

УДК 633.11: 575.2: 581.19

В. А. Топтіков, канд. біол. наук, ст. наук. співроб., **Л. Ф. Дьяченко**, канд. біол. наук, пров. наук. співроб., **В. М. Тоцький**, д-р біол. наук, проф., зав. каф., **Ю. В. Седлецька**, студ.

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, кафедра генетики та молекулярної біології,

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна, E-mail: caphgen_onu@mail.ru.

ФІЛОГЕНЕТИЧНІ ВЗАЄМОВІДНОШЕННЯ ГЕНОМІВ ПШЕНИЦЬ ЗА АНАЛІЗОМ МНОЖИННИХ ФОРМ ФЕРМЕНТІВ

Проаналізовано електрофореграми множинних форм деяких оксидоредуктаз і естераз у різних пшениць та їх родичів (всього 21 вид). Встановлена геномна специфічність спектрів множинних форм досліджених ферментів. На основі аналізу електрофоретичних спектрів ферментів побудовано дендрограму, яка показує філогенетичні взаємовідношення між геномами злаків. Зроблено висновок про домінуючий вплив геному А за поєднання з іншими геномами злаків.

Ключові слова: множинні форми ферментів, оксидоредуктази, естерази, пшениця, філогенія

Пшениця, особливо м'яка, є найважливішою харчовою культурою людства. Тому питання про походження різних видів пшениць та їх спорідненість дуже цікавить дослідників. Незважаючи на те, що спеціальна генетика пшениць і проблеми їх філогенезу вивчаються досить давно і ефективно, спільної думки щодо походження м'якої пшениці та її геномів поки що немає [1—5].

З'ясуванню такого складного питання може сприяти використання різних підходів та методів: засобів класичної генетики, цитогенетики і хромосомного аналізу, молекулярної біології та біохімічної генетики. Серед усіх зазначених методів для цієї мети сьогодні широко застосовується метод аналізу множинних форм ферментів. Розповсюдженням стає використання ізоформ ферментів як генетичних маркерів [3, 6—8], а також для з'ясування генетичної спорідненості та походження пшениць [3, 9—12].

Метою цієї роботи є з'ясування особливостей електрофоретичних спектрів досліджуваних оксидоредуктаз і естераз у носіїв певних геномів і побудова на підставі отриманих даних філогенетичного дерева геномів роду *Triticum*.

Матеріали і методи

В роботі використовували матеріал люб'язно наданий Національним центром генетичних ресурсів України Інституту рослинництва

ім. В. Я. Юр'єва і доцентом кафедри генетики і молекулярної біології ОНУ ім. І. І. Мечникова О. Л. Січняком. Всього було проаналізовано 21 вид злаків з різним геномним складом та плоідністю:

геном А — *Triticum boeoticum* Boiss., *T. urartu* Thum., *T. monococcum* L. ($2n=2x=14$);

геном АВ — *T. dicoccum* Schuebl. (var. *serbicum* і var. *volgense*), *T. turgidum* L. (сорт Новинка та var. *salomonis*), *T. durum* Desf. (сорти Харківська 1, Чорномор, Дельта, Айсберг одеський), *T. turanicum* Jacubz., *T. aethiopicum* Jacubz., *T. polonicum* L., *T. persicum* Vav. (var. *fuliginosum* та var. *stramineum*), ($2n=4x=28$);

геном ABD — *T. macha* Dek. et Men., *T. spelta* L., *T. aestivum* L. (сорти Одеська 267, Тіра, Федорівка, Красуня, Безоста 1, Миронівська 808, Донська напівінтенсивна), *T. sphaerococcum* Perc., *T. petropavlovskiyi* Udacz, ($2n=6x=42$);

геном ABR — **Triticosecale* Wittmarck (сорти Сувенір, Простір, Ураган, Одеський зеніт), ($2n=6x=42$),

геном В — *Aegilops speltoides* L. (лінії ВІР К-12 та К-1314), ($2n=2x=14$);

геном D — *Ae. tauschii* Coss. (= *Ae. squarrosa* L.), ($2n=2x=14$ та природний поліплоїд $2n=4x=28$);

геном DC — *Ae. cylindrica* Host. (лінія ВІР К-206 та матеріал місцевого збору), ($2n=4x=28$);

геном CU — *Ae. triuncialis* L. ($2n=4x=28$);

геном R — *Secale cereale* L. (сорти Харківська 78, Харківська 60, Нива, Insave, Tirolen, Snoopy), ($2n=2x=14$).

Ферменти екстрагували з етіолозованих паростків [13]. Електрофорез проводили у 10 % поліакриламідному гелі за системою Девіса [14] без концентруючого гелю.

Виявлення пероксидаз (ПО) — КФ 1.11.1.7 — здійснювали за методом [15], супероксиддисмутаза (СОД) — КФ 1.15.1.1 — [16], цитохромоксидаз (ЦХО) — КФ 1.9.3.1 — [17], фенолоксидаз (ФО) — КФ 1.10.3.1 — [18] і естераз — КФ 3.1.1.1, 3.1.1.2, 3.1.1.6, 3.1.1.7, 3.1.1.8 — [19].

Наявність множинних форм ферментів та ступінь забарвлення окремих смуг оцінювали візуально. Для комп'ютерної обробки електрофоретичних спектрів смуги в них оцінювали за двоїстою системою: 0 — відсутність смуги чи відносно низька інтенсивність забарвлення, 1 — наявність смуги чи відносно висока інтенсивність забарвлення. Кореляцію між параметрами досліджених видів (геномний склад, плоідність) та особливостями електрофореграм виявляли методом максимальної правдоподібності за допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Mapping" [20]. Для побудови генеалогічних древ використовували програму "Trees" [20].

Результати досліджень та їх аналіз

Як правило, генетичні дослідження ведуться на ізогенних лініях з метою забезпечення однорідності матеріалу. Такий підхід має певні

переваги, але відомо, що ізоферменти характеризуються високою внутрішньовидовою варіабельністю. Особливо це стосується видів, які мають складну алополіплоїдну структуру геному [3, 6—8]. У даному дослідженні для нівелювання внутрішньовидової і міжвидової варіабельності використовували пропорційні суміші екстрактів наявних ліній та сортів, які є носіями певних геномів. Цей підхід дозволяє абстрагуватися від внутрішньо- і міжвидової різноманітності і отримати "підсумкові" електрофореграми ферментів, які властиві конкретним геномам.

На рис. 1 наведено схеми електрофореграм досліджених ферментів, які отримані із сумішей екстрактів носіїв певних геномів. Аналіз результатів дозволяє визначити такі особливості експресивності множинних форм ферментів в досліджуваних геномах.

Носії геному А характеризуються наступними особливостями:

1) висока інтенсивність забарвлення ПО і ЦХО в діапазоні R_f 0,06–0,17;

2) найвищий рівень забарвлення смуг ПО, ФО і ЦХО з відносною рухливістю 0,06; при цьому максимальне забарвлення цих форм спостерігається у диплоїдних пшениць, тоді як у тетра- і гексаплоїдних пшениць пероксидазна та цитохромоксидазна активності в цій смузі трохи знижуються;

3) досить інтенсивна забарвленість форм ЦХО з R_f 0,22, 0,25 і 0,27;

4) слабка форма СОД з R_f 0,41;

5) притаманність форми β -естерази з відносною рухливістю 0,25 диплоїдним пшеницям (геном АА) та відсутність цієї активності як у алоплоїдів з цим геномом, так і в усіх інших рослин;

6) диплоїди з геномом АА відрізняються від решти досліджених рослин кількісною перевагою форм естерази з β -естеразною активністю над формами з α -естеразною: з 13 виявлених у них форм ферменту — 9 більш специфічні до β -субстратів.

Для спектрів носіїв геному В встановлені такі властивості:

1) специфічним для всіх алоплоїдів пшениць і тритикале (геноми ААВВ, ААВВDD, ААВВRR) є інтенсивна забарвленість смуги ПО з R_f 0,25; ці геноми, як згадувалося раніше, також характеризуються активною ізопероксидазою з R_f 0,06 (донор — геном А чи/і R); у протилежність цьому *Ae. speltoides* (геном ВВ), має дуже низьку інтенсивність забарвлення смуг ПО з відносною рухливістю 0,06 та 0,25;

2) для диплоїда характерною є інтенсивна смуга ЦХО з R_f 0,42, яка зустрічається і у деяких алоплоїдів;

3) наявність смуг СОД з R_f 0,02 і 0,08 у *Ae. speltoides* і значне послаблення їх у алополіплоїдів;

4) дуже інтенсивна α -естеразна активність в зоні з R_f 0,16–0,22 у диплоїда і відсутність цієї особливості у алоплоїдних пшениць і тритикале;

5) слабке проявлення форми естерази з R_f 0,28 у всіх носіїв геному В: *Ae. speltoides*, поліплоїдних пшениць і тритикале.

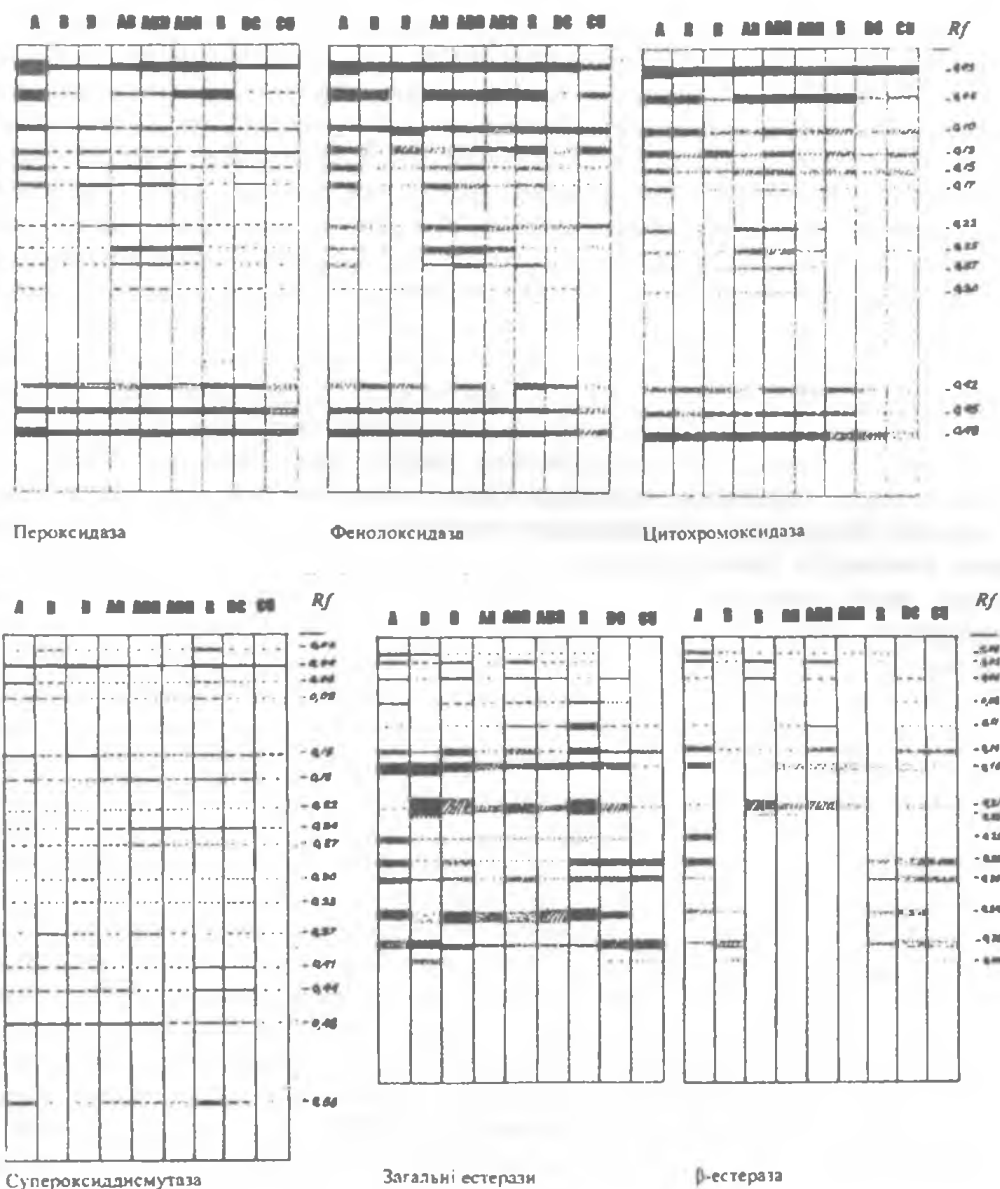


Рис. 1. Спектри множинних форм ферментів відповідних геномів злаків: A, B, D, AB, ABD, ABR, R, DC, CU — геноти, Rf — відносна електрофоретична рухливість

Узагальнюючи дані щодо особливостей електрофореграм носіїв геноту В, можна зазначити, що *Ae. speltoides* і алоплоїди пшениць та тритикале мають дуже мало спільних властивостей. Це добре узгоджується з даними, які свідчать за синтетичне походження геноту В у поліплоїдних пшениць. Крім *Ae. speltoides*, у його формуванні приймали участь також інші донори, такі як *Ae. longissima* або *Ae. sharonensis* і *Ae. bicornis* [3, 4, 21].

Носії геному D також не відзначаються великою кількістю спільних властивостей. Слід звернути увагу на відсутність форми ПО і ЦХО з Rf 0,06 у *Ae. tauschii*, але у алоплоїдів з геномом D ця смуга виявляється достатньо чітко. Диплоїди з геномом D, як і інші досліджувані диплоїдні злаки, характеризуються відносною перевагою пероксидазної та цитохромоксидазної активностей в діапазоні Rf 0,03—0,17 над активностями форм з Rf 0,17–0,30. У алоплоїдів пшениць і тритикале, навпаки, спостерігається протилежна залежність. *Ae. tauschii* має також високу α -естеразну активність у смугах з Rf 0,14, 0,16 та 0,34, але це не є властивим іншим носіям геному D.

Як і у випадку з геномом B, характеристики досліджуваного донора геному D (*Ae. tauschii*) мало співпадають з властивостями "реципієнтів". Однак, важко припускати синтетичне (від декількох донорів, або окремі донори для конкретних видів) походження геному D у гексаплоїдних пшениць, оскільки інші диплоїдні види з цим геномом не відомі. Можливо, в складених геномах має місце домінантно-рецесивна взаємодія гомеологічних структурних генів чи/і вплив регуляторних генів гомеологічних геномів, або внутрішньо- чи міжгеномна трансгресія [22]. Так, дослідження особливостей спектрів гліадинів, альбуминів і гістонів у пшенично-житніх амфігаплоїдів F_1 , тритикале та їх батьків показало, що в результаті об'єднання і взаємодії геномів пшениці та жита ознаки у гібридів не спадкуються тільки за принципом кодомінування і не є звичайною сумою вихідних (батьківських) властивостей [23]. Не виключно, що як донор геному D в пшеницях виступала інша різновидність *Ae. tauschii*, яку ми не використовували [3]. Усе це пояснює відмінності між спектрами ферментів (тобто експресивністю певних генів) донора і видів, які мають у своєму складеному геномі спадкоємний матеріал різних джерел.

Своєрідністю відзначаються спектри ферментів жита. З одного боку, вони мають спільні риси зі спектрами диплоїдних носіїв геному A: дуже активні форми ПО, ФО і ЦХО з Rf 0,06; відносно сильна забарвленість ЦХО з Rf 0,27. З другого боку, спектри жита схожі зі спектрами *Ae. speltoides* та *Ae. tauschii*: відносно низька забарвленість спектрів ПО і ЦХО в діапазоні Rf 0,15–0,25. Є властивості, які не зустрічаються у решти видів: одночасно висока інтенсивність забарвлення смуг ПО і ЦХО з рухомістю 0,10 та 0,13; добре проявляється форма СОД з Rf 0,58; висока α -естеразна активність в діапазоні Rf 0,11–0,22. За зіставлення спектрів жита і тритикале важко визначити конкретний вплив геному R на експресивність ферментів гібриду. Можна відмітити збереження у тритикале високої інтенсивності забарвлення форм ПО і ЦХО з Rf 0,06, тоді як у алоплоїдних пшениць експресивність цих форм знижується у порівнянні з диплоїдними пшеницями.

Геноми C і U представлені в колекції лише у двох-трьох зразках, що не дозволяє з упевненістю говорити про специфічність їх електрофореграм. Аналіз особливостей носіїв цих геномів не провадили.

Таким чином, можна зробити висновок, що електрофореграми множинних форм досліджених ферментів мають геномну специфічність та можуть бути застосованими для діагностики наявності елементів певних геномів. Необхідно вказати на домінування геному А у формуванні особливостей спектрів ферментів у поліплоїдних пшениць.

З літератури відомо [7], що особливості філогенетичних взаємовідношень, які відображають найбільш реальну ситуацію, можуть бути отримані шляхом аналізу великої кількості ферментних систем. Для отримання найбільш достовірної інформації було побудоване філогенетичне дерево, яке поєднує дані про всі досліджувані ферменти (рис. 2).

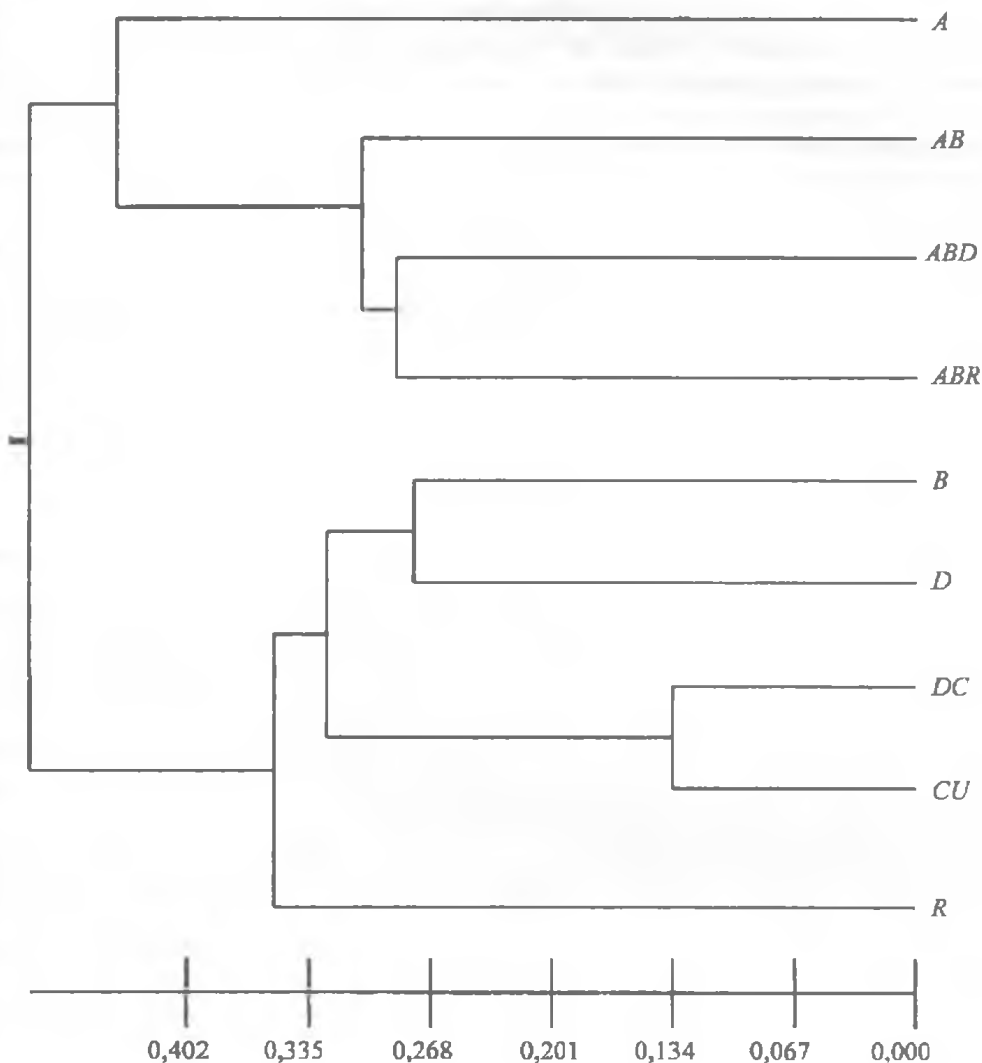


Рис. 2. Філогенетичні зв'язки між геномами злаків за аналізом множинних форм оксидоредуктаз і естераз (на осі абсцис — генетична дистанція в умовних одиницях)

На цьому дереві всі носії геному А об'єднані в один кластер. Видно, що першим від гілки "А" відділилася тетраплоїдна пшениця (AABB), а вже потім гексаплоїдні пшениці (AABBDD) і тритикале (AABBRR). Цікаво, що тритикале потрапило в один кластер з пшеницями. Це підтверджує висновок про домінуючий вплив геному А за поєднання з іншими геномами злаків. Геноми В і D є спорідненими та входять в один кластер з носіями геномів DC і CU. Окрему, але близьку до геномів DC і CU гілку утворює жито (RR). Таке генеалогічне дерево добре узгоджується з генеалогіями, які створено на інших засадах і є загальноприйнятими у даний час [1, 2, 5].

Порівняльний аналіз спектрів множинних форм ферментів дозволяє з'ясовувати не тільки філогенетичні взаємовідношення, але й експресивність окремих генів та їх взаємодію за поліплоїдизації. Це питання є темою окремої роботи. Зазначимо лише, що експресивність генів у складеному геномі не має спрощеного, адитивного характеру і що можливі різні варіанти прояву експресивності генів у порівнянні з батьківськими формами: незмінність прояву, підсилення або зменшення рівня експресії та виникнення нових генних продуктів.

Таким чином, встановлено, що електрофоретичні спектри оксидоредуктаз і естераз у досліджуваних злаків мають певні особливості і окремі множинні форми цих ферментів та їх визначені комбінації можуть слугувати маркерами відповідних геномів. Аналіз множинних форм оксидоредуктаз і естераз можна використовувати для з'ясування філогенетичних взаємовідношень між видами.

Література

1. *Цитогенетика пшеницы и ее гибридов* / Под ред. П. М. Жуковского и В. В. Хвостовой / — М.: Наука, 1971. — 288 с.
2. *Дорофеев В. Ф., Якубцинер М. М., Руденко М. И. и др. Пшеницы мира* / Под ред. Д. Д. Брежнева / — Л.: Колос (Ленингр. отд-ние), 1976. — 487 с.
3. *Конярев В. Г. Белки растений как генетические маркеры*. — М.: Колос, 1983. — 320 с.
4. *Зеленин А. В., Бадаева Е. Д., Бадаев Н. С. Хромосомный анализ злаков, теоретические и прикладные аспекты* // Генетика. — 1987. — Т. 23, № 10. — С. 1749—1761.
5. *Nicolas P., Cours de Genetique moleculaire vegetale. Maitrise de Biologie Cellulaire et Physiologie, Mention Genetique Moleculaire et Cellulaire et Physiologie, option Physiologie Vegetale, l'annee 2001/2002. Universite Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II.*
6. *Райдер К., Тейлор К. Изоферменты*. — М.: Мир, 1983. — 106 с.
7. *Левитес Е. В. Генетика изоферментов растений*. — Новосибирск: Наука, 1986. — 144 с.
8. *Глазко В. И., Созинов И. А. Генетика изоферментов животных и растений*. — Киев: Урожай, 1993. — 528 с.
9. *Wolf G., Lerch D. Genome analysis in the triticeae using isoenzymes of phosphodiesterase* // Wheat inform. Serv. — 1974. — N 38. — P. 17—19.
10. *Яска В. Э. Алкогольдегидрогеназа полиплоидных пшениц и их диплоидных сородичей. К филогенезу тетраплоидной пшеницы* // Генетика. — 1976. — Т. 12, № 11. — С. 82—88.
11. *Aurian P., Autran J. C., Charbonier L. et al. Variabilite genetique de la composition des gliadanes, glutenines, β -amylases, α -esterases, peroxydases et phosphotases acides du ble (*T.aestivum*)* // Ann. Amelior. Plantes. — 1976. — V. 26, N 1. — P. 51—66.

12. Jaaska V. V. Aspartat aminotransferase and alcohol dehydrogenase isoenzymes: intraspecific differentiation in *Aegilops tauschii* and origin of the D-genome polyploids in the wheat group // Plant syst. Evol. — 1981. — V. 137. — P. 259—273.
13. Топтиков В. А., Мирось С. Л., Дьяченко Л. Ф. и др. Сопряженность устойчивости озимых мягких пшениц к *Fusarium graminearum* Schwabe и множественных молекулярных форм некоторых ферментов // Цитология и генетика. — 2002. — Т. 36, № 3. — С. 3—11.
14. Davies B. I. Disk-electrophoresis. 2. Method and application to human serum protein // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1964. — V. 121, N 2. — P. 404—427.
15. Сафонов В. И., Сафонова М. Р. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле // Биохимические методы в физиологии растений. — М.: Наука, 1971. — 113 с.
16. Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. — М.: Мир, 1982. — 448 с.
17. Бернстон М. Гистохимия ферментов. — М.: Мир, 1965. — 455 с.
18. Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П. и др. Методы биохимического исследования растений. — Л.: Агропромиздат, 1987. — 430 с.
19. Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и др. Генетика изоферментов. — М.: Наука, 1977. — 275 с.
20. Календарь Р. Н. Компьютерные программы для построения эволюционных деревьев на основе электрофореграмм ДНК и белков // Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений: Материалы конф. — Киев, 1994. — С. 25—26.
21. Teoh S. B., Hutchinson J. Interspecific variation in C-banded chromosomes of diploid *Aegilops* species // Theor. Appl. Genet. — 1983. — V. 65, N 2. — P. 31—40.
22. Тоцкий В. М. Генетика: Підручник. — Одеса: Астропринт, 2002. — 712 с.
23. Гордей И. А. Тритикале: Генетические основы создания. — Минск: Навука і тэхніка, 1992. — 287 с.

В. А. Топтиков, Л. Ф. Дьяченко, В. Н. Тоцкий, Ю. В. Седлецкая

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, кафедра генетики и молекулярной биологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина, E-mail: caphgen_onu@mail.ru.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ГЕНОМОВ ПШЕНИЦ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА МНОЖЕСТВЕННЫХ ФОРМ ФЕРМЕНТОВ

Резюме

Проанализированы электрофореграммы множественных форм некоторых оксидоредуктаз и эстераз у разных пшениц и их родственников (всего 21 вид). Установлена геномная специфичность множественных форм исследованных ферментов. На основе анализа электрофоретических спектров ферментов построена дендрограмма, которая показывает филогенетические взаимоотношения между геномами злаковых. Сделан вывод о доминирующем влиянии генома А при объединении с другими геномами злаковых.

Ключевые слова: множественные формы ферментов, оксидоредуктазы, эстеразы, пшеница, филогения

V. A. Toptikov, L. F. Diachenko, V. N. Totsky, Ju. V. Sedletska

Odessa National University, Department of Genetic and Molecular Biology,
Dvoryanskaya str., 2, Odessa, 65026, Ukraine, E-mail: caphgen_onu@mail.ru.

PHYLOGENETIC RELATIONS OF WHEAT GENOMES AS A RESULT OF MULTIPLE ENZYME FORMS ANALYSIS

Summary

The electrophoregrammes of some oxydoreductases and esterases in different wheats and their relatives were analyzed (21 species in total). The electrophoretic spectra investigated enzymes had genomic specificity. The dendrogramme of phylogenetic Poacea genomes relations was built on the base of electrophoretic spectra. The dominate influence of genome A in complex wheat genome was shown.

Keywords: multipleenzymes forms, oxydoreductases, esterases, wheat, phylogenetic relations.