

УДК 633.11:575.222.73:57.017.3

СПЕКТРИ ЕСТЕРАЗИ І МОРФОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ АДАПТИВНОСТІ У СКЛАДНИХ ГІБРИДІВ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

О. Л. Січняк*, М. М. Чумак*, І. В. Фесенко**

***Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова**

***Одеський державний аграрний університет**

Електрофретичний поділ естераз першого етильованого листка виявив від 5 до 9 смуг різної інтенсивності з відносною рухливістю 0,01–0,52. Смуги найбільш рухливих фракцій відповідають окремим ізоформам. Смуги менш рухливих фракцій утворені спільно мігруючими ізоформами. Виявлені відмінності по спектру естерази як між групами гібридів, так і між родинами, що належать до одної групи. Морфо-структурний аналіз виявив найбільший рівень адаптивності в родині 37 з генерації BC_2I_2 х Альбатрос одеський, F_5 , що мала потужний блок з Kf 0,08, забарвлений сильніше, ніж в інших родинах.

Проблема віддаленої гібридизації привернула увагу селекціонерів понад 100 років тому [17]. З цих робіт виросла нова синтетична культура – тритикале, яка, незважаючи на успіхи, не склала суттєвої конкуренції батьківським культурам. Разом з тим роботи у даному напрямку привели до розуміння необхідності залучення інтрогресивної гібридизації для покращання пшениці. Тривалий час основна увага зосереджувалася на цитогенетичній стабільності створюваних форм, але згодом з'ясувалося, що мінливість по цитологічній стабільності та фертильності рослин незалежні. Часто рослини з кращим в ліній мейозом виявлялися малопродуктивними чи навіть стерильними, а рослини з показниками мейозу на рівні середнього чи нижче середнього в лінії виявлялися кращими по продуктивності [8]. Можливо, що відповідальним за це був різний рівень генетичної коадаптації окремих генотипів, а цитологічна

нестабільність лише приводила до виникнення сполучень генів з різним рівнем коадаптації.

Тому актуальним завданням для вивчення інтрогресивних гібридів пшениці є дослідження загальної адаптивності створюваних форм, за якою можна судити про рівень генетичної коадаптації у них. Але навіть експрес методи оцінки адаптивності вимагають тривалого часу і великих працевитрат. Ізозими є практичними генетико-біохімічними маркерами, зручними для оцінки генетичної мінливості в популяціях. Аналіз множинних молекулярних форм (ММФ) ферментів став важливим методом сучасної генетики. Зокрема, при інтрогресивній гібридизації як маркери широко використовуються естерази [13].

Метою даної роботи є вивчення генетичної різноманітності у самозапилених нащадків родин складних гібридів пшениці за допомогою ММФ естерази і зіставлення отриманих результатів з даними по оцінці їх адаптивності, які отримані в польовому експерименті.

Матеріали та методи. В роботі використовували самозапилених нащадків родин складних пшенично-егілопсно-житніх гібридів [6] – генерації BC_2I_2 x Альбатрос одеський, F_5 , BC_2I_2 x Одеська 267, F_5 , BC_2I_7 і BC_3I_6 , а також жито.

Для екстракції ферментів використовували 7-денні етиольовані паростки. Електрофорез проводили в 10% поліакриламідному гелі [12]. Виявлення естерази проводили за методом Левитеса [3].

Польова оцінка проводилася у 2005/2006 рр. Для цього обрали складову метода оцінки адаптивності озимої пшениці [10], а саме гомеостатичність колоса (ГК) та пов'язані з нею ознаки: число колосків у колосі (ЧКК), озерність колоска (ОЗК) та масу 1000 зерен (МТЗ). Ці компоненти урожайності формуються в онтогенезі пізніше інших, мають короткий період розвитку, тому їх варіація набагато менше [9]. З іншого боку, вклад цих ознак в продуктивність колосу був найбільшим [5]. Статистичну обробку виконували з використанням критерію Стьюдента [4].

Результати і обговорення. Досліджений матеріал був гетерогенним за спектром естерази (рис.). Форми, які найбільш активно мігрували, забарвлювалися досить слабо і концентрувалися біля відмітки з R_f 0,37-0,39. У гібридної родини з участю пшениці Альбатрос одеський також зафіксована одна ізоформа з R_f 0,52. Інші гібриди такої ізоформи не мали.

Найбільш інтенсивно забарвленими та чисельними були ізоформи в інтервалі R_f від 0,14 до 0,23. Це найбільш мінлива ділянка як за кількістю смуг, так і за інтенсивністю їх забарвлення. Низка гібридних родин (BC_2I_2 x Альбатрос одеський, F_4 , родина 37; BC_2I_6 , родина 41; BC_2I_6 , родина 42; BC_2I_6 , родина 43) та жито мали ізоформи з більш слабким забарвленням в районі R_f 0,30-0,32.

Ізоформи, що мігрували повільно (R_f 0,01-0,08) мали проміжну інтенсивність забарвлення. Однак жито мало смугу з R_f 0,08, яка була забарвлена інтенсивніше, ніж у гібридів, за виключенням родини 37 (BC_2I_2 x Альбатрос одеський, F_4), котра тут мала міцний інтенсивно забарвлений блок.

При вивченні генетичної мінливості листових естераз у м'якої пшениці

методом горизонтального електрофорезу у крохмальному гелі у 16-денних паростків виявили три анодних зони активності (EST1, EST2, и EST3) і одну катодну (EST4). Ізозими 1, 2 і 3 належали до EST1, 4, 5 і 6 – до EST2, 7 і 8 – до EST3 і, нарешті, ізозим 9 належав до EST4 [16].

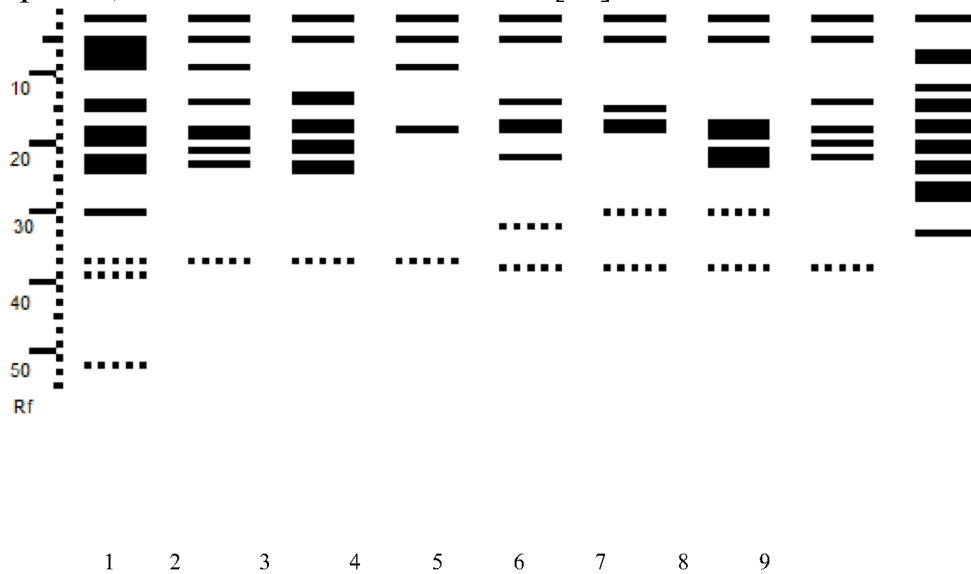


Рис. Спектри естераз у складних гібридів пшениці і жита (схема):

- | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 1. BC ₂ I ₂ x Альбатрос одеський, F ₄ , родина 37; | 6. BC ₂ I ₆ , родина 42; |
| 2. BC ₂ I ₂ x Одеська 267, F ₄ , родина 33; | 7. BC ₂ I ₆ , родина 43; |
| 3. BC ₂ I ₂ x Одеська 267, F ₄ , родина 27; | 8. BC ₃ I ₅ , родина 49; |
| 4. BC ₂ I ₂ x Одеська 267, F ₄ , родина 31; | 9. Жито Харківське 60. |
| 5. BC ₂ I ₆ , родина 41; | |

Виявлені в нашому дослідженні фракції з великою вірогідністю можна співвіднести з зазначеними анодними зонами Est 1, Est 2 и Est 3. Їм, ймовірно, відповідають фракції з Rf 0,37-0,39 (Est 1), 0,14-0,23 (Est 2) і 0,01-0,08 (Est 3). Що стосується ММФ з Rf 0,30-0,32 и 0,52, то важко судити про їх належність. Фракцію з Rf 0,30-0,32 можна віднести як до 1, так і до 2 зони, хоча на користь 1-ї свідчить інтенсивність забарвлення смуг. Ізоформа з Rf 0,52 може бути віднесена до 1-ї зони. Однак, зважаючи на те, що субодиниці естерази пшениці є мономерами або димерами [Jaaska, 1980] не виключено, що фракція Rf 0,52, яку спостерігали лише у родини 37 (BC₂I₂ x Альбатрос одеський, F₄) є мономером, який утворився внаслідок дисоціації однієї з ізоформ Est 1.

Хоча використаний нами метод не дозволив здійснити більш тонке розділення ізоформ листової естерази, ми виявили відмінності по кількості смуг та по інтенсивності їх забарвлення, особливо в зоні з Rf 0,14-0,23, як між родинами, отриманими за різними схемами схрещування, так и між родинами всередині одного типу схрещування. Так, в родинях 27, 31 і 33 (BC₂I₂ x Одеська 267, F₄) відмічені наступні відмінності: у родини 31 є одна помірно виражена смуга з Rf 0,18, у родини 27 спостерігалося 4 інтенсивно забарвлені смуги, однак була відсутня фракція з Rf 0,08, котру мали дві інші родини цієї групи. Спектри естерази в родинях 41-43 (BC₂I₆) та 49 (BC₃I₅) також різнилися переважно за фракціями з Rf 0,14-0,23.

Враховуючи наявність (відсутність) ізоформ, які разом мігрують, що відображається на інтенсивності забарвлення смуг, можна зробити висновок, що

досліджені родини відрізняються за набором генів, які детермінують естеразу. Ці відмінності обумовлені різноякісними хромосомними наборами, які сформувалися внаслідок гібридизації та наступного самозапилення як наслідок перекомбінації хромосом різних сортів пшениці, заміщення або доповнення хромосомами жита чи егілопсу, а також в результаті транслокацій між гомологічними хромосомами пшениці та жита або егілопсу. На користь цього свідчить співставлення спектрів естерази жита та родин 27, 37 і 43. Зокрема, родина 37 має інтенсивно забарвлену смугу. В цій же зоні жито має, хоча і менш інтенсивно забарвлену, однак більш потужну, ніж у гібридів, смугу. У варіабельній зоні (Rf 0,14-0,23) жито має одну помірно та 4 інтенсивно забарвлені смуги. Родина 27 в цій зоні має 4 інтенсивно забарвлені смуги, родина 37 – три таких смуги, але 2 з них більш потужні, а у родини 43 – 2 смуги і обидві більш потужні, ніж у жита.

З'ясовано [15], що на хромосомах/плечах 2HL *Hordeum vulgare*, 2RL *Secale cereale*, 2R^m *S. montanum*, 2U *Aegilops umbellulata*, 2E *Agropyron elongatum* и 2V *Dasyphyrum villosa* є локуси, гомеологічні локусу *Est-7* м'якої пшениці. Наявність таких гомеологічних локусів та результати вивчення мейозу, свідчать про наявність обмінів між хромосомами, які відносяться до різних геномів, у беккросних нащадків егілопсно-житньо-пшеничних гібридів [6], роблять припущення про інтеграцію генів жита в геномі складних гібридів досить імовірним.

Результати морфоструктурного аналізу досліджених гібридів наведені в Таблиці 1. Гомеостатичність колоса в різних родинях мала три рівня градації: 156,7 в родині 37; 105,0–109,1 в родинях 27, 31, 33, 41 і 42; 70 і менше в родинях 43 і 49.

Таблиця. Результати морфо-структурного аналізу складних гібридів пшениці

Генерація, родина	Головний колос			Маса 1000 зерен, г
	гомеостатичність	число колосків	озерненість	
BC ₂ I ₂ x Альбатрос одеський, F ₅ , родина 37	156,7	14,2±0,3	1,6±0,2	43,0±0,8
BC ₂ I ₂ x Одеська 267, F ₅ , родина 33	109,1	14,3±0,6	1,2±0,1	30,6±0,2
BC ₂ I ₂ x Одеська 267, F ₅ , родина 27	105,0	14,4±0,6	1,3±0,1	30,0±0,2
BC ₂ I ₂ x Одеська 267, F ₅ , родина 31	106,5	14,0±0,6	1,1±0,1	31,2±0,2
BC ₂ I ₇ , родина 41	105,8	14,4±0,6	1,2±0,1	32,0±0,3
BC ₂ I ₇ , родина 42	108,4	14,2±0,6	1,3±0,1	30,8±0,3
BC ₂ I ₇ , родина 43	61,4	14,6±1,1	1,0±0,1	20,5±0,7
BC ₃ I ₆ , родина 49	70,0	15,6±1,1	1,1±0,1	22,3±0,3

Кількість колосків в колосі достовірно не відрізнялася ні між родинями, ні між генераціями. Відмінностей між родинями виявити не вдалося через сильну мінливість ознаки. Її середнє квадратичне відхилення складало 0,95-3,48.

Озерненість колоска була низкою, у межах 1,0–1,6 зернівок на колосок. Для ярої пшениці цей показник складав 1,3–1,8 [11]. Однак, незважаючи на загальне зниження величини ознаки, мінливість її була відносно невисокою і нам вдалося виявити достовірні відмінності між окремими родинами, що відносяться до різних генерацій. Так, в родині 37 з генерації BC_2I_2 x Альбатрос одеський, F_5 озерненість колоска була достовірно вище ($P < 0,05$), ніж в родині 31 (з генерації BC_2I_2 x Одеська 267, F_5), 43 (BC_2I_7) і 49 (BC_3I_6). Між родинами в межах однієї генерації достовірних відмінностей виявити не вдалося.

Маса 1000 зерен була дуже мінливою. Достовірні відмінності ($P < 0,001$) виявлені як між родинами з різних генерацій, так і між родинами однієї генерації. Звертає на себе увагу, що найбільша маса 1000 зерен була в родині 37, яка до того ж мала найбільшу озерненість колоска та гомеостатичність колоса. Враховуючи, що збільшення маси 1000 зерен відбулося не за рахунок зменшення озерненості колоска, а навпаки, на фоні її росту, можна зробити висновок, що родина 37 з генерації BC_2I_2 x Альбатрос одеський, F_5 мала більш високу адаптивність, ніж інші. Ймовірно, залучення до гібридизації сорту Альбатрос одеський суттєво вплинуло на підвищення адаптивності складних гібридів.

Морфо-структурний аналіз показав, що найбільший рівень адаптивності мала родина 37 з генерації BC_2I_2 x Альбатрос одеський, F_5 . Вона ж мала потужну смугу з Rf 0,08, забарвлену інтенсивніше, ніж у інших гібридів та жита. Не можна впевнено стверджувати, що ця особливість ізозимного спектру даної родини безпосередньо пов'язана з її більш високим рівнем адаптивності, однак є ряд фактів, що дозволяють припустити наявність такої зв'язку. Так, показано, що жаростійкість томатів корелное з певним спектром естераз у пилку [1]. Повідомляється про успішне використання змін спектрів естерази в паростках для диференціації генотипів твердої пшениці по посухостійкості [7]. Роль естерази проявляється і в онтогенетичній регуляції організмів. Виявлений зв'язок між функціонуванням генів системи *Vrn*, які визначають проходження етапів онтогенезу у пшениці, з властивостями ММФ фосфодіестерази цАМФ [2].

Висновки

1. При електрофоретичному розподілі естераз першого етильованого листка різних родин складних гібридів м'якої пшениці виявлено від 5 до 9 смуг різної інтенсивності з відносною рухомістю 0,01 – 0,52.
2. Кожна зі смуг найбільш рухомої фракції відповідає одній ізоформі. Смуги менш рухомих фракцій утворені лізоформами, що мігрують разом.
3. Виявлені відмінності по спектру естерази як між групами складних гібридів, так і між родинами, що відносяться до однієї групи.
4. Морфо-структурний аналіз показав, що найбільший рівень адаптивності був у родині 37 з генерації BC_2I_2 x Альбатрос одеський, F_5 . Ця родина мала потужну смугу з Rf 0,08, забарвлену сильніше, ніж у інших гібридів.

Література

1. Жученко А.А. Роль генетической инженерии в адаптивной системе селекции растений (мифы и реалии) // С.-х. биология. – 2003. – №1. – С. 3-28
2. Кокшарова Т.А., Агамалова С.Р., Феденко Е.П. Генетические основы адаптивного

- полиморфизма у *Triticum aestivum* L. // Матер. науч. генетич. конф., посв. 100-летию со дня рожд. А.Р. Жебрака и 70-летию образов. каф. генет. в МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, 26-27 февр., 2002. М.: 2002. – С. 166-167.
3. Левитес Е. В. Генетика изоферментов растений. – Новосибирск: Наука, 1986. – 144 с.
 4. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Вышэйшая школа, 1973. – 320 с.
 5. Симоненко В.К., Хангильдин В.В., Власенко В.А. Влияние генома сорта на адаптивные особенности аллоплазматических линий озимой пшеницы // Цитология и генетика. – 2000. – Т.34, №3. – С.21-27.
 6. Січняк О.Л., Симоненко В.К. Використання егілопсно-житнього амфідиплоїду для передачі в пшеницю чужорідного генетичного матеріалу // Агроекологія і біотехнологія. Зб. наук. праць. Вип. 2. – Київ: Ін-т агроекології і біотехнології УААН, 1998. – С.179-183.
 7. Тучин С.В., Итальянская Ю.В., Киреева В.В. Полиморфная система фермента эстеразы как генетический маркер пшеницы на засухоустойчивость // Матер. науч. генетич. конф., посв. 100-летию со дня рожд. А.Р. Жебрака и 70-летию образов. каф. генет. в МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, 26-27 февр., 2002. М.: 2002. – С. 324-326.
 8. Федорова Т.Н. Первичные октоплоидные тритикале, стабильность мейоза и селекция // Генетика. – 1982. – Т. 18, № 4. – С. 652-660.
 9. Хангильдин В.В., Бирюков С.В. Проблема гомеостаза в генетико-селекционных исследованиях // Генет.-цитол. аспекты селекц. с.х. раст. / Сб. научн. тр. – Одесса: ВСГИ, 1984. – С.67-76.
 10. Хангильдин В.В., Хейфец А.М. Экспресс-метод расчета адаптивности сортов озимой пшеницы // НТБ селекційно-генетичного інст. – 1992. – №1(81). – С.18-21.
 11. Черный И.В., Черная М.А. Использование биометрических методов в селекции яровой пшеницы // Характеристика генома некоторых видов сельскохозяйственных растений. – Новосибирск: СО АН СССР, 1990. – С.211-229.
 12. Davis B.I. Disk-electrophoresis. 2. Method and application to human serum protein // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1964. – V. 121. – P. 404-427.
 13. Dudnikov A.Ju. Chromosomal location of an esterase gene set (*Est-10*) of common wheat orthologous to *Est5* of *Aegilops tauschii* // Cereal Res. Commun. – 2001. – V. 29, № 1-2. – P. 57-60.
 14. Jaaska V. Electrophoretic survey of seedling esterases in wheats in relation to their phyto-geny // Theor. and Appl. Genet. – 1980. – V. 56, № 6 – P. 273-284.
 15. Liu C.J., Gale M.D. Est-7, a set of genes controlling green tissue esterases in wheat and related species // Theor. and Appl. Genet. – 1990. – V. 79, № 6. – P. 781-784.
 16. Rebordinos L., Perez de la Vega M. Extent of genetic variability of endosperm esterases in *Triticum aestivum* L. 2n = 6x = 42 // Theor. and Appl. Genet. – 1989. – V. 78, №5. – P. 728-734.
 17. Rimpau W. Kreuzungsprodukte landwirtschaftlicher kulturpflanzen // Landwirthsch. Jahrbucher. – 1891. Bd. 20. – S. 335–371.

Електрофоретическе роздїлення естераз першого етіолозованого листа виявило от 5 до 9 полос различной интенсивности с относительной подвижностью 0,01–0,52. Полосы наиболее подвижных фракций отвечают отдельным изоформам. Полосы менее подвижных фракций образованы совместно мигрирующими изоформами. Обнаружены различия по спектру эстеразы как между группами гибридов, так и между семьями, относящимися к одной группе. Мсрфоструктурный анализ выявил наибольший уровень адаптивности у семьи 37 из генерации $BC_2I_2 \times$ Альбатрос одесский, F_3 , имевшей мощный блок с $I_{kf} 0,08$, окрашенный сильнее, чем в других семьях.

Electrophoretic division of esterases from etiolic leaf has revealed the first from 5 up to 9 strips of various intensity with relative mobility 0,01-0,52. Strips of the most mobile fractions answer to separate isofoms. Strips of less mobile fractions are formed in common migrating isofoms. Distinctions on an esterase spectrum both between groups of hybrids, and between the families concerning to one group are found out. The morpho-structure analysis has revealed the greatest level of adaptability at family 37 of generation BC₂I₂ x Albatross odessky, F₅, having the powerful block with Rf 0,08, painted more strongly, than in other families.