

УДК: 547.963.3

М.А. ПАРСАДЯН, Л.А. МИНАСБЕКЯН, П.О. ВАРДЕВАНЯН

ИССЛЕДОВАНИЕ СТЕПЕНИ ГОМОЛОГИИ ДНК НЕКОТОРЫХ ЗЛАКОВЫХ

Проведено исследование пшениц, различающихся по плоидности и по геномным формулам. У исследованных сортов имеется общая часть генома AABB, о чем свидетельствует достаточно высокая степень гомологии (56% и выше). Наиболее низкая степень гомологии отмечается у тетраплоидной полбы. Предполагается, что источник общей части генома AABB полбы и современных гексаплоидных пшениц общий. Эти данные находятся в хорошем соответствии с ранее проведенными исследованиями этих же злаковых.

Одной из актуальных задач генетики пшениц является разработка эффективных методов идентификации ее геномов и геномного анализа амфидиплоидов. В этой связи исследование степени гомологии и особенностей строения геномов пшениц и ее ближайших сородичей имеет важное значение.

Ранее были проведены исследования кинетики реассоциации ДНК и термальной стабильности фракций уникальных последовательностей (*уп*) и повторяющихся последовательностей (*пл*) у ряда представителей пшеницы и ее сородичей [1–3] и выявлены внутри- и межвидовые их различия [4], которые наиболее ярко выражены для тетраплоидной полбы с геномной формулой AABB. В работе [5] по изучению молекулярного полиморфизма гибридизацией ДНК показано, что популяции в пределах одного вида могут генетически различаться не менее, чем виды этого рода. Также отмечена высокая разрешающая способность метода молекулярной гибридизации, позволяющего сравнивать ДНК, выделенные из различных источников [6, 7].

В настоящее время усилия многих исследователей направлены на изучение молекулярных механизмов, регулирующих взаимоотношение растений с патогенами и стрессовыми факторами среды. Идентификация генов, регулируемых онтогенетическим развитием, могла бы способствовать лучшему пониманию биохимических процессов и механизмов онтогенетического развития в целом [8].

Подобный, принципиально отличающийся от традиционных молекулярно-биологических методов подход, основанный на обнаружении специфических последовательностей нуклеиновых кислот в геноме, в ряде случаев дает возможность иметь информацию, которую получить традиционными методами не представляется возможным. Так, в работе [9] показано, что методом ДНК-ДНК-гибридизации с использованием специфических зондов к гену, детерминирующему синтез дифтерийного токсина и его фрагментов,

можно обнаружить штаммы коринебактерий, имеющие последовательность тох-гена или его фрагментов в составе хромосомной ДНК. Полученная информация может быть полезна для выявления так называемых потенциально вирулентных микроорганизмов, гены вирулентности которых присутствуют, но по каким-либо причинам не выражаются фенотипически. Ранее нами показано [6], что этот метод может быть эффективно применен для выявления сходства геномов также и у азотфиксирующих бактерий.

Цель настоящих исследований – выявление филогенетического родства по степени гомологии ДНК:ДНК между пшеницами разных сортов внутри вида и между видами.

Материалы и методы исследования.

Выделение ДНК. Препараты ДНК получали из сухих эмбрионов пшеницы *Triticum aestivum* L. (с геномной формулой AABBDD) сортов Безостая-1, Армянка-60 и Воскеаск, а также *Triticale* сорта Сис-1 (с геномной формулой AABBRR) и полбы *Triticum dicossum* сорта Аршалуйс (с формулой генома AABB). Эмбрионы из семян злаков изолировали по методу, описанному в [4]. ДНК из сухих эмбрионов семян, предварительно измельченных в ступке, получали согласно методике, описанной в [4], в буфере, содержащем 0.15 M NaCl и 0.1 M Трис-HCl. Депротенинизацию проводили смесью хлороформ – изоамил (24:1) с последующей обработкой раствора рибонуклеазой, диастазой и проназой [4]. Дальнейшую очистку препарата проводили в NaCl и SDS.

Чистоту полученных препаратов проверяли спектрофотометрически, соответствующие оптические параметры удовлетворяли условиям, приведенным в [10].

Термическая денатурация молекул ДНК. Термическую денатурацию ДНК проводили на спектрофотометре SP-8-100 Pye Unicam (Англия) при концентрациях 20–30 мкг/мл в 0.1×SSC в кварцевых кюветах, герметически закрытых тefлоновыми пробками. Нагревание осуществлялось с помощью температурного программного устройства с линейной скоростью нарастания 0.25 град/м. Регистрацию изменения величин поглощения проводили на программируемом устройстве HP-97S I/O. Из полученных значений поглощения вычисляли значения степени деспирализации 1– θ и строили интегральные кривые плавления, а также определяли температуру плавления ДНК [4]. По площадям под полученными интегральными кривыми вычисляли нуклеотидное содержание [11].

Степень ренатурации и гомологии ДНК. Для исследования кинетики реассоциации были использованы препараты ДНК, большая часть повторяющихся последовательностей которых была удалена, а оставшиеся – уникальные – предполагалось сопоставить. Если в одном растворе смешать одонитевые ДНК двух разных организмов и инкубировать их при 60°C, то гибридные дуплексы будут образовываться только из тех последовательностей нуклеотидов, между которыми имеется гомология, т.е. из участков ДНК, унаследованных от общего предка этих двух видов. Растворы ДНК в 0.1×SSC в течение 15 мин. дегазировали, после чего обрабатывали ультразвуком в трубчатом излучателе ультразвукового дезинтегратора УЗДН-1 (СССР) в течение 10 мин. (частота 22 кГц, 2.5 Вт/см²), концентрация ДНК составляла 1 мкг/мл. Степень ренатурации и гомологии ДНК определяли на спектрофотометре Pye Unicam. Раствор гуанина с $A_{260}=2.0$ использовали в течение всего эксперимента как маркер, позволяющий корректировать воз-

можные искажения. Регистрация проводилась при оптимальной температуре ренатурации, вычисляемой из уравнения

$$T=0.51\%(G-C) + 47.0.$$

Точная концентрация ДНК двух типов определялась химически и приводилась к одинаковым весовым величинам 75–80 мкг/мл в 0.1×SSC. Препараты ДНК обоих типов фрагментировали, как описано выше. Третий образец содержал равные объемы ДНК I и II типов. Образцы денатурировали в кипящей бане и быстро заливали в предварительно прогретые кюветы. Регистрация длилась 30–40 мин. с интервалом в 15 сек. Изменение поглощения возрастало линейно через несколько минут. Степень гомологии вычислялась по формуле, предложенной Де Леем с соавторами [12].

Опыты проводили в четырехкратной биологической повторности. Ниже приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

Результаты и их обсуждение. Ранее нами было выявлено, что ДНК сухих эмбрионов различных сортов пшениц различаются по температурам плавления и профилям кривых плавления в зависимости от формулы генома [3], причем при прорастании эти параметры претерпевают изменения [4]. Также показано, что они различаются по количеству повторяющихся фракций генома, ответственных за различные функции в генетической системе [13].

Геном злаковых является удобной моделью для генетических исследований, так как злаки составляют огромное семейство, члены которого различаются между собой как по геномным формулам, так и по ploидности, и это придает им еще больший интерес по сравнению с другими представителями высших растений.

Злаки, как и все высшие растения, способны синтезировать определенное количество различных соединений и реагировать на условия выращивания, и по этим показателям они варьируют в пределах вида. Выявление различий между геномами может быть полезным в решении различных вопросов систематики растений.

Температура плавления и нуклеотидное содержание ДНК злаковых

Источник ДНК	Формула генома	Темпер.пл. ДНК, °С, T_m	Нуклеотидное содержание (ГЦ мол.%)
Безостая-1	AABBDD	73.7±0.2	49.0±0.2
Армянка-60	AABBDD	72.3±0.2	46.0±0.1
Воскеаск	AABBDD	73.0±0.3	47.1±0.3
Сис-1	AABBRR	72.8±0.1	47.0±0.2
Арпи	AABB	74.3±0.2	50.1±0.1

В таблице приведены данные некоторых параметров, характеризующих геномы различных сортов пшениц, на рисунках 1 и 2 – степени гомологии их ДНК, определенных методом молекулярной гибридизации фрагментированной ДНК относительно ДНК полбы и пшеницы сорта Безостая-1. Как видно, наиболее высокая степень гомологии обнаруживается между сортами гек-

саплоидных пшениц. Так, в работе [14] были выявлены предки культивируемых диплоидных, культурных гексаплоидных пшениц и диких тетраплоидных видов. Таким прародителем для исследованных нами пшениц является полба, т.к. у всех исследованных злаков имеется общая часть генома AABB. Многими исследователями делались попытки вскрыть различия между геномами рода *Triticum* с помощью определения последовательности нуклеотидов ДНК. Были показаны различия между ядерным содержанием ДНК пшеницы и ржи, что указывает на более тесное родство между видом *Aegilops squarrosa* и родом *Triticum*, чем между *Triticum* и *Secale*. Сходство последовательностей нуклеотидов ДНК у ржи и пшеницы, а также у ржи, ячменя и овса подтверждает предположение, что рожь – наиболее древний род, давший начало родам овса, пшеницы и ячменя.

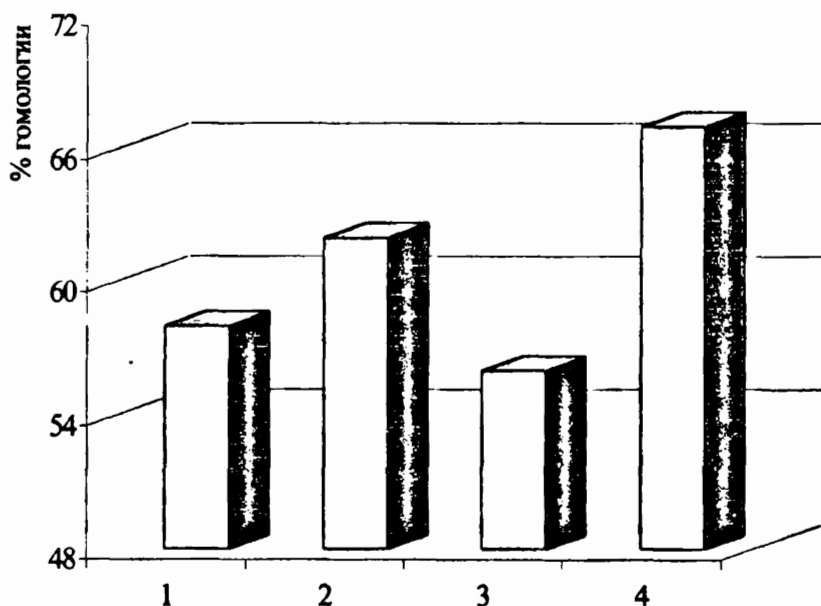


Рис.1. Гомология ДНК (% по отношению к Арпи) сортов: 1– Безостая-1 (AABBDD), 2 – Армянка-60 (AABBDD), 3 – Воскеас (AABBDD), 4 – Сис-1(AABBRR).

Суть использованного нами подхода заключается в определении гомологии между ДНК видов, представляющих основные группы современных злаков: тритикале (AABBRR), твердой (AABB) и мягкой пшеницами (AABBDD). Более низкая гомология наблюдается при сравнении полбы и пшеницы сорта Воскеас, о чем свидетельствуют также и кривые реассоциации ДНК последних. Относительно высокая степень гомологии между гексаплоидными пшеницами, имеющими схожие геномные формулы, подтверждает предположение об их общем происхождении. В работе [15] показано, что фракции повторяющихся последовательностей нуклеотидов увеличиваются с увеличением пloidности. Это согласуется с данными, полученными нами ранее [3], и объясняет различие между степенями гомологии гексаплоидных пшениц (с формулой генома AABBDD) и тритикале (AABBRR) относительно тетраплоидной полбы (AABB), что показано на рис. 1. На рис.2 представлены различия в степени гомологии гексаплоидных

пшениц сортов Армянка-60 и Воскеаск (AABBDD), а также полбы (AABB) и тритикале (AABBRR) относительно гексаплоидной пшеницы сорта Безостая-1. Подобные различия в степени гомологии объясняются уже не плоидностью злаков, а количественными и качественными различиями между ними и источниками их происхождения (см. рис. 2).

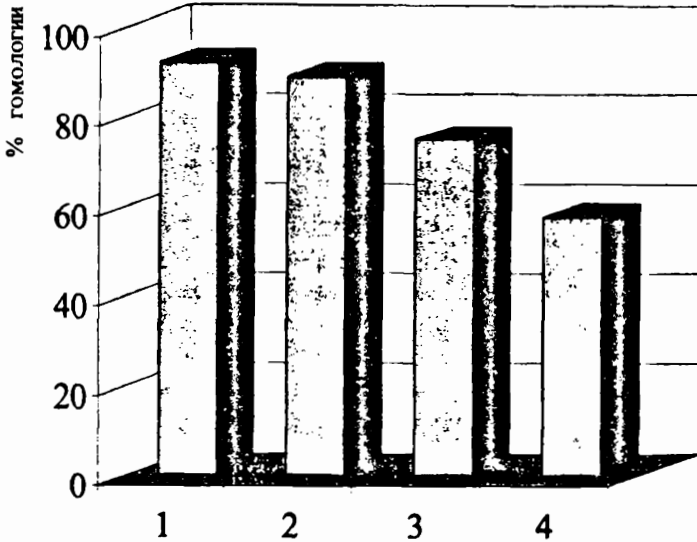


Рис.2. Гомология ДНК (% по отношению к Безостой-1) сортов: 1 – Армянка-60 (AABBDD), 2 – Воскеаск (AABBDD), 3 – Сис-1 (AABBRR), 4 – Арпи (AABB).

В геноме ржи RR не было обнаружено повторяющихся последовательностей [16], хотя имеются данные, что *rr* не являются балластом генома. Эта фракция генома полифункциональна; некоторая часть *rr*, возможно, связана с процессами видообразования. Именно по этой причине наблюдается такая резкая разница для двух гексаплоидных представителей злаковых, содержащих DD и RR геномы соответственно. Геном DD, хотя и считается самым коротким, однако в нем установлены наивысшая концентрация ДНК и соответственно все необходимые признаки, подавляющие ломкость стержня колоса и чешуи (фактор Q), а также повышенная зимостойкость соответствующих видов [17].

С использованием подобного подхода были оценены гигантские наборы генов птиц, что позволило сопоставить и количественно оценить генетические различия между современными видами. По такой оценке была воссоздана реальная последовательность ветвлений филогенетического древа. Путем соотношения выявленных генетических различий и шкалы времени было вычислено приблизительное время дивергенции дошедших до наших дней линий эволюционного развития. Кроме того, на основании изучения ДНК методом молекулярной гибридизации были установлены порядок ветвления и приблизительное время расхождения линий эволюционного развития [7].

По степени гибридизации, по-видимому, можно судить также о сложности генома. Как видно из сравнения гомологичности ДНК между сортами

Безостая-1 и Арпи, степень их родства наименьшая. При этом под сложностью генома по ДНК предполагается в первую очередь увеличение числа вариантов генов или генетических систем, а значит и увеличение размеров генома в целом. При этом усложнение геномов проходило без каких-либо существенных изменений в природе самого гена. Об этом свидетельствуют не $T_{пл}$, а профили дифференциальных кривых плавления, которые в пределах гексаплоидных пшениц схожи, но уже для гексаплоидного тритикале, как это показано в таблице, степень гомологии меняется [4]. Естественно, что наиболее отдалена от гексаплоидных пшениц тетраплоидная полба, геном которой наиболее упрощен, о чем свидетельствуют также и полученные данные по кинетике реассоциации ДНК.

Таким образом, степень гомологии исследованных злаковых, полученная методом молекулярной гибридизации, свидетельствует об имеющейся общности большей части их геномов, т.е. общей доле AABB в геноме, что доказывает общность происхождения пшениц и полбы. По сути, полба является культивированной двузернянкой *Tg.dicoccoides*. По-видимому, этим и объясняется достаточно высокая степень гомологии (до 58%) между двумя представителями различных видов. Получение новых сельскохозяйственных растений с улучшенными показателями – увеличением урожайности семян, повышенной устойчивостью к различным стрессовым факторам окружающей среды – актуально для сельского хозяйства. Для этой цели применение новых молекулярно-генетических методов и более глубокое понимание фундаментальных основ процессов, происходящих в ходе онтогенеза растений, необходимы для целенаправленного создания более ценных сельскохозяйственных растений.

Кафедра биофизики

Поступила 26.03.2001

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов А.С. – В кн.: Геном растений (п/р Сытника К.М.). 1988, с.285.
2. Гаевская Е.И., Махлаева Р.Ф. – Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. 1979, т.63, N3, с.86–96.
3. Минасбекян Л.А., Вардеванян П.О., Паносян Г.А. – Биол. науки, 1992, т.7, с.31.
4. Минасбекян Л.А., Парсаданян М.А., Паносян Г.А., Вардеванян П.О. – Физиология растений, 2000, т.47, N2, с.286–290.
5. Сиволап Ю.М., Чеботарь С.В., Топчиева Е.А., Корзун В.Н., Тощкий В.Н. – Генетика, 1999, т.35, N2, с.1165–1673.
6. Вардеванян П.О., Минасбекян Л.А., Парсаданян М.А. – Мол.генетика, 2000, N1, с.27–30.
7. Sibley Ch.G., Monroe V.J. – A Supplement to distribution and Taxonomy of Birds of the World, New Haven: Yale University Press, 1993.
8. Курочкина С.Д., Картель Н.А. – Мол. генетика, 1998, N4, с.3–12.
9. Михайлович В.М., Зайкин В.А., Мазурова И.К. - Мол. генетика, 1994, N6, с.27–29.
10. Marmure J. – J.Mol.Biology, 1961, v.3, p.208–218.
11. Вардеванян П.О., Карапетян А.Т., Терзикян Г.А., Вардапетян Р.Р., Даниелян Э.А. – Биополимеры и клетка, 1990, т.6, N4, с.48–51.
12. De Ley J., Carroit H., Keynaerts A. – Eur.J.Biochem., 1970, N 12, p.133–142.
13. Bendich A.G., McCarthy V.J. – Genetics, 1970, v.65, p.545–565.
14. Dvorak J. - Genome, 1988, v.30, p.680–689.
15. Mitra R., Bhatia R. - Heredity, 1973, v.91, N 21, p.251–262.
16. Dover J.A., Flavell R.R. - Genome Evolution, London, Acad.Press, 1982, p. 239–262.
17. Я.Лелли - В кн. Селекция пшениц, М, 1980, с.38.

ՈՐՈՇ ՑՈՐԵՆԱԶԳԻՆԵՐԻ ՀՈՄՈԼՈԳԻԱՅԻ ԱՍՏԻՃԱՆԻ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա մ փ ո փ ո մ

Հետազոտված են պլոիդությանը և գենոմի բանաձևով տարբերվող ցորենազգիներ: Առկա է ուսումնասիրված սորտերի գենոմի ընդհանուր մասը (AABB), որի մասին վկայում է հոմոլոգիայի բավականին մեծ աստիճանը (56% և ավելի): Ընդ որում, հոմոլոգիայի ամենավերջը աստիճանը նկատվում է տետրապլոիդ հաճարի դեպքում: Ենթադրվում է, որ AABB գենոմի աղբյուրը հաճարի և ժամանակակից հեքսապլոիդ ցորենազգիների համար նույնն է: Այդ տվյալները լավ համապատասխանության մեջ են վերը նշված հացազգիներին վերաբերող ավելի վաղ հետազոտությունների արդյունքների հետ:

M.A.PARSADANYAN, L.A.MINASBEKYAN, P.O.VARDEVANYAN

THE INVESTIGATION OF LEVEL OF HOMOLOGY
OF SOME CEREAL'S DNA

Summary

The cereals distinguished on ploidy and genome formulae have been studied. Since investigated sorts have common part (AABB), the high level of homology was observed (56% and higher). The lowest level of homology obtained for tetraploid polba. It is assumed that the sources of AABB genome of polba as well as modern hexaploid wheat are common. These data are in good consideration with our recent investigations of the same cereals.