

АНТОНЮК М.З., МАНЬКОВСЬКА О.С., БОДИЛЬОВА М.В., ТЕРНОВСЬКА Т.К.  
Національний університет «Києво-Могилянська Академія» МОН України,  
Україна, 04070, Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: [tern@ukma.kiev.ua](mailto:tern@ukma.kiev.ua)

## ГЕНОМНИЙ СТРЕС В ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЯХ ЯК НАСЛІДОК ДІЇ ГАМЕТОЦИДНОЇ ХРОМОСОМИ 4S<sup>L</sup>

Залучення чужинних генів до генофонду м'якої пшениці пов'язано перш за все з необхідністю поповнювати запас вертикальних генів стійкості до найбільш розповсюджених хвороб пшениці. Адже відомо, що, по-перше, запас власних генів стійкості у пшениці AABBDD досить обмежений, по-друге, починаючи з 1956 року роботами з геномною та хромосомною інженерією пшениці цей запас повільно, але неухильно поповнюється [1], по-третє, частина генів стійкості швидко долається патогенами через мутування їх генів авірулентності. Тому перенесення нових генів залишається задачею настільки актуальною, наскільки ж і непростою. Основна складність цього процесу полягає в тому, що ген стійкості до геному інтрогресивної пшеничної лінії потрапляє у складі цілої чужинної хромосоми чи, в кращому випадку, транслокації чужинного хроматину на пшеничну хромосому. В обох випадках в геном лінії крім гена стійкості потрапляє деякий обсяг чужинного хроматину і це призводить до певних небажаних наслідків. Перш за все, і це було встановлено ще на початку розвитку робіт з хромосомною інженерією, експресія чужинних генів, які супроводжують гени стійкості, хоча й не є ціллю трансгеноза, помітно псує всі ці властивості пшеничної лінії, які роблять її сортом, тобто продуктивність рослини, якість борошна, легкість обмолоту, висота та міцність стебла тощо. Крім того внесення у стабільний, протягом еволюції упорядкований геном хроматину, який геномом впізнається як чужий, викликає події, які сучасною генетиною мовою називаються геномним стресом і можуть пояснюватися дією будь-яких механізмів епігенетичних змін. Саме тому перенесення генів стійкості від інтрогресивних ліній до м'якої пшениці перш за все впирається у вивчення можливості редукції кількості чужинного хроматину, що включається у геном пшениці. Серед кількох механізмів, які застосовуються для такої редукції, у останні роки увагу дослідників привернули спроби використання гаметоцидних хромосом підтриби *Triticinae* як факторів, що викликають перебудову хромосом у гаметах гібридних рослин, що містять гаметоцидну хромосому. Нами вивчається потенція хромосоми 4S<sup>L</sup> щодо можливості отримання рослин, які зберігають життєздатність та фертильність, хоча походять від гібрида з хромосомою 4S<sup>L</sup>, проте самі її не мають.

### Матеріал та методика

Для отримання гібридів 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 4S<sup>L</sup>. Наявність чи відсутність 4S<sup>L</sup> хромосоми було встановлено через використання молекулярно-генетичних маркерів: мікросателітних повторів з праймерами, специфічними для хромосоми 4D, та гена  $\beta$ -*Amy-1*, — з урахуванням картини асоціації хромосом у M1 мейозу материнських клітин пилку у гібридів досліджуваних ліній з сортом м'якої пшениці Аврора. Жіночими компонентами схрещування слугували гібриди F<sub>1</sub>, отримані від схрещування: інтрогресивних ліній *T. aestivum/Ae. speltoides* та *T. aestivum/Ae. umbellulata* з 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* с сортом м'якої пшениці Одеська 267, 2 комбінації. Гібриди, отримані від схрещування вказаних гібридів F<sub>1</sub> з інтрогресивними лініями, що мали (група 1) чи не мали (група 2) гаметоцидну хромосому, не мали бути одноманітними через гібридну природу жіночого компоненту схрещування. Тому

насіння  $F_2$  збирали та піддавали аналізу від кожної рослини  $F_1$  окремо. Вивчали три показники: фертильність рослин  $F_1$  від схрещування перелічених гібридів з лініями *T.aestivum/Ae.sharonensis*; генотип материнських компонентів схрещування за геном  $\beta$ -*Amy-1* та частота передачі хромосоми  $4S^1$  нащадкам; кількість хромосом у нащадків  $F_2$ . Фертильність розраховували як відношення кількості зерен до кількості квіток на головному колосі рослини. Генотип насінин  $F_2$  встановлювали через вивчення електрофоретичного спектру  $\beta$ -амілази у екстрактах з сухих насінин  $F_2$ . Кількість насінин від кожної рослини  $F_1$ , які аналізувалися, коливалась від наявного мінімуму (1 насінина) до 10. Для отримання екстракту використовували половинку зернини без зародку. Електрофорез виконано у нативному поліакріламідному гелі за модифікованою методикою Девіс. Кількість хромосом визначали у клітинах первинних корінців паростків, отриманих з половинок зернин з зародком.

### Результати та обговорення

Метою виконаного експерименту було отримати відповідь на питання: чи можна використовувати лінії з гаметоцидною хромосомою  $4S^1$  у якості 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. Хромосома  $4S^1$  відома дуже жорсткою дією на геном [2], і це було підтверджено нашими попередніми дослідженнями. Фертильність гібридів  $F_1$  коливалась від 0 до 1,39 зернин на колос. Розподіл частот варіант серед сукупності всіх вимірів демонстрував різку асиметрію ( $As=2,27\pm 0,12$ ,  $t=19,3$ ), що позбавило нас можливості оперувати арифметичними середніми значеннями та параметричними критеріями для аналізу даних. Окремі групи рослин було охарактеризовано середніми рангами (рис. 1). Для вивчення мінливості за ознакою використано непараметричний дисперсійний аналіз Крускала-Уолліса та критерій Данна для внутрішньокмлексного порівняння середніх рангів, адже групи були різновеликими. Досліджувалось питання, чи відрізняються середні ранги один від одного у залежності від того: 1) чи має лінія *T.aestivum/Ae.sharonensis* гаметоцидну хромосому, чи ні; 2) чи є материнський компонент схрещування гібридом між інтрогресивними лініями, чи у схрещуванні брав участь сорт м'якої пшениці; 3) які саме інтрогресивні лінії дали початок материнському компоненту схрещування. Ці питання й були чинниками, вплив яких на мінливість ознаки перевірявся (табл. 1).

Загальний обсяг комплексу 426.

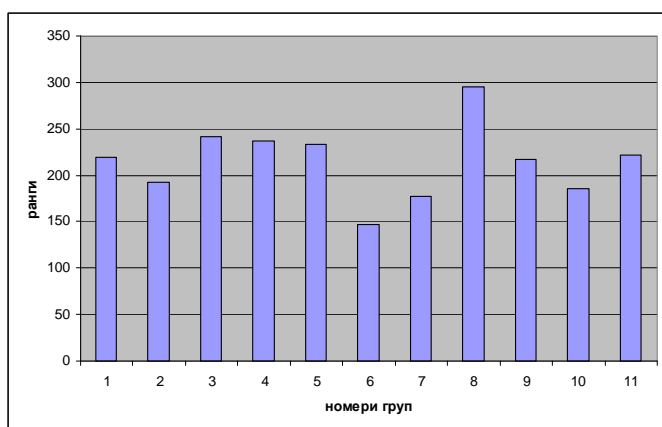


Рис. 1. Середні ранги за фертильністю гібридів різного походження. 1 –  $4S^1$  у геномі присутня, 2 –  $4S^1$  у геномі відсутня, 3–5 – гібриди  $F_1$  материнського компоненту схрещування були утворені за участю тільки інтрогресивних ліній, 6–7 – гібриди  $F_1$  материнського компоненту схрещування були утворені за

участю сортів м'якої пшениці, 8–11 – в утворенні гібридів  $F_1$  брали участь інтрогресивні лінії різного походження.

Не виявлено розбіжностей за фертильністю між групами гібридів, які містили чи не містили хромосому  $4S^1$  (табл. 1). Низьку фертильність гібридів  $F_1$ , які несуть хромосому  $4S^1$ , легко пояснити загибеллю частини гамет, що не мають цієї хромосоми. Гібриди другої групи не мають гаметоцидної хромосоми, але лінії *T.aestivum/Ae.sharonensis*, які брали участь в їх утворенні, у своєму родоводі мали

гібрид AABBDS з хромосоною 4S<sup>1</sup>. Отже, наслідки аберантних подій, які мали місце у геномі цього гібриду, діють протягом наступних поколінь навіть серед нащадків, які гаметоцидну хромосому не успадкували. Цей феномен можна назвати загальним терміном геномний стрес. Статистично значущою різницею у фертильності ( $p < 0,01$ ) характеризувались гібриди, материнський компонент яких походив від схрещування тільки інтрогресивних ліній (групи 3–5) чи включав у родовід сорти м'якої пшениці (групи 6–7). Гібриди, до родоvodu яких увійшли сорти м'якої пшениці, характеризувались більш низькою фертильністю. При порівнянні гібридів, які вели походження 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 значущість різниць 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 ( $M_e$  (медіана) = 0,15 для комплексу у цілому,  $M_e = 0,095$  для групи 6 та  $M_e = 0,20$  для групи 8) вказують на дуже низький відсоток зав'язування насіння, хоча не було жодної комбінації схрещування, від гібридів F<sub>1</sub> якої нам не вдалося б отримати хоча б кілька насінин. Отже, ні наявність у геномі гібрида гаметоцидної хромосоми 4S<sup>1</sup>, ні, у випадку її відсутності у гібриді, що його насіння досліджувалось, участь цієї хромосоми у походженні гібридного матеріалу, не призводить до повної стерильності нащадків. Проте залишається питання про частоту передачі самої гаметоцидної хромосоми нащадкам гібридів F<sub>1</sub>, які мали різну конституцію стосовно цієї хромосоми.

Таблиця 1.

Результати трьох однофакторних непараметричних дисперсійних аналізів.

Джерело мінливості в кожному комплексі	D	H	df	P
Наявність гаметоцидної хромосоми	15158,5	3,35	1	>0,05
Природа материнського компонента схрещування	106484	37,71	4	<0,01
Походження інтрогресивних ліній	108735,1	10,85	3	<0,05,>0.01

Для аналізу конституції гібридних рослин F<sub>1</sub>, насіння яких від самоzapліднення ми вивчали, використали ген  $\beta$ -*Amy-1*, алель якого  $\beta$ -*Amy-S<sup>1</sup>* є маркером наявності хромосоми 4S<sup>1</sup> у присутності алелів  $\beta$ -*Amy-D1* сортів м'якої пшениці, зокрема сортів Аврора та Одеська 267. Вивчали нащадків тільки тих гібридів F<sub>1</sub>, які запилювались лінією з гаметоцидною хромосоною (група 1). Ці гібриди не мали бути одноманітними, оскільки у якості материнського компоненту схрещування для запилення використовували гібриди F<sub>1</sub> від схрещування інтрогресивних ліній, стійких до борошністої роси та бурої іржі, одна з однією (групи 3–5), чи з сортом м'якої пшениці (групи 6, 7). Проте за геном  $\beta$ -*Amy-1* материнські компоненти всіх схрещувань мали бути  $\beta$ -*Amy-D1*  $\beta$ -*Amy-D1*, оскільки були гібридами між однаковими за цим геном генотипами. Якщо генотип гібридів F<sub>1</sub>, встановлений за насінням F<sub>2</sub>, відхилявся від очікуваного генотипу  $\beta$ -*Amy-D1*  $\beta$ -*Amy-S<sup>1</sup>*, результати розщеплення насінин від такого гібрида в даній роботі не враховували.

Як наслідок гаметоцидної дії хромосоми 4S<sup>1</sup> серед гамет, які формують гібриди F<sub>1</sub>, насінневих нащадків яких ми досліджуємо, в утворенні нащадків F<sub>2</sub> мають брати переважну участь гамети, які містять хромосому 4S<sup>1</sup>, маркером якої в нашому дослідженні є алель  $\beta$ -*Amy-S<sup>1</sup>*. За таких умов емпіричне співвідношення генотипів з різними алелями буде відхилятися від теоретично очікуваного 1:2:1 у бік збільшення гомозигот  $\beta$ -*Amy-S<sup>1</sup>*  $\beta$ -*Amy-S<sup>1</sup>* проти гетерозигот  $\beta$ -*Amy-S<sup>1</sup>*  $\beta$ -*Amy-D1* та гомозигот  $\beta$ -*Amy-D1*  $\beta$ -*Amy-D1*. Насправді для низки комбінацій (табл. 2) ми маємо надлишок гетерозигот  $\beta$ -*Amy-S<sup>1</sup>*  $\beta$ -*Amy-D1* проти обох типів гомозигот, що ніяк не може бути

пояснено з позицій переважної участі у заплідненні гамет з алелем *Amy-S<sup>1</sup>*. Така особливість розподілу може бути пояснена тільки стабільною гетерозиготністю одного з компонентів схрещування (гібриди 81, 85, 96 та 135). Стабільна гетерозиготність лінії, яка брала участь у походженні вказаних гібридів, за геном *Amy-1* могла виникнути в процесі її створення в результаті перебудови геному за рахунок утворення транслокованих хромосом. Наявність дицентричних хромосом в геномах декількох ліній з гаметоцидною хромосомою, є певним доказом на користь нашої гіпотези виникнення неочікуваного розподілу генотипів серед насіння F<sub>2</sub>. Іншою причиною спотворення розщеплення проти теоретично очікуваного, яку нами було досліджено раніше [3], є знижена життєздатність гамет без 4S<sup>1</sup> хромосоми та зигот, що походять від злиття таких гамет.

Таблиця 2.

Розщеплення за геном *β-Amy-1* серед насінневих нащадків F<sub>2</sub>

Номер гібрида	Кількість рослин F <sub>1</sub>	Генотип насінини F <sub>2</sub>			Номер гібрида	Кількість рослин F <sub>1</sub>	Генотип насінини F <sub>2</sub>		
		DD <sup>1)</sup>	DS <sup>1</sup>	S <sup>1</sup> S <sup>1</sup>			DD	DS <sup>1</sup>	S <sup>1</sup> S <sup>1</sup>
81	19	1	67	22	138	5	1	9	8
85	4	0	18	4	143	4	0	18	16
88	4	0	29	11	159	6	0	14	6
96	25	12	128	45	271	6	2	32	16
93	13	2	37	28	292	9	19	39	19
135	5	1	21	6	301	5	2	18	9

<sup>1)</sup> DD = *β-Amy-D1β-Amy-D1*, DS<sup>1</sup> = *β-Amy-D1β-Amy-S<sup>1</sup>1*, S<sup>1</sup>S<sup>1</sup> = *β-Amy-S<sup>1</sup>1β-Amy-S<sup>1</sup>1*.

Контроль кількості хромосом виявив коливання серед нащадків F<sub>2</sub> від 39 до 43. Серед нащадків різних гібридів спостерігали такі відхилення від нативного генотипу сорту Аврора: пара дицентриків, чотири супутничні хромосоми замість двох, до чотирьох телоцентричних хромосом, дуже маленькі хромосоми, яких не буває у сорту Аврора.

### Література

1. *McIntosh R.A. et al. Catalogue of gene symbols for wheat. <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>*
2. Endo T.R. The gametocidal chromosome as a tool for chromosome manipulation in wheat // *Chromosome research*. – 2007. V. 15. – P. 67–75.
3. *Antonyuk M., Ternovskaya T., Vdovychenko Zh.* “Minimization of alien chromatin volume in the introgressive common wheat lines,” *Proceedings of the Tenth International Wheat Genetic Symposium, Paestivum, Italy, September, 1–6 2003*, pp. 869–871, 2003.

### Резюме

Гібриди от скрещивания линий мягкой пшеницы с интрогрессиями от разных видов эгилопса и пырея с интрогрессивными линиями *T. aestivum/Ae.sharonensis*, которые содержат гаметоцидную хромосому 4S<sup>1</sup>, дают при самоопылении жизнеспособное потомство без хромосомы 4S<sup>1</sup>. Это может быть использовано для индукции хромосомных перестроек у интрогрессивных гибридов.

Гібриди від схрещування ліній м'якої пшениці з інтрогресіями від різних видів егілопсу та пирею з інтрогресивними лініями *T. aestivum/Ae.sharonensis*, що містять гаметоцидну хромосому 4S<sup>1</sup>, продукують при самозапиленні життєздатних нащадків без хромосоми 4S<sup>1</sup>. Це може бути використано для індукції хромосомних перебудов у інтрогресивних гібридів.

The hybridological analysis including the plant introgressive lines must be accompanied by the cytological control of the introgressive lines as to their stability and study of chromosome behavior in M1 of PMC in the F<sub>1</sub> hybrids. Otherwise, the theoretical frequencies of the

phenotype classes under segregation could not be determined correctly, which would affect the conclusion about gene number.