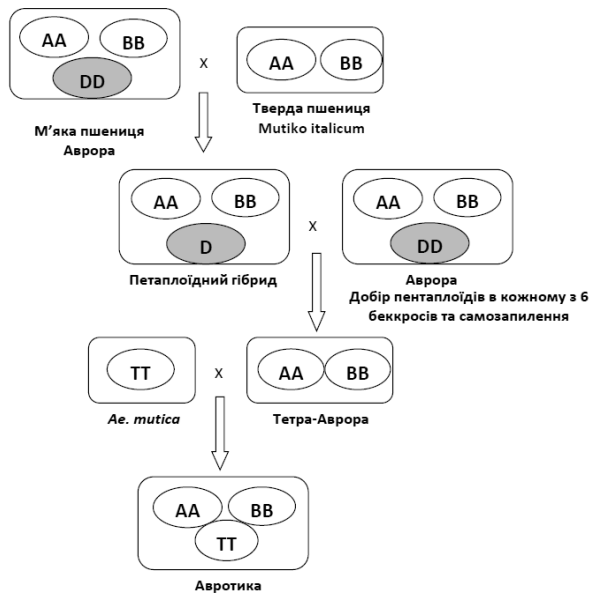


Рис. 1. Схема створення геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротика та його очікуваний геномний склад

По-друге, існує добре задокументоване явище перенесення специфічності мікросателітних локусів між хромосомами в межах однієї і тієї самої гомеологічної групи у *Triticinae*. Так, у нашому дослідженні 10 праймерів із 112 специфічні до двох хромосом із трьох, що вивчаються, а 3 пари – для всіх трьох (рис. 3). Спільна специфічність локусів для кількох хромосом 5-ї групи робить легітимним однаковий спектр ампліконів Аврори та Авротика для локусів *Xcfa2104-5A/5D*, та *Xbarc232-5A/5B/5D*. Однаковий спектр, що дають праймери локусів *Xwmc233*, *Xcfd18*, *Xcfd8*, *Xgprw5098*, *Xgwm292*, *Xcfd29*, *Xcfd183*, *Xwmc765*, *Xwmc443*, *Xgwm654*, дає підстави вважати, що вказані локуси є специфічними не

лише для D-генома, а і для T-генома також. Отже 12 перелічених SSR-локусів з 22, локалізованих на хромосомі 5D, матимуть обмежене значення для ідентифікації інтрогресій D/T, оскільки кожен з них позбавлений власного діагностичного значення. Таким значенням характеризуються 8 локусів: *Xcfd189*, *Xcfd102*, *Xgwm190*, *Xgwm272*, *Xgwm182*, *Xgdm68(A,B)*, *Xgwm293(A,B)*, *Xwmc289(B)*, оскільки на отриманих з відповідними праймерами спектрах Авротика характеризується специфічним ампліконом. Те, що три з них дають продукт з геномами А та В, не має значення, оскільки за цими геномами Аврора та Авротика збігаються, а специфічність характеризується спектр саме Авротика (рис. 3). Ті два локуси, *Xcfd57* та *Xcfa2141(A)*, що не дають амплікона з ДНК Авротика, дозволять припустити відсутність (або перебудову) відповідної ділянки хромосом 5D Але для хроматину T-хромосоми ці локуси не інформативні, оскільки не засвідчують наявності ДНК цього геному.

Обговорюючи можливості використання хромосомно-специфічних мікросателітних локусів для вивчення структури геному інтрогресивних ліній Авротика/Аврора, які створюються, потрібно дати пояснення тому факту, що за 16 локусами генома А (26% від вивчених) та 6 локусами хромосоми В (21% вивчених) спостерігається різниця у спектрах ампліконів ДНК Аврори та Авротика, хоча бути її не повинно через те, що геноми А та В в цих генотипах однакові. Для трьох локусів, *Xgdm68 (A,D)*, *Xgwm293(A,D)* та *Xwmc289 (D)* пояснення дуже просте: вони специфічні не лише для 5В, а і для 5D-хромосоми. Відмінність спектрів Аврори і Авротика може виникати, якщо специфічність розповсюджується на хромосом 5Т.

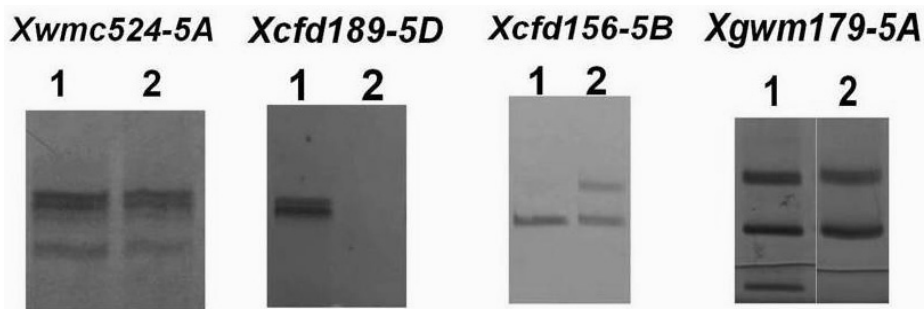
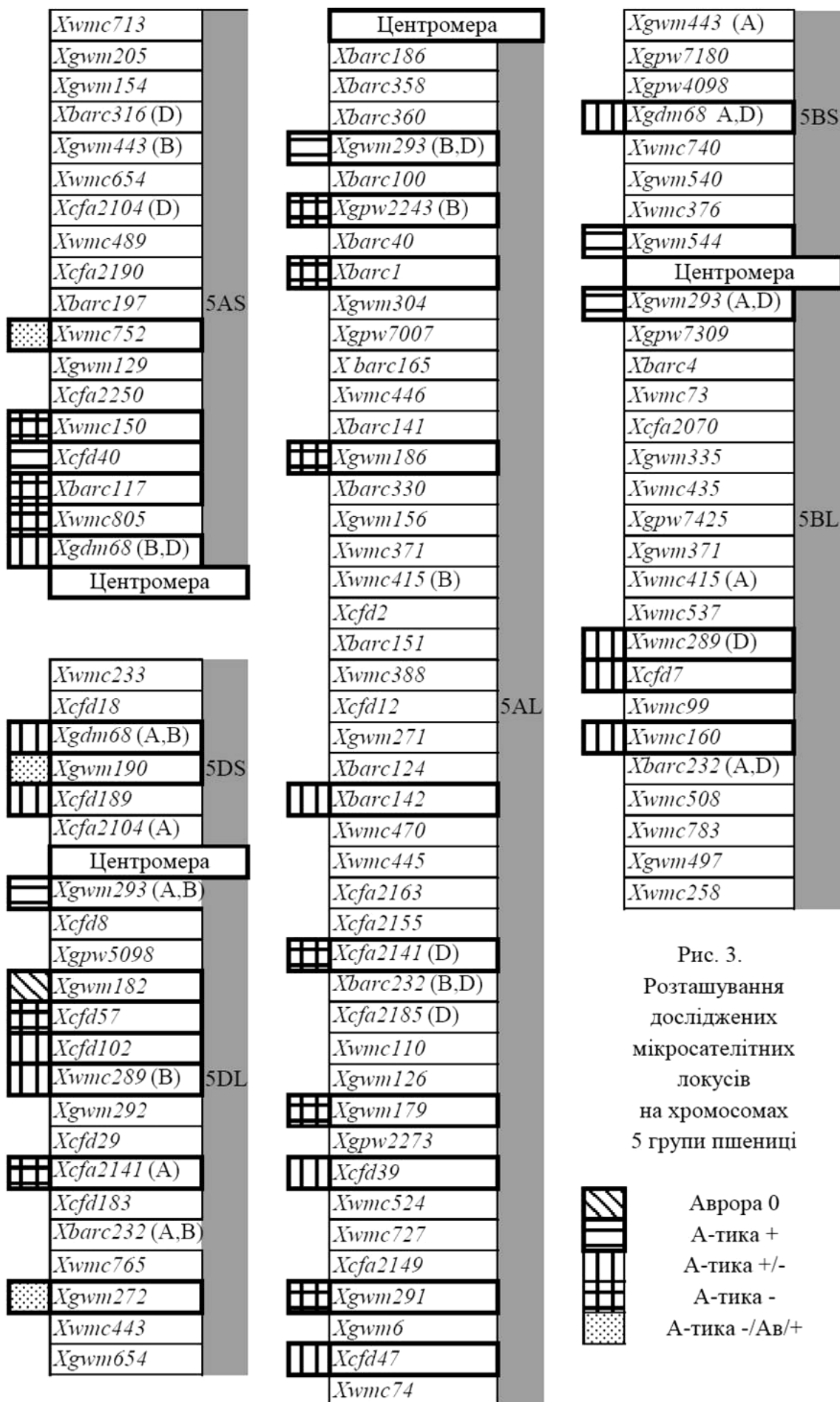


Рис. 2. Спектри ампліконів за SSR-локусами: 1 – Аврори, 2 – Авротика. За локусом *Xwmc524-5A* немає різниці у спектрах ампліконів; *Xcfd189-5D* – нуль-алель у Авротика; *Xcfd156-5B* – Авротика має зайвий амплікон; *Xgwm179-5A* – у Авротика не вистачає амплікона



І ці локуси вже наведені серед тих, які мають діагностичне значення для визначення хроматину хромосоми 5Т за результатами аналізу хромосоми D. Щодо локусів *Xgwm544*, *Xcfd7*, *Xwmc160*, розбіжності в ампліконах Аврори та Авротики можуть бути викликані будь-яким з двох чинників. По-перше, під час виділення тетракомпоненту AABV із геному AABVDD м'якої пшениці, яке відбувалося через схрещування сорту Аврора з твердою пшеницею та шестикратним беккросуванням з Авророю пентаплоїдних гібридів попереднього покоління, звичайно відбувалася рекомбінація між хромосомами А та В геномів м'якої і твердої пшениці. Через це ідентичність тетра-Аврори та Аврори за геномами АВ могла дещо втратитися. По-друге, і це більш просте пояснення, інформацію про перенесення специфічності мікросателітних локусів між хромосомами в межах однієї гомологічної групи було отримано не на Аврорі, а на інших генотипах [6–8]. Можливо, що в геномі Аврори вказані три локуси є специфічними не лише для хромосоми 5В, а і для хромосоми 5D, а також для хромосоми 5Т Авротики. Оскільки це припущення виключити не можна, вказані алелі варто залучати до аналізу при вивченні інтрогресивних ліній на наявність інтрогресій за хромосомами 5-ої групи.

Для хромосоми 5А три локуси з 16, за якими є розбіжності між картинами ампліфікації ДНК Аврори та Авротики, *Xgdm68(B,D)*, *Xgwm293(A,D)*, *Xcfa2141(D)*, специфічні також до хромосоми 5D, перші два вже згадувалися серед діагностично значущих алелів для хромосоми 5Т. Серед решти 13 для локусів *Xwmc752*, *Xwmc150*, *Xbarc117*, *Xwmc805-5A*, *Xgprw2243(B)*, *Xbarc1*, *Xgwm186*, *Xbarc142*, *Xgwm179*, *Xcfd39*, *Xgwm291*, *Xcfd47* здається правдоподібною друга причина виникнення відмінностей між ампліконами,

тому що у всіх випадках в ампліконі Авротики немає компоненту, властивого спектру Аврори. У спектрі Авротики з праймерами локусу *Xcfd40* є зайвий компонент. Можливо, локус специфічний до 5Т хромосоми та його можна залучати до аналізу ліній.

Висновки

Порівняльний мікросателітний аналіз генотипів м'якої пшениці (AABVDD) та отриманого через об'єднання її тетраплоїдного компонента AABV та геному ТТ *Ae. mutica* геномно-заміщеного амфідиплоїда із застосуванням праймерів мікросателітних локусів, картованих на хромосомах А, В та D геномів, підтвердив можливість використання вказаних SSR-локусів для ідентифікації у геномі амфідиплоїда хроматину 5-ої хромосоми іншого геному (Т). Із 112 вивчених локусів, специфічних для трьох хромосом 5-ої гомологічної групи, виявлено 13, які мають діагностичну цінність для ідентифікації хроматину хромосоми 5Т за умов наявності у геномі інших хромосом тієї самої гомологічної групи: *Xcfd189*, *Xcfd102*, *Xgwm190*, *Xgwm272*, *Xgwm182*, *Xgdm68(A,B)*, *Xgwm293(A,B)*, *Xwmc289(B)*, *Xgwm544*, *Xcfd7*, *Xwmc160*, *Xcfa2141(D)*, *Xcfd40*. Діагностична значущість полягає у наявності у спектрі ампліконів Авротики, що утворюються з праймерами вказаних локусів, компонентів, які ясно відрізняються за рухливістю від ампліконів, що утворюються з ДНК Аврори. Локуси *Xcfd57* та *Xcfa2141(A)* мають обмежене значення для вивчення інтрогресивних ліній Авротики/Аврора через відсутність амплікону, характерного для ДНК з хромосомою 5Т. Крім того, 12 SSR-локусів з 22, локалізованих на хромосомі 5D, матимуть обмежене значення для ідентифікації інтрогресій D/Т у сполученні з іншими хромосомно-специфічними молекулярно-генетичними маркерами.

Література

1. Badaeva E.D., Friebe, B., Gill, B.S. Genome differentiation in *Aegilops* L. Distribution of highly repetitive DNA sequences on chromosomes of diploid species // *Genome*. – 1996. – 39. – P. 293–306.
2. Жиров Е.Г. Геномы пшеницы: исследование и перестройка: Дис. ... докт. биол. наук: 03.00.15. – Краснодар. – 1989. – 366 с.
3. Єфіменко Т.С., Антонюк М.З., Мартиненко В.С. Створення чужинно-заміщених та чужинно-доданих ліній *Triticum aestivum* / *Aegilops mutica* // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. – Київ: Логос, 2013. – 12. – С. 114–118
4. Vagujfalvi A., Galiba G., Cattivelli L., Dubcovsky J. The cold-regulated transcriptional activator *Cbf3* is linked to the frost-tolerance locus *Fr-A2* on wheat chromosome 5A // *Molecular and General Genetics*. – 2003. – 269, N 1. – P. 60–67.
5. Toth B., Galiba G., Fehér E., Sutka J., Snape J.W. Mapping genes affecting flowering time and frost resistance on chromosome 5B of wheat // *Theor. Appl. Genet.* – 2003. – 107, N 3. – P. 509–514.

6. GrainGenes: A Database for *Triticeae* and *Avena* [Электронный ресурс]. – <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>
7. KOMUGI: Wheat Genetic Resources Database. Composite Wheat Map [Электронный ресурс]. – <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/maps/markerMap.jsp;jsessionid=40E62A525FB63D69D63275DF645E308C.lb1?chromosome=5>
8. Somers D.J., Isaac P, Edwards K. "A high-density microsatellite consensus map for bread wheat" // *Theor Appl Genet.* – 2004. – 109. – P. 1105–1114.
9. Jones J.K., Majisu B.N. The homoeology of *Aegilops mutica* chromosomes. // *Canadian Journal of Genetics and Cytology.* – 1968. – 10, N 3. – P. 620–626.
10. Ohta S. Phylogenetic relationship of *Aegilops mutica* Boiss. with the diploid species of congeneric *Aegilops-Triticum* complex, based on the new method of genome analysis using its B-chromosomes // *Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ.* – 1991. – N 137. – P. 1–116.

IEFIMENKO T.S.¹, FEDAK G.², ANTONYUK M.Z.¹, TERNOVSKA T.K.¹

¹ *National University of "Kyiv-Mohyla Academy",*

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

² *Agriculture and Agri-Food Canada. Eastern Cereal and Oilseed Research Center, Ottawa, Ontario*

COMPARISON OF GROUP 5 CHROMOSOME OF AURORA AND AUROTICA USING SPECIFIC MICROSATELITES

Aims. Determine the possibility to use microsatellite loci specific to chromosomes of homeologous group 5-th for distinction of Aurora (AABBDD) and Aurotica (AABBTT) chromosomes. **Methods.** PCR with primers specific to SSR loci mapped at chromosomes 5A, 5B, and 5D. **Results.** From 112 studied SSR loci specific to 3 homeologous chromosomes of group 5, 13 loci were selected as diagnostically valuable for identification of 5T chromosome fragments in conditions when other homeologous chromosomes of the same group are present in the genome. **Conclusions.** Microsatellite loci specific to 5A, 5B, and 5D common wheat chromosomes can be used for identification of alien chromatin of chromosome 5T in the genome of amphidiploid.

Key words: wheat, genome-substitution amphidiploid, microsatellite analysis, chromosome distinction.

УДК 576.31; 576.316.2; 576.365

КОХАНЕНКО А.А., АРТЕМОВ Г.Н., НЕМИРОВИЧ-ДАНЧЕНКО Н.М., СТЕГНИЙ В.Н.

Томский государственный университет,

Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36, e-mail: alinakokhanenko@gmail.com

ОРГАНИЗАЦИЯ ПОЛОВОЙ ХРОМОСОМЫ XL В ПРОСТРАНСТВЕ ЯДЕР ТРОФОЦИТОВ В ХОДЕ ПОЛИТЕНИЗАЦИИ У ВИДОВ *DROSOPHILA* ПОДГРУППЫ «*MELANOGASTER*» С КАРДИНАЛЬНЫМИ РАЗЛИЧИЯМИ В АРХИТЕКТУРЕ ЯДЕР

Пространственная организация хромосом в ядре – один из разделов современной клеточной биологии, который получил широкое распространение и весьма актуален в современной клеточной биологии. Сегодня молекулярные биологи выделяют, по крайней мере, три механизма, которыми может осуществляться регуляция активности генома. Они тесно связаны между собой: Первый механизм осуществляется посредством транскрипционных факторов, которые способны связываться с определенными последовательностями генома [1]; Второй регуляторный механизм включает метилирование ДНК и пост-

трансляционную модификацию гистонов [2]; Третьим механизмом регуляции генов является определенная организация хромосом в пространстве ядра. Первые два механизма довольно широко изучены по отношению дифференциации эмбриональных стволовых клеток, в то время, как относительно третьего фактора известно очень немного. Пространственная организация и функционирование ядра обеспечиваются наличием двух типов связей – хромосомно-мембранных и межхромосомных [3–5]. Крупномасштабные хромосомные перемещения регулируют генную экспрессию путем