

ЗЕРНОВАЯ КИСЛОЯ ФОСФАТАЗА КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАРКЕР ХРОМОСОМ ЧЕТВЕРТОЙ ГОМЕОЛОГИЧЕСКОЙ ГРУППЫ У ЭГИЛОПСОВ И ПШЕНИЦЫ

Сравнительное изучение ряда пшеничных форм с разным геномным составом по электрофоретическому спектру зерновой кислой фосфатазы показало пригодность этого фермента для идентификации чужеродного генетического материала хромосом 4-й гомеологической группы при его включении в интрогрессивные линии мягкой пшеницы. Среди исследованных линий выявлены носители чужеродного хроматина от эгилопса и пшеницы Мигушовой.

Введение. При создании чужеродно-замещенных линий мягкой пшеницы путем «смешивания» хромосом двух расщепляющихся субгеномов в пределах гексаплоидного организма центральной задачей является идентификация чужеродной пары хромосом в полученной стабильной гексаплоидной линии [1]. Если изучение конфигурации хромосомных ассоциаций в М1 мейоза не оставляет сомнений в том, что имеет место замещение пшеничной пары хромосом на пару целых чужеродных гомеологов, для идентификации чужеродной хромосомы достаточно показать отсутствие у линии пшеничного гена известной хромосомной локализации и наличие чужеродного гена, контролирующего тот же фенотипический признак [2]. Самыми пригодными по своей доступности и часто употребляемыми для целей идентификации по гомеологической принадлежности хромосомы есть гены, контролирующие синтез запасных белков и ферментов — биохимические маркеры [3]. Мы занимаемся идентификацией чужеродных хромосом по их гомеологической принадлежности в чужеродно-замещенных линиях пшеницы с хромосомами видов *Aegilops umbellulata* (UU), *Ae. speltoides* (SS), *Ae. sharonensis* (S¹S¹), а также чужеродных включений в пшеничных линиях, произошедших от *Triticum miguschovae* (A^bA^bGGDD). Нами уже была показана диагностическая ценность генов запасных белков, альфа- и бета-амилазы, зерновой пероксидазы и эстеразы для идентификации хромосом трех видов эгилопса [4–7].

Кислая фосфатаза КФ (3.1.3.2) катализирует гидролиз сложно-эфирной связи. Субстрат — большинство моноэфиров ортофосфорной кислоты. Локализация контролирующего фермент генов *AcpH-1* у пшеницы известна: 4AL, 4BS, 4DL [8, 9]. Есть примеры успешного использования этих генов как хромосомных маркеров при изучении чужеродно-замещенных линий с хромосомами *S. cereale* [10, 11], *Ae. searsii* [12], *T. araraticum* [13], *T. timopheevii* [14].

В настоящей статье даны результаты изучения полиморфизма гена кислой зерновой фосфатазы для выяснения пригодности гена *AcpH-1* на роль маркера хромосом 4-й гомеологической группы в отношении видов *Ae. umbellulata*, *Ae. speltoides*, *Ae. sharonensis*, *T. miguschovae*.

Материалы и методы. Изучены растительные объекты: сорта мягкой пшеницы Чайниз Спринг, Аврора, Кавказ, Безостая 1 (*Triticum aestivum* L., AABBDD), линия твердой пшеницы (*T. durum* Desf., AABB) Mutiko italicum (MI), геномно-замещенные формы Авролата (AABB^{UU}), Авродес (AABB^{SS}), Аврозис (AABB^{S¹S¹}) амфидиплоид *T. militinae* Zhuk. et Migusch. × *Ae. tauschii* Coss. κ-346, названный *T. miguschovae* Zhiron (A^bA^bGGDD) [15], амфидиплоид Mutiko italicum × *Ae. tauschii* κ-346 (MIT346, AABBDD), *T. militinae* (A^bA^bGG), нулли-тетрасомные линии



Рис. 1. Электрофоретические спектры зерновой кислой фосфатазы: а — Аврора, б, ж — Чайниз Спринг, в — нулли-4D-тетра-4А, г — нулли-4D-тетра-4В, д — нулли-4А-тетра-4В, е — нулли-4В-тетра-4D, з — *T. boeoticum*, и — *Ae. longissima*.

Чайниз Спринг по 4-й гомеологической группе, *Ae. longissima* Schweinf. et Muschl. (SS), *T. boeoticum* Boiss. (A^bA^b), гексаплоидные чужеродно-замещенные и транслокационные линии мягкой пшеницы, ведущие свое происхождение от Аврозиса и пшеницы Мигушовой.

Электрофоретическое разделение изоферментов кислой фосфатазы проводили в непрерывной трис-глициновой ПААГ-системе, как было описано нами для бета-амилазы [5]. Направление электрофореза — от «-» к «+». Разбитые сухие зерна заливали 100–200 мкл экстракционного буфера состава: 300 мг Трис, 350 мг аскорбиновой кислоты, 35 мг цистеин-НСl, 150 мг ЭДТА, 10 г сахарозы, дистиллированной воды до 50 мл. Залитые образцы выдерживали ночь (при +4 °С). Гистохимическое выявление проводили раствором состава: 0,2 М ацетатный буфер (рН 5,0) 100 мл, 1-нафтилфосфат-Na соль 50 мг, 1 М $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1 мл, 0-дианизидин 50 мг. Реакцию останавливали 10 %-ной уксусной кислотой, гели промывали проточной водой и сушили.

Результаты исследований и их обсуждение. Спектр кислой фосфатазы сорта Аврора (рис. 1, а) не отличается от спектра сорта Чайниз Спринг (рис. 1, б, ж). Это дает возможность полученные на сорте Чайниз Спринг сведения о хромосомной локализации генов, ответственных за синтез разных изоферментов, распространить на сорт Аврора. Спектры линий нулли-4D-тетра-4А (рис. 1, в) и нулли-4D-тетра-4В (рис. 1, г) одинаковы и не содержат трех зон активности с самой низкой подвижностью, 1–4, что соответствует результатам Харта [9]. Спектры линий нулли-4А-тетра-4В и нулли-4В-тетра-4D отличаются друг от друга слабо, только зоной 5, которой нет у нулли-4В (рис. 1, е). На рис. 1, з представлен спектр кислой фосфатазы однозернянки: зоны 6 (очень слабая), 7, 8. Спектр фермента из *Ae. longissima* (SS), представителя подсекции *Emarginata* секции *Sitopsis* (рис. 1, и), одного из многих претендентов на роль донора субгена В пшеницы (обзор [1]), имеет зоны активности 5 и 6 — очень слабые. Мы предполагаем, что зона 5 связана с экспрессией гена кислой фосфатазы из хромосомы 4В, а зоны 6–7, имеющиеся на спектрах фермента любых нулли-тетрасомиков, контролируются генами из разных хромосом — А, В. То, что субгеном D не принимает участие в формировании этих составных зон, видно из спектра *T. miguschovae* (A^bA^bGGDD) (рис 2, д). Он состоит из части, совпадающей со спектром *T. militinae* (A^bA^bGG) — зоны 9, 10, 11, и части, образующейся как результат активности субгена D, зоны 1–4 (рис. 2, г). Доказательство того, что эти зоны контролируются D-хромосомой, проистекает из сравнения треков е (амфидиплоид МИ × *Ae. tauschii*) и ж (МИ) рис. 2. Относительно хромосомной локализации генов, контролирующих зоны 9–11, можно сделать некоторые предположения. Спектр однозернянки (A^bA^b)

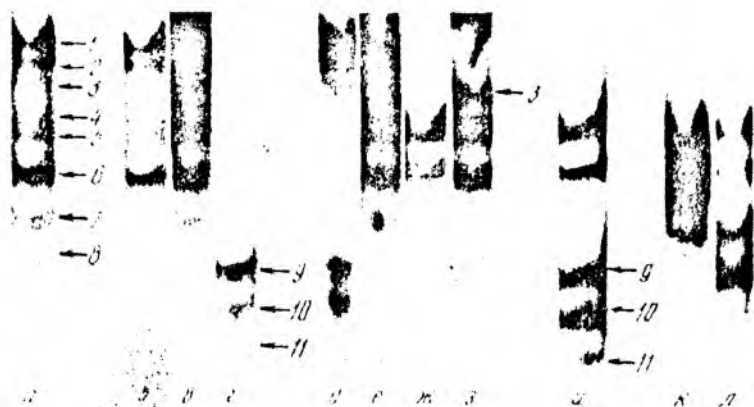


Рис. 2. Электрофоретические спектры зерновой кислой фосфатазы: а — Аврора, б — Кавказ, в — Безостая 1, z — *T. militinae*, d — *T. miguschovae*, e — МИТ346, ж — МИ, з — Аврозис, и — Авродес, к — Авролата, л — Авротика.

в наиболее подвижной зоне (8) практически перекрывается зоной 9 спектра пшеницы Милитинэ (A^bA^bGG). По-видимому, появление этой зоны связано с экспрессией гена *Asph-A1*. Подобное расположение отдельных изоферментов кислой фосфатазы друг относительно друга в спектрах *T. boeoticum* и *T. timopheevi* (A^bA^bGG) наблюдал Яаска [16]. По результатам того же автора, наиболее подвижная зона в спектре тетраплоида совпадает с зоной активности изофермента у *Ae. speltoides* Tausch. (SS). В наших спектрах этой зоне, растянутой в пространстве и неоднородной по интенсивности в исследовании Яаски [16], соответствуют хорошо разделившиеся зоны 10 и 11. Мы предполагаем, что эта часть спектра, т. е. зоны 10 и 11, контролируется геномом G, происхождение которого некоторые авторы связывают с S-геномом *Ae. speltoides* Tausch. или, по результатам более современных исследований, с *Ae. aucheri* Boiss — вторым членом подсекции *Truncata* секции *Sitopsis* (обзор [1]).

На рис. 2, з-л показаны спектры кислой фосфатазы геномно-замещенных форм Аврозис, Авродес, Авролата и Авротика соответственно. Поскольку перечисленные геномно-замещенные формы получены замещением субгенома DD сорта Аврора геномами диплоидных эгилопсов с геномами S¹S¹, SS, UU [1] и M¹M¹, все различия в спектрах Авроры и любой из этих форм будут связаны с отсутствием субгенома DD и наличием другого генома в качестве третьего субгенома гексаплоида. У всех четырех форм отсутствуют зоны активности, связанные с экспрессией гена *Asph-D1* и определяются с разной степенью интенсивности зоны активности, находящиеся под контролем хромосом 4A и 4B. Авролата не имеет никаких других зон активности. Единственным ее отличием в этой части спектра от спектра сорта Аврора является гораздо более высокая активность изоферментов в зонах 5–7, так что они сливаются в одно пятно. Аврозис отличается от Авроры появлением в его спектре очень мощной зоны активности, совпадающей по подвижности с зоной 4. Авротика характеризуется двумя дополнительными зонами, 9 (или 8, но более интенсивная) и 10, а Авродес — тремя: 9 (или 8), 10, 11. Спектр Авродеса вполне соответствует ожидаемому на основе результатов Яаски [16] и спектра пшеницы Мигушовой.

На рис. 2, б и в показаны спектры кислой фосфатазы сортов мягкой пшеницы Кавказ и Безостая 1 соответственно. Эти сорта были рекуррентными родителями в процессе формирования линий мягкой пшеницы с включением генетического материала пшеницы Мигушовой. Спектры изучаемого фермента у этих сортов полностью совпадают со спектрами сортов Аврора и Чайниз Спринг и отличаются от спектра

пшеницы Мигушовой в части, контролируемой не субгеномом D. Как нами уже упоминалось, сравнение спектров *T. militinae* и *T. boeoticum* позволяет предположить (но не доказывает!), что зона 9 (или 8) контролируется хромосомой 4A, а зоны 10, 11 — хромосомой 4G. О наличии генетического материала пшеницы Мигушовой 4-й гомеологической группы в полученных с ее участием гексаплоидных линиях мягкой пшеницы будет свидетельствовать появление в спектре исследуемой линии зон активности 10 и 11, зону же 9 мы не отличим от зоны 8.

Чтобы испытать, можно ли использовать гены *AcpH-1* для визуализации чужеродного генетического материала из хромосом 4 гомеологической группы в геноме мягкой пшеницы рекуррентных сортов, изучили электрофоретические спектры зерновой кислой фосфатазы 70 гексаплоидных линий, ведущих свое происхождение от скрещивания *T. miguschovae* × *T. aestivum* (сорта Кавказ, Безостая 1), и 171 линию, связанную происхождением со скрещиванием Аврозиса с Авророй. Среди линий — производных пшеницы Мигушовой нашли четыре с зоной активности 10, хотя менее интенсивной, чем в спектре пшеницы Мигушовой. Зона 11 не определялась, а расположение зоны 9 таково, что вряд ли ее можно отделить от зоны 8, если они имеют место обе в одном спектре. В целом, фермент зерновая кислая фосфатаза не оказался надежным и удобным маркером хромосом 4-й группы при идентификации генетического материала пшеницы Мигушовой.

Среди 171 линии — производных Аврозиса было найдено 5, в электрофоретическом спектре кислой фосфатазы зерен которых безо всякого сомнения из-за намного более высокой в сравнении с мягкой пшеницей активности определялась зона 4, свойственная Аврозису. В спектрах этих линий отсутствовали зоны 1–3, т. е. эти линии имеют чужеродное замещение 4S¹L(4DL). Для трех линий из пяти такое замещение нами было уже показано ранее при изучении электрофоретических спектров β-амилазы у линий — производных Аврозиса [2]. Установлено, что ген β-Аму-1S¹ расположен в хромосоме 4S¹L [17]. По результатам настоящего исследования можно сделать вывод, что ген *AcpH-1S¹* расположен в той же хромосоме 4S¹L. Этого и следовало ожидать исходя из хромосомной локализации этих генов у мягкой пшеницы, выполненной Хартом [8, 9].

Выводы. Электрофоретические спектры зерновой кислой фосфатазы геномно-замещенных форм пшеницы, имеющих взамен субгенома D мягкой пшеницы сорта Аврора диплоидные геномы трех видов эгилопса, отличаются от спектра этого фермента у сорта мягкой пшеницы Аврора, донора субгеномов AABB геномно-замещенных форм. Это позволяет использовать результаты изучения линий — производных геномно-замещенных форм по элекрофоретической подвижности изоферментов зерновой кислой фосфатазы для идентификации чужеродных включений: 4UL, 4S¹L, 4SL. Идентифицирован ген *AcpH-1S¹* и локализован в хромосоме 4S¹ *Ae. sharonensis*. Фермент менее удобен для идентификации чужеродных включений 4G и не пригоден для идентификации включений хромосомы 4A^b, встречающихся у линий, полученных от скрещивания мягкой пшеницы и пшеницы Мигушовой.

SUMMARY. The fitness of seed acid phosphatase for identification of alien genetical material in 4th homoeological group of chromosomes included in the transgressive common wheat lines was shown in electrophoretical study. Lines carrying alien incorporation from goat grass and Miguschova's wheat were revealed.

РЕЗЮМЕ. Порівняльні вивчення низки пшеничних форм з різним геномним складом за електрофоретичним спектром зернової кислої фосфатази продемонструвало придатність цього ферменту для ідентифікації чужинного генетичного матеріалу хромосом

4-ї гомеологічної групи при його включенні у трансг्रेसивні лінії м'якої пшениці. Серед ліній, що вивчалися, знайдено посіїв чужинного хроматину від егілопсу та пшениці Мігуньової.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Жирова Е. Г. Геномы пшеницы: исследование и перестройка : Дис. ... д-ра биол. наук. — Краснодар, 1989. — 366 с.
2. Антонюк М. З. Створення та генетичне маркування ліній пшениці з хромосомами трьох видів егілопсу : Дис. ... канд. биол. наук. — Київ, 1995. — 163 с.
3. Терновская Т. К., Антонюк М. З. Гены биохимических признаков как маркеры чужеродного генетического материала в геноме пшеницы // Цитология и генетика. — 1996. — 30, № 3. — С. 71–85.
4. Антонюк М. З., Терновская Т. К., Созинов А. А. Идентификация блоков электрофоретических компонентов запасных белков, кодируемых генами трех видов эгилопса // Физиология и биохимия культур. растений. — 1994. — 26, № 5. — С. 474–481.
5. Антонюк М. З., Терновская Т. К. Изоферменты бета- и альфа-амилазы для идентификации генетического материала трех видов *Aegilops*, включенного в геном мягкой пшеницы // Цитология и генетика. — 1995. — 29, № 2. — С. 3–8.
6. Антонюк М. З., Терновская Т. К., Злацкая А. В. Идентификация генов зерновой пероксидазы у трех видов эгилопса // Агроекология та біотехнологія : Зб. наук. праць Ін-та агроекології та біотехнології. — Київ : Аграрна наука, 1996. — С. 239–245.
7. Антонюк М. З., Терновская Т. К. Локусы эстеразы для идентификации чужеродного генетического материала в геноме пшеничных линий // III Всерос. симпозиум по биотехнологии растений : Материалы конф. — Пушкино-на-Оке, 1995. — С. 83.
8. Hart G. E. Homocologous genes evolution in hexaploid wheat // Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp. — Columbia, Missouri, 1973. — P. 805–810.
9. Hart G. E., Langston P. J. Chromosome location and evolution of isozymes structural genes in hexaploid wheat // Heredity. — 1977. — 39. — P. 263–277.
10. Tang K. S., Hart G. E. Use of isozymes as chromosome markers in wheat-rye addition lines and triticale // Genet. Res. — 1975. — 26. — P. 151–157.
11. Палилова А. Н., Хотылева Л. В., Турбин Н. В., Юренкова С. И. Анализ генома октоплоидных тритикале методом ферментных маркеров // Докл. АН БССР. — 1984. — 28, № 11. — С. 1034–1036.
12. Pietro M. E., Tuleen N. A., Hart G. E. Development of wheat-Triticum searsii disomic chromosome addition lines // Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp. — Cambridge, England, 1988. — 1. — P. 409–414.
13. Gill K. S., Gill B. S., Snyder E. B. *Triticum araraticum* chromosome substitutions in common wheat, *Triticum aestivum* cv. Wichita // Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp. Cambridge, England, 1988. — 1. — P. 87–92.
14. Broun-Guedira G. L., Badaeva E. D., Gill B. S., Cox T. S. Chromosome substitutions of *Triticum timopheevii* in common wheat and some observations on the evolution of polyploid wheat species // TAG. — 1996. — 93. — P. 1291–1298.
15. Жирова Е. Г. Синтез новой гексаплоидной пшеницы // Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. — 1980. — 68, вып. 1. — С. 14–16.
16. Яаска В. Геном- и тканеспецифическая регуляция изоферментов эстеразы и кислой фосфатазы у тетраплоидных пшениц при прорастании // Изв. АН ЭССР. Сер. биол. — 1976. — 25, № 2. — С. 133–145.
17. Ainsworth C. C., Miller T. E., Gale M. D. α -Amylase and β -amylase homoeoloci in species related to wheat // Genet. Res. Camb. — 1987. — 49, N 2. — P. 93–103.

Ин-т агроекологии и биотехнологии
УААН, Киев

Поступила 06.07.98