

На правах рукописи



ДУДНИКОВ
Александр Юрьевич

ГЕНЕТИКА ИЗОФЕРМЕНТОВ *AEGILOPS TAUSCHII*

Генетика - 03.00.15

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2005

Работа выполнена в лаборатории хромосомной инженерии злаков Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

Академик РАН
Шумный Владимир Константинович
Институт цитологии и генетики СО РАН,
г. Новосибирск

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Доктор биологических наук, профессор
Захаров Илья Кузьмич
Институт цитологии и генетики СО РАН,
г. Новосибирск

Доктор биологических наук, профессор
Высоцкая Людмила Васильевна,
Новосибирский государственный
университет, г. Новосибирск

ВЕДУЩЕЕ УЧРЕЖДЕНИЕ:

Центральный сибирский ботанический
сад СО РАН, г. Новосибирск

Защита диссертации состоится "30" ноября 2005 г. на 47-й заседании диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук (Д-003.011.01) в Институте цитологии и генетики СО РАН в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск-90, проспект академика Лаврентьева, 10, факс: (3832) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института цитологии и генетики СО РАН.

Автореферат разослан "14" октября 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

 А.Д. Груздев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Интерес к изучению генетики *Aegilops tauschii* Coss. связан прежде всего с тем, что геном этого диплоидного злака вошёл в состав генома мягкой пшеницы. Из диких родичей пшеницы, *Ae. tauschii* считается наиболее важным потенциальным видом-донором для переноса хозяйственно-ценных генов в мягкую пшеницу (Kimber, Feldman, 1987). В свою очередь, интерес к изучению ферментных генов у *Ae. tauschii* в значительной степени обусловлен тем, что результаты исследований, проведённых в Институте Эволюции (г. Хайфа, Израиль) на дикой пшенице *Triticum dicoccoides* и ячмене *Hordeum spontaneum*, свидетельствуют, что полиморфизм ферментных генов у этих видов имеет адаптивный характер (Nevo *et al.*, 1986a, b; Nevo, Beiles 1989; Nevo *et al.*, 1991), а исследования отдельных "модельных" ферментных генов у *Drosophila melanogaster* (Chambers, 1988; Eanes *et al.*, 1996), *Fundulus heteroclitus* (Powers *et al.*, 1991) и бабочек рода *Colias* (Watt, 1992) убедительно доказали, что аллельный полиморфизм этих генов попадает под действие естественного отбора.

Ранее у *Ae. tauschii* был описан аллельный полиморфизм нескольких генов, кодирующих такие ферменты, как эстераза (Nakai, 1978, 1979; Jaaska, 1980), глутаматоксалоацетаттрансаминаза, алкогольдегидрогеназа (Jaaska, 1981), α -амилаза (Nishikawa *et al.*, 1980), однако систематического исследования большого числа ферментных локусов у *Ae. tauschii* до сих пор проведено не было.

Ферментные локусы представляют интерес не только *per se* – как гены, белковые продукты которых исключительно важны для жизнедеятельности организма; они также полезны как генетические маркёры. В этом качестве они могут использоваться для решения проблем популяционной генетики, частной генетики и систематики *Ae. tauschii*. Так, например, проблемой в области систематики является вопрос о подвидовом делении *Ae. tauschii*. Практически все исследователи используют систему А. Эйга, разделившего *Ae. tauschii* на подвиды *tauschii* и *strangulata* (Eig, 1929), однако разные исследователи подразумевают под этими названиями совершенно различный материал (Kihara, Tanaka, 1958; Jaaska, 1981). Как следствие, в последней и наиболее капитальной монографии по систематике рода *Aegilops* (van Slageren, 1994) этот вопрос оставлен полностью открытым и деление *Ae. tauschii* на подвиды не проводится.

Одной из проблем в области частной генетики *Ae. tauschii* является вопрос о генетическом контроле типа развития (яровой либо озимый). Результаты изучения *T. monosocum* и *H. vulgare* показали, что тип развития у этих диплоидных видов трибы *Triticeae* контролируется генами, относящимися к ортологическим группам генов *Vrn-1*, *Vrn-2*, *Vrn-3* (Takahashi, Yasuda, 1971; Laurie *et al.*, 1995; Dubcovsky *et al.*, 1998; McIntosh *et al.*, 1998). Какой главный ген (или гены) определяют тип развития у *Ae. tauschii* было ранее неизвестно.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы было изучение полиморфизма и частной генетики изоферментов у *Ae. tauschii*. Соответственно, конкретные задачи, связанные с изучением аллельной вариабельности ферментных генов в природных популяциях *Ae. tauschii*, характеристик *Ae. tauschii* как объекта популяционно-генетических исследований и локализацией ферментных локусов на генетической карте, были следующими:

1. Изучить внутривидовую дивергенцию и популяционно-генетическую структуру *Ae. tauschii*.
2. Выявить пространственные паттерны аллельной вариабельности ферментных генов у *Ae. tauschii*.
3. Выявить "новые" полиморфные фермент-кодирующие гены и провести их локализацию.
4. Используя изоферменты как генетические маркёры, выявить главный ген(ы) контролирующий тип развития у *Ae. tauschii*.
5. Выявить генетические сцепления между фермент-кодирующими локусами у *Ae. tauschii*.

Научная новизна. Впервые проведено систематическое изучение полиморфизма ферментных генов у *Ae. tauschii* с использованием подходов, принятых в популяционной генетике. Для анализа были взяты образцы из мировых генетических коллекций, представляющие весь ареал вида, а также был использован материал собственных сборов, проведённых в Закавказье. Весь материал (744 индивидуальных растения) был проанализирован по широкому набору ферментных локусов (от 21 до 27).

Впервые изучена популяционно-генетическая структура *Ae. tauschii*, и показана высокая степень генетической дифференциации локальных популяций вида.

Впервые выработан морфологический критерий (подвидовой индекс "SP"), объективно отражающий внутривидовую дифференциацию *Ae. tauschii*. Проведение многомерного статистического анализа биохимического полиморфизма, совместно с изучением морфологии *Ae. tauschii*, позволило решить проблему подвидового состава этого вида. Впервые было выявлено чёткое разделение *Ae. tauschii* на два подвида и найден простой биохимический критерий ("быстрая" кислая фосфатаза, ACPH1) для их таксономического определения.

У *Ae. tauschii* описаны неизвестные ранее в трибе *Triticeae* гены *AcpH1* и *Est5*. Проведена локализация на генетической карте гена *AcpH1* и хромосомная локализация гена *Est5*.

Впервые у *Ae. tauschii* выявлен полиморфизм по следующим ферментным генам: *Aco2*, *AcpH1*, *AcpH4*, *Ak*, *Cat2*, *Est5*, *Lap*, *Mdh1*, *Mdh2*, *Nadh1*, *Nadh2*, *Pgm*.

Впервые выявлено, что тип развития у *Ae. tauschii* контролируется одним кодоминантным главным геном. Показано, что этот ген принадлежит к

ортологичной группе генов *Vrn-2*. Таким образом, впервые описан ген *Vrn-2* в геноме D.

Впервые выявлены генетические сцепления между генами: *Est5 - Nadhd2* в хромосоме 3; *Vrn-D2 - Aco2 - Cat2 - Pgm - Nadhd1* в хромосоме 4; *Est2 - Got2* в хромосоме 6; определены соответствующие значения частот рекомбинации.

Практическая ценность. В практическом плане, полученные данные по генетической структуре популяций *Ae. tauschii* и пространственной структуре генетического полиморфизма на ареале вида существенны для сохранения генетического ресурса вида и его использования в селекции возделываемых пшениц.

Локализация у *Ae. tauschii* гена *Vrn-D2* дает возможность использовать этот ген в селекции возделываемых пшениц, а также в создании тестерных линий *T. aestivum*.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на 11-й международной конференции EWAC, 24 –28 июля 2000 г., Новосибирск; а также на отчётных сессиях Института цитологии и генетики СО РАН.

Публикации. По результатам исследования опубликовано, 10 работ (включая 1, принятую в печать), из них 7 – статьи в международных журналах.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, глав, где приведены результаты работы и их обсуждение, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Диссертация изложена на 131 странице печатного текста, включая 11 таблиц и 32 рисунка. Список цитируемой литературы содержит 138 работ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полиморфизм ферментных локусов был изучен на следующем материале *Ae. tauschii*. 1. (“Т”) Материал, собранный автором в Закавказье (Армения, Азербайджан, Дагестан) в 20-ти первичных местообитаниях *Ae. tauschii*, всего 357 растений. 2. (“V”) 154 образца из мировой коллекции ВИР (С.-Петербург), представляющие весь ареал вида, всего 308 растений. 3. (“Г”) 79 образцов *Ae. tauschii* из коллекции Университета г. Киото (Япония), собранных в Иране - по одному растению из образца, т. к. известно, что данные образцы фактически являются линиями.

Использовались ферментные системы: аконитатгидратаза (ACO), кислая фосфатаза (ACPH), аденилаткиназа (AK), альдолаза (ALD), каталаза (CAT), эндопептидаза (EP), эстераза (EST), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPD), глутаматдегидрогеназа (GDH), глутамат-оксалоацетаттрансаминаза (GOT), общий белок (GP), глюкозо-6-фосфатизомераза (GPI), лейцинаминопептидаза (LAP), малатдегидрогеназа (MDH), NADH диафораза (NADHD), фосфоенолпируваткарбоксилаза (PEPC), фосфоглюкомутаза (PGM), шикиматдегидрогеназа (SKDH). Экстракция проводилась из листьев 2-3 недельных зелёных растений. Электрофорез проводился в полиакриламидном геле (“Р”) с 0.25М Трис - 0.1М HCl гелевым буфером

Таблица 1. Полиморфизм ферментных локусов у *Aegilops tauschii*.

фермент	номер	метод электро-фореза	локус	число аллелей	изученный материал <i>Ae. tauschii</i>
ACO	4.2.1.3	H	<i>Aco1</i>	1	T, V, I
			<i>Aco2</i>	3*	T, V, I
ACPH	3.1.3.2	L	<i>Acph1</i>	2*	T, V, I
			<i>Acph4</i>	2	T, V, I
AK	2.7.4.3	H	<i>Ak</i>	2*	I
ALD	4.1.2.13	L	<i>Ald</i>	1	T, I
CAT	1.11.1.6	L	<i>Cat1</i>	1	T, V, I
			<i>Cat2</i>	3*	T, V, I
EP	3.4.21-24.-	P	<i>Ep</i>	6*	T, I
EST	3.1.1.2	L	<i>Est1</i>	3	T
			<i>Est2</i>	3*	T, V, I
			<i>Est3</i>	1	T, V
			<i>Est4</i>	1	T, V
			<i>Est5</i>	4*	T, V, I
GAPD	1.2.1.12	H	<i>Gapd</i>	1	T
GDH	1.4.1.2	H	<i>Gdh</i>	1	T
GOT	2.6.1.1	P	<i>Got1</i>	2*	T, I
			<i>Got2</i>	2*	T, V, I
			<i>Got3</i>	2*	T, V, I
GP	4.1.1.39?	M	<i>Gp</i>	1	T, V, I
GPI	5.3.1.9	L	<i>Gpi</i>	2	T, I
LAP	3.4.11.1	M	<i>Lap</i>	3*	T, I
MDH	1.1.1.37	H	<i>Mdh1</i>	2	T, V, I
			<i>Mdh2</i>	2	T, V, I
NADHD	1.6.4.3	M	<i>Nadhd1</i>	2	T, V, I
			<i>Nadhd2</i>	2	T, V, I
PEPC	4.1.1.31	M	<i>Pepc</i>	1	V, I
PGM	2.7.5.1	H	<i>Pgm</i>	2	T, V, I
SKDH	1.1.1.25	H	<i>Skdh</i>	1	T, V, I

* Частота встречаемости наиболее обычного аллеля – меньше 0.99

(Jaaska, 1981); а также в крахмальном геле в системах: “М”, Трис - ЭДТА - малеиновая кислота, pH 7.4 (Brown *et al.*, 1978); “L”, LiOH - борная кислота, pH 8.3; “H”, 0.02М гистидин-цитрат, pH 7.0, (Gottlieb, 1981a) (Табл. 1).

Критерий подвидового деления *Ae. tauschii* А. Эйра (у ssp. *tauschii* - цилиндрический колос, у ssp. *stragulata* - бусошнуровидный (Eig, 1929)) фактически является количественным, так как существует непрерывный ряд промежуточных форм. Поэтому нами был разработан объективный критерий.

отражающий подход А. Эйга: индекс “SI” – отношение ширины колосковой чешуи к ширине осевого сегмента (у колоска из середины колоса).

При анализе данных биохимического полиморфизма применялись методы многомерного анализа: метод главных компонент и множественный анализ соответствий (Айвазян и др., 1989). В первом случае использовался стат-пакет SIGAMD, во втором – программа автора, написанная на языке Pascal. Для анализа данных расщеплений в F_2 применялась программа CROS (авторы – С.М. Розов, О.Э. Костерин, ИЦиГ СО РАН), а при анализе расщепления в F_3 (локализация гена *Acph1*) – программа автора, использующая метод максимального правдоподобия Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ae. tauschii: внутривидовая дивергенция, популяционно-генетическая структура и эволюционная история

Было изучено 29 ферментных локусов у *Ae. tauschii*. Отмечен высокий для вида-самоопылителя уровень полиморфизма: существенно-полиморфные локусы (Табл. 1, отмечены “*”) составили 38%. Перекрёстное опыление у *Ae. tauschii* происходит редко, и хотя ранее нам изредка встречались гетерозиготы в материалах *Ae. tauschii*, в данной работе среди 744 исследованных растений гетерозигот отмечено не было.

Данные биохимического полиморфизма позволили провести многомерный анализ, который показал, что *Ae. tauschii* представлен двумя чётко различающимися подвидами (на рис. 1 – левая (“s”) и правая (“e”) группы локальных популяций). При этом генетические различия хорошо соответствуют

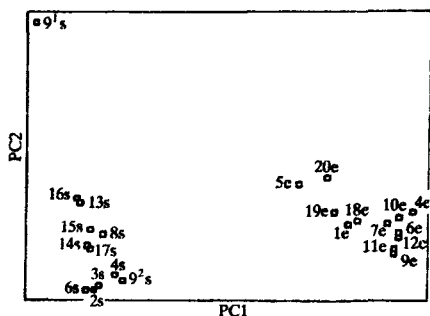


Рис. 1. Закавказские популяции *Ae. tauschii* в пространстве двух первых главных компонент, сформированных на базе значений частот аллозимов



Рис. 2. Распределение значений подвидового индекса ‘SI’ в закавказских популяциях *Ae. tauschii* (Dudnikov, 1998)

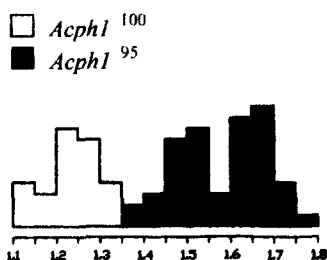


Рис. 3. Распределение значений SI индекса среди 79 иранских образцов *Ae. tauschii* (Dudnikov, Kawahara 2005)

Было отмечено, что между подвидами *Ae. tauschii* существует генетический обмен. На рис. 4 видно, что в смешанной популяции подвидов

морфологической изменчивости (индекс SI), отражающей разделение *A.* Эйгом вида *Ae. tauschii* на подвиды *tauschii* и *strangulata* (рис. 2: единственным исключением является популяция 4е).

Нами был найден простой надежный качественный критерий для определения подвидов *Ae. tauschii* – ген *Acph1*. “быстрый” аллель которого встречается исключительно у ssp. *tauschii*, а “медленный” – у ssp. *strangulata*. На рис. 3 видно, что аллельная изменчивость *Acph1* четко соответствует изменчивости морфологии колоса.

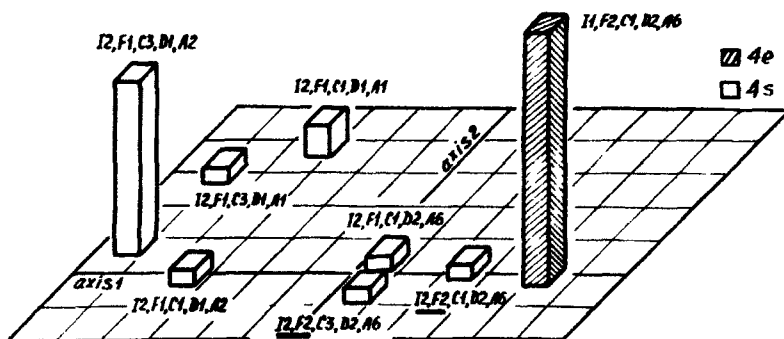


Рис. 4. График первых двух осей множественного анализа соответствий. В качестве объектов взяты 34 растения ssp. *tauschii* и ssp. *strangulata* из местообитания “4”; в качестве переменных – аллозимы. Высота колонки отражает число растений каждого генотипа. В формулах генотипов указан только один аллель каждого локуса, т. к. гетерозиготы встречены не были. Подчеркнуты необычные для *Aegilops tauschii* комбинации генов. I1: *Acph1*¹⁰⁰, I2: *Acph1*⁹⁵, F1: *Got2*¹⁰⁵, F2: *Got2*¹⁰⁰, C1: *Est2*¹⁰⁰, C2: *Est2*^{null}, C3: *Est2*⁸⁴, D1: *Est5*¹⁷⁰, D2: *Est5*¹⁰⁰, A1: *Ep*¹⁰⁰⁻¹⁰², A2: *Ep*¹⁰⁰⁻¹⁰⁰, A6: *Ep*⁹⁷⁻⁹⁴.

tauschii и *strangulata* из закавказского местообитания “4” есть растения с “промежуточными генотипами” и отмечены необычные для *Ae. tauschii* комбинации аллелей. Популяция ssp. *tauschii* “4е” выделяется также сдвигом значений индекса SI в сторону бусошнуровидного типа колоса, характерного для ssp. *strangulata* (рис. 2).

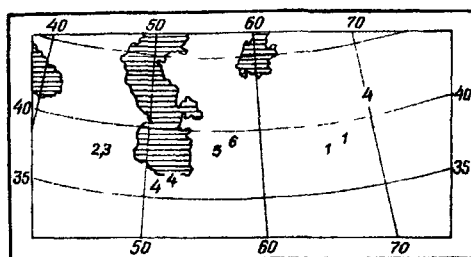


Рис. 5. Географические точки, где были обнаружены редкие аллели у *Aegilops tauschii* (по данным изучения 154 образцов коллекции ВИР) 1: Pgm^{115} , 2: $Nadhd1^{88}$, 3: $Aco2^{110}$, 4: $Aco2^{90}$, 5: $Mdh1^{113}$, 6: $Acph4^{113}$. (Dudnikov, Goncharov, 1993, с изменениями)

популяционной структуре существенную роль может играть генетический дрейф, особенно если какая-либо локальная популяция остаётся длительное

В процессе сбора материала в Закавказье было отмечено, что *Ae. tauschii* представлен небольшими по численности разрозненными популяциями.

Анализ биохимического полиморфизма показал, что эти локальные популяции достаточно хорошо изолированы; генетическая изменчивость представлена в основном изменчивостью межпопуляционной: коэффициент генетической дифференциации G_{ST} (Nei, 1973) составил 0.64 и 0.67 для подвидов *strangulata* и *tauschii*, соответственно. При такой изолированной.

Эволюционная история *Ae. tauschii* находит своё отражение в пространственных характеристиках встречаемости редких аллелей. Такие аллели встречаются случайным образом по всему ареалу (рис 5). Вероятность, что редкий аллель достигнет высокой частоты в каком-либо местообитании и будет обнаружен в образце генколлекции - весьма мала. Тем не менее, один и тот же редкий

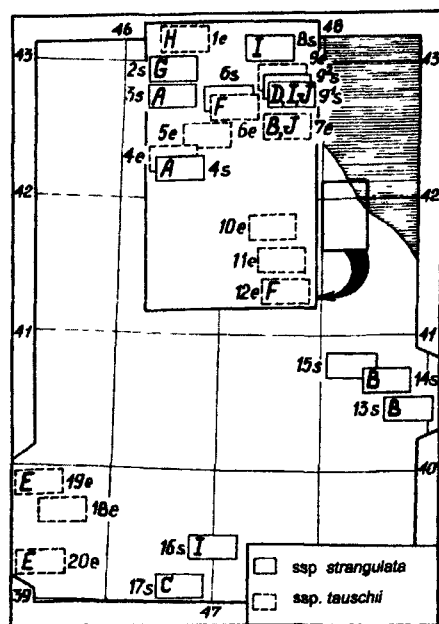


Рис. 6. Редкие аллели в закавказских популяциях *Aegilops tauschii*. A: $Ep^{100-102}$, B: Ep^{99-100} , C: Ep^{97-98} , D: $Est1^{103}$, E: $Est1^{67}$, F: $Est5^{66}$, G: $Got3^{125}$, H: Lap^{107} , I: $Mdh2^{90}$, J: $Nadhd2^{92}$.

аллель, *Aco2*⁹⁰, был отмечен в удалённых друг от друга на 1700 км. местообитаниях, населённых разными подвидами; а аллели *Aco2*¹¹⁰ и *Nadhd1*⁸⁸ отмечены в одном образце (рис. 5). Всё это свидетельствует, что *Ae. tauschii* населяет свой ареал достаточно давно, настолько, чтобы в его локальных популяциях происходили замещения аллелей ферментных локусов. Сходный характер встречаемости редких аллелей у подвигов *tauschii* и *strangulata* (рис. 6) свидетельствует, что разделение *Ae. tauschii* на подвиды также произошло достаточно давно. (Кроме того, на рис. 6 нашли отражение такие процессы как генетический обмен между подвидами *tauschii* и *strangulata* (редкий аллель *Nadhd2*⁹² отмечен в соседних локальных популяциях разных подвигов) и замещение аллелей ферментных генов в локальных популяциях – в популяции 9¹s редкие аллели трёх локусов отмечены с частотой 1.0. Очевидно, эта популяция длительное время оставалась изолированной, и генетический дрейф сделал её существенно отличной от других локальных популяций *Ae. tauschii* (рис. 1)).

Паттерны аллельного полиморфизма ферментных генов у *Ae. tauschii*

Отмеченное нами разделение *Ae. tauschii* на подвиды и надёжное их определение дало возможность описать паттерны аллельной вариабельности ферментных генов у *ssp. tauschii* и *ssp. strangulata*, избежав ошибочного объединения материала, относящегося к разным подвидам. Полученная информация о популяционно-генетической структуре и эволюционной истории *Ae. tauschii* позволяет эти паттерны интерпретировать. Можно ожидать, что представленные большим числом локальных популяций и существующие достаточно давно, чтобы в этих популяциях происходили замещения аллелей ферментных генов, подвиды *tauschii* и *strangulata* являются стохастически-равновесными генетическими системами (с очевидно сходными величинами миграции и эффективной численности локальных популяций, что отражается в сходстве значений G_{ST} у двух подвигов). Тогда в случае нейтрального характера аллельной вариабельности можно ожидать сходства паттернов у подвигов *tauschii* и *strangulata*. Отмеченный генетический обмен между подвидами также будет способствовать такому сходству. Можно также ожидать, что географически близкорасположенные локальные популяции будут более сходны по аллельному составу ферментных генов, чем удалённые, несмотря на то, что в населяемой *Ae. tauschii* гористой местности экологические условия с расстоянием меняются резко и хаотично.

У *Ae. tauschii* отмечен высокий уровень аллельного полиморфизма генов *Acph1*, *Ak*, *Cat2*, *Ep*, *Est2*, *Est5*, *Got1*, *Got2*, *Got3* и *Lap*. Частоты встречаемости аллелей гена *Ep* сходны у подвигов *strangulata* и *tauschii*, а остальных девяти генов – резко различаются. По аллельному составу локуса *Ep* близкорасположенные закавказские популяции *Ae. tauschii* *ssp. strangulata* более сходны между собой, чем географически удалённые (рис. 7: единственное исключение – популяция 9¹s, что соответствует сделанному ранее заключению о её длительной изоляции), в то же время, по аллельному

составу локусов *Est2* и *Got1* близкорасположенные популяции могут резко различаться, а удаленные – быть сходными; при этом в крайних “восточных” популяциях аллели *Got1*⁹⁵ и *Est2*⁸⁴ не встречаются (рис. 8), а в “западных” их частоты отрицательно коррелируют между собой ($r = -0.91$, $P < 0.002$).

У *Ae. tauschii* ssp. *strangulata* в Иране выявлены различные пространственные паттерны аллельной вариабельности генов *Ak*, *Est2*, *Est5*, *Got1* и *Got3*, соответствующие разделению территории на западный прикаспийский, восточный прикаспийский и континентальный Иран. Широко распространённые у ssp. *strangulata* в прикаспийском Иране аллели *Ak*⁹² и *Got1*⁹⁵, на территории континентального Ирана отмечены не были. Весьма редкий в прикаспийском Иране аллель *Est5*¹²⁰, наиболее обычен в континентальном Иране. Аллель *Got3*¹²⁵ наиболее обычен в западном прикаспийском Иране, но нигде больше в Иране не отмечен, а локус *Est2*

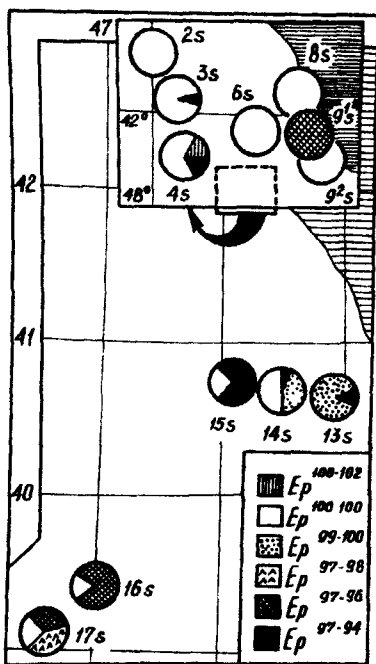


Рис. 7. Пространственное распределение частот аллелей локуса *Ep* в закавказских популяциях *Ae. tauschii* ssp. *strangulata*. (Dudnikov, 1998)

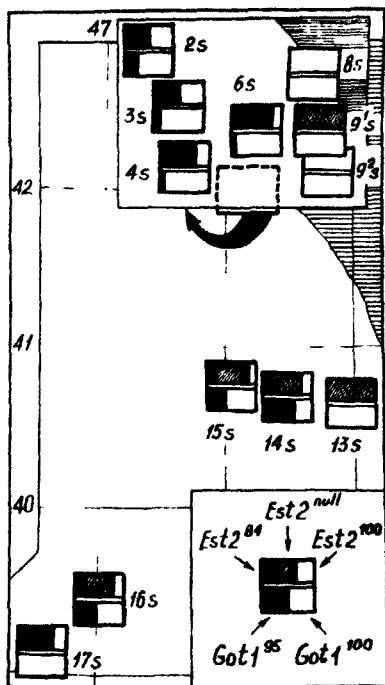


Рис. 8. Пространственное распределение частот аллелей локусов *Est2* и *Got1* в закавказских популяциях *Aegilops tauschii* ssp. *strangulata*. (Dudnikov, 1998)

представлен аллелями $Est2^{84}$, $Est2^{100}$, $Est2^{null}$ с частотой, равной или близкой к 1.0, в восточном прикаспийском Иране ("1e"), западном прикаспийском Иране ("1w") и континентальном Иране ("2"), соответственно (рис. 9).

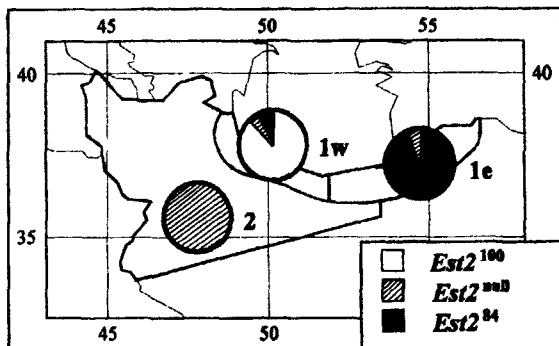


Рис. 9. Пространственное распределение частот встречаемости аллелей локуса *Est2* у *Ae. tauschii* ssp. *stragulata* в Иране.

Стоит отметить, что эти территории не разделены между собой какими-либо географическими барьерами, которые могли бы ограничивать миграцию, но отличаются по климатическим параметрам. Прикаспийский и континентальный Иран относятся к разным фитогеографическим регионам – Евросибирскому и Ирано-туранскому, соответственно (Feldman, 2001). В

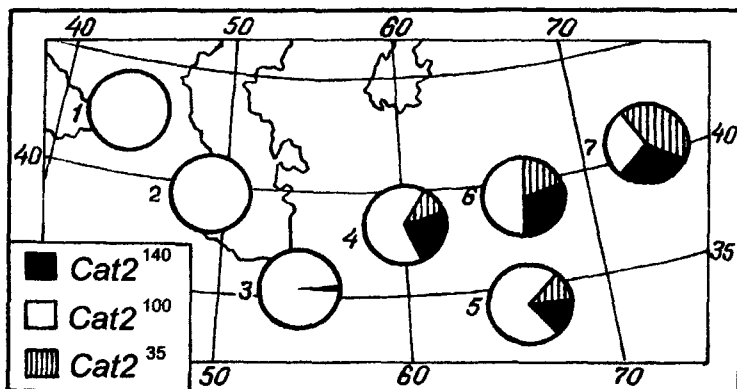


Рис. 10. Пространственное распределение частот встречаемости аллелей локуса *Cat2* у *Ae. tauschii* ssp. *tauschii*. 1: Грузия, Дагестан, Армения, Нахичевань; 2: Азербайджан без Нахичевани; 3: Иран; 4: Туркмения; 5: Афганистан; 6: Узбекистан; 7: Киргизия, Таджикистан, Казахстан, Индия (По данным: Dudnikov, 1998, 2000; Dudnikov, Kawahara, 2005)

свою очередь, западный и восточный прикаспийский Иран отличаются по годовому количеству осадков (1000-2000 мм и 500-1000 мм, соответственно).

У *Ae. tauschii* ssp. *tauschii* выявлена клинальная изменчивость *Cat2*. (рис.10). Интересно, что разнообразие *Cat2* падает с востока на запад, а распространение *Ae. tauschii* по ареалу плю из района Восточного Средиземноморья на восток (Жуковский, 1928) и к тому же завершилось настолько давно, что произошедшие во многих локальных популяциях замещения аллелей *Cat2* должны были стереть клину с лица географической карты. Вообще считается, что существование клины шириной в несколько тысяч километров у вида с такой низкой, как у *Ae. tauschii*, миграционной способностью возможно только благодаря действию естественного отбора (Endler, 1977; Barton, Clark, 1990).

Таким образом, есть основания предполагать, что аллельной полиморфизм ферментных генов у *Ae. tauschii* в значительной степени связан с действием естественного отбора.

Изоферменты в частной генетике *Ae. tauschii*

При изучении биохимического полиморфизма *Ae. tauschii* был впервые для этого вида выявлен полиморфизм ряда ферментных генов, обнаружены неизвестные ранее у видов трибы *Triticeae* гены и найдены генотипы с редкими аллелями сразу по ряду локусов. Это дало возможность локализовать ферментные гены и ген, контролирующий тип развития, а также установить ряд генетических сцеплений у *Ae. tauschii*.

Табл. 2. Аллели 12-ти ферментных генов в линиях *Aegilops tauschii*.

Линия	E1	E2	S1	S2
Тип развития	яровой	озимый	озимый	озимый
Ген				
<i>Aco2</i>	<i>Aco2</i> ¹¹⁰	<i>Aco2</i> ¹⁰⁰	<i>Aco2</i> ¹⁰⁰	<i>Aco2</i> ¹⁰⁰
<i>Acph1</i>	<i>Acph1</i> ¹⁰⁰	<i>Acph1</i> ¹⁰⁰	<i>Acph1</i> ⁹⁵	<i>Acph1</i> ⁹⁵
<i>Cat2</i>	<i>Cat2</i> ¹⁰⁰	<i>Cat2</i> ¹⁴⁰	<i>Cat2</i> ¹⁰⁰	<i>Cat2</i> ¹⁰⁰
<i>Ep</i>	<i>Ep</i> ⁹⁷⁻⁹⁴	<i>Ep</i> ⁹⁷⁻⁹⁴	<i>Ep</i> ¹⁰⁰⁻¹⁰⁰	<i>Ep</i> ⁹⁷⁻⁹⁶
<i>Est2</i>	<i>Est2</i> ¹⁰⁰	<i>Est2</i> ¹⁰⁰	<i>Est2</i> ⁸⁴	<i>Est2</i> ^{null}
<i>Est5</i>	<i>Est5</i> ¹⁰⁰	<i>Est5</i> ¹⁰⁰	<i>Est5</i> ¹⁷⁰	<i>Est5</i> ¹⁷⁰
<i>Got1</i>	<i>Got1</i> ¹⁰⁰	<i>Got1</i> ¹⁰⁰	<i>Got1</i> ⁹⁵	<i>Got1</i> ¹⁰⁰
<i>Got2</i>	<i>Got2</i> ¹⁰⁰	<i>Got2</i> ¹⁰⁰	<i>Got2</i> ¹⁰⁵	<i>Got2</i> ¹⁰⁵
<i>Mdh2</i>	<i>Mdh2</i> ¹⁰⁰	<i>Mdh2</i> ¹⁰⁰	<i>Mdh2</i> ¹⁰⁰	<i>Mdh2</i> ⁹⁰
<i>Nadhd1</i>	<i>Nadhd1</i> ⁸⁸	<i>Nadhd1</i> ¹⁰⁰	<i>Nadhd1</i> ¹⁰⁰	<i>Nadhd1</i> ¹⁰⁰
<i>Nadhd2</i>	<i>Nadhd2</i> ¹⁰⁰	<i>Nadhd2</i> ¹⁰⁰	<i>Nadhd2</i> ¹⁰⁰	<i>Nadhd2</i> ⁹²
<i>Pgm</i>	<i>Pgm</i> ¹⁰⁰	<i>Pgm</i> ¹¹⁵	<i>Pgm</i> ¹⁰⁰	<i>Pgm</i> ¹⁰⁰

Были выделены 4 линии, и линия E1 – скрещена с каждой из трёх других (Табл. 2). Было показано, что тип развития у *Ae. tauschii* контролируется одним кодоминантным главным геном (рис. 11), обозначенным впоследствии как *Vrn-D2*. Установленные сцепления приведены в табл. 3. Оставалось

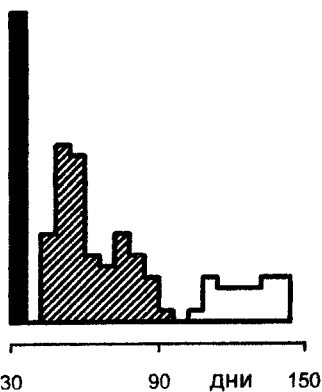


Рис. 11. Распределение по датам колошения среди 119 растений F₂ от скрещивания озимой (E2) и яровой (E1) линий *Ae. tauschii*

неизвестным, в какой хромосоме находятся сцепленные гены *Nadhd2* и *Est5* (так как локализация у мягкой пшеницы гена, ортоголичного *Nadhd2*, неизвестна, а ген *Est5* обнаружен в трибе *Triticeae* впервые). Чтобы это выяснить, ген, ортоголичный *Est5*, был локализован у мягкой пшеницы с помощью нули-тетрасомных (NT) и дителосомных (DT) линий *T. aestivum* cv. 'Chinese Spring'. (В соответствии с номенклатурой генных символов мягкой пшеницы, он был обозначен как *Est-10*). Видно, что отсутствие хромосомы 3A (рис. 12 (8, 9)) в NT линии приводит к исчезновению медленного банды EST-10, отсутствие хромосомы 3D (рис. 12 (12, 13)) – быстрого банды. В хромосоме 3В ген *Est-B10*, по-видимому, представлен

Табл. 3. Генетические сцепления у *Ae. tauschii*.

родители		Гены		число растений F ₂	R _f ± σ	χ ²	P<
E1	E2	<i>Aco2</i>	<i>Vrn-D2</i>	203	33.6 ± 3.0	23.1	0.0001
E1	S2	<i>Aco2</i>	<i>Vrn-D2</i>	78	29.3 ± 4.5	22.5	0.0005
E1	E2	<i>Cat2</i>	<i>Aco2</i>	203	6.1 ± 1.2	276.3	0.0001
E1	E2	<i>Cat2</i>	<i>Pgm</i>	203	42.0 ± 3.4	7.0	*
E1	E2	<i>Cat2</i>	<i>Vrn-D2</i>	203	38.7 ± 3.3	10.6	0.05
E1	E2	<i>Aco2</i>	<i>Pgm</i>	203	43.7 ± 3.4	10.0	0.05
E1	E2	<i>Nadhd1</i>	<i>Pgm</i>	203	32.8 ± 3.0	25.8	0.0001
E1	S1	<i>Est2</i>	<i>Got2</i>	187	26.5 ± 2.8	54.2	0.0001
E1	S2	<i>Est5</i>	<i>Nadhd2</i>	78	26.5 ± 4.3	22.3	0.0005

* сцепление недостоверно

нуль-аллелем и не проявляется (рис. 12 (10, 11)). Отсутствие коротких плеч хромосом 3А, 3В либо 3Д в DT линиях (рис. 12 (5-7)) не отражается на электрофоретическом спектре EST-10, а отсутствие плеча 3АL (рис. 12 (4)) ведёт к исчезновению банды EST-A10. Следовательно, *Est5* находится в длинном плече хромосомы 3. Общая картина установленных сцеплений представлена на рис. 13. Очевидно, что главный ген, контролирующий тип развития у *Ae. tauschii*, относится к ортоголичной группе генов *Vrn-2* и должен быть обозначен как *Vrn-D2*, поскольку он локализован в дистальном районе длинного плеча хромосомы 4 и у него не доминирует яровость.

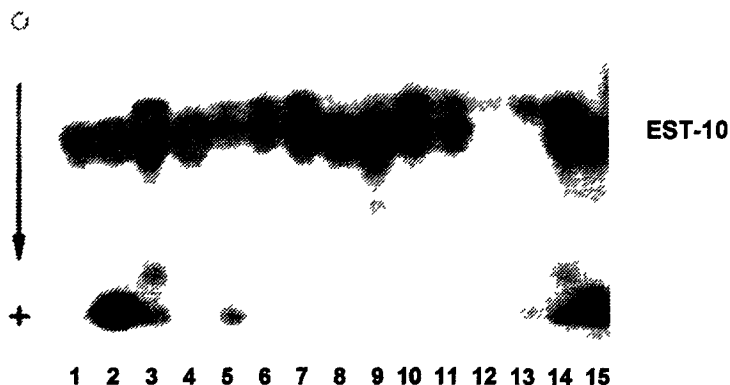


Рис. 12. Электрофоретические фенотипы эстераз листа у *Ae. tauschii* ssp. *strangulata* (2 и 15) и мягкой пшеницы сортов 'Фаворит' (1) и 'Chinese Spring': эуплоид (3 и 14), DT 3AS (4), DT 3AL (5), DT 3BL (6), DT 3DL (7), N3A-T3B (8), N3A-T3D (9), N3B-T3A (10), N3B-T3D (11), N3D-T3A (12), N3D-T3B (13). Первые две полосы от катода (самые "медленные") представляют EST-A10 и EST-D10, соответственно (Dudnikov, 2001)

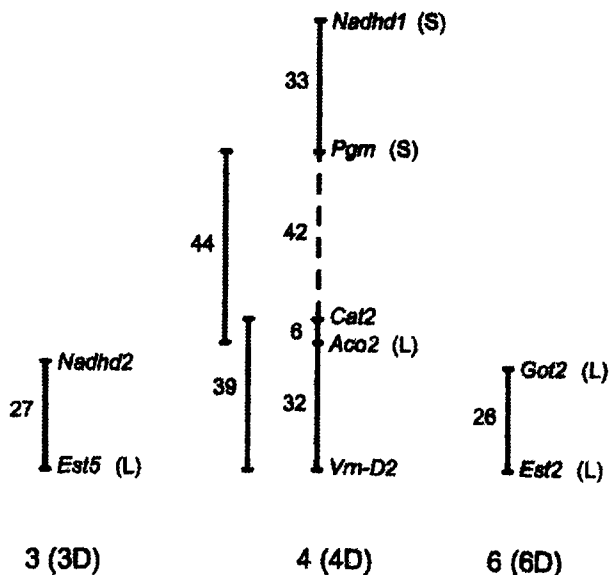


Рис. 13. Генетические сцепления среди девяти генов у *Ae. tauschii*. Буквы L и S в скобках означают, что ортологичные гены у *T. aestivum* локализованы в длинных и коротких плечах хромосом, соответственно. (Dudnikov, 2003)

Таблица 4. Генетическое сцепление между локусом *Acph1* и SSR маркерами у *Ae. tauschii*.

SSR маркер	хромосома	$R_f \pm \sigma$	χ^2	P<
<i>Xwmc111</i> *	2DS	0.383 ± 0.066	3.9	0.2*
<i>Xgwm484</i>	2DS	0.323 ± 0.064	7.1	0.025
<i>Xbarc168</i>	2DS	0.323 ± 0.064	7.1	0.025
<i>Xbarc145a</i>	2DS	0.174 ± 0.052	24.5	0.0001
<i>Xgwm157</i>	2DL	0.041 ± 0.029	43.5	0.0001
<i>Xgwm539</i>	2DL	0.135 ± 0.045	35.1	0.0001
<i>Xgdm6</i>	2DL	0.327 ± 0.065	7.8	0.001

* Сцепление с *Acph1* не достоверно

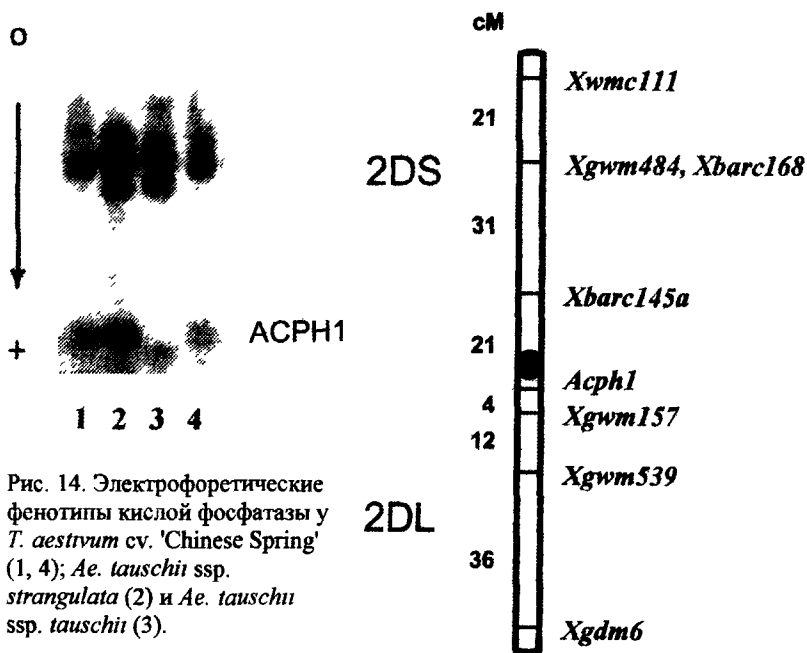


Рис. 14. Электрофоретические фенотипы кислой фосфатазы у *T. aestivum* cv. 'Chinese Spring' (1, 4); *Ae. tauschii* ssp. *stragulata* (2) и *Ae. tauschii* ssp. *tauschii* (3).

Рис. 15 Расположение локуса *Acph1* и SSR маркеров на генетической карте хромосомы 2 *Aegilops tauschii*. Приблизительные расстояния в сМ рассчитаны по: Сталь (1966), на основании значений частот рекомбинации из табл. 4

К сожалению, оставалась неизвестной локализация такого интересного гена, как *Acph1* (рис.14). В популяции F₂ от скрещивания S1×E1 было отобрано 20 гомозигот *Acph1*^{100/100} и 20 - *Acph1*^{95/95}, и у их потомков определены генотипы в отношении широкого набора SSR маркёров (SSR анализ проведён J. Kirby, H.T. Vinh, S.M. Reader (John Innes Centre, Norwich, UK)). *Acph1* был картирован в прицентромерном районе длинного плеча хромосомы 2 (Табл. 4, рис. 15). Ранее у видов *Triticeae* гены, кодирующие кислую фосфатазу, были известны в хромосомах 4 и 7 гомеологических групп (McIntosh *et al.*, 1998); в хромосоме 2 гомеологической группы ген кислой фосфатазы обнаружен впервые.

ВЫВОДЫ

1. Анализ полиморфизма 29-ти фермент-кодирующих локусов у *Ae. tauschii* показал, что этот вид представлен чётко различающимися генетически двумя подвидами. Показано, что морфологическая изменчивость колоса, которая оценивалась как отношение ширины колосковой чешуи к ширине осевого сегмента, коррелирует с изменчивостью генетической. В качестве систематического критерия для определения подвидов у *Ae. tauschii* был предложен ген *Acph1*, “быстрый” аллель которого встречается только у *ssp. tauschii*, а “медленный” – у *ssp. strangulata*.

Показано, что встречаемость редких аллелей имеет случайный характер на всём ареале вида, а также между подвидами *strangulata* и *tauschii*. Эти данные свидетельствуют о том, что ни географическая экспансия, ни внутривидовая дивергенция не имели места у *Ae. tauschii* в недавнем, по эволюционным меркам, прошлом.

Отмечено, что между подвидами *Ae. tauschii* существует генетический обмен.

2. Анализ оригинального, собранного в Закавказье популяционного материала *Ae. tauschii*, показал, что *Ae. tauschii* представлен большим числом небольших, достаточно хорошо изолированных популяций. Генетическая изменчивость представлена, в основном, межпопуляционной компонентой: коэффициент генетической дифференциации Нея (G_{ST}) составляет 0.64 и 0.67 для подвидов *strangulata* и *tauschii*, соответственно.

3. Отмечен высокий уровень аллельного полиморфизма генов *Acph1*, *Ak*, *Cat2*, *Ep*, *Est2*, *Est5*, *Got1*, *Got2* и *Lap* у *Ae. tauschii*. При этом показано, что частоты встречаемости аллелей гена *Ep* сходны у подвидов *strangulata* и *tauschii*, а остальных девяти генов – резко различаются.

Показано, что близкорасположенные закавказские популяции *Ae. tauschii ssp. strangulata* могут резко различаться по аллельному составу локусов *Est2* и *Got1*, а удаленные – быть сходными; при этом была выявлена корреляция частот аллелей этих двух локусов. По аллельному составу локуса *Ep* близкорасположенные популяции более сходны между собой, чем географически удаленные.

У *Ae. tauschii* ssp. *strangulata* в Иране выявлены различные пространственные паттерны аллельной варибельности генов *Ak*, *Est2*, *Est5*, *Got1* и *Got3*, соответствующие разделению территории на западный прикаспийский, восточный прикаспийский и континентальный Иран.

У *Ae. tauschii* ssp. *tauschii* выявлена клинальная изменчивость *Cat2*. Частота аллеля *Cat2*¹⁰⁰ снижается от 1.0 на западе ареала до 0.3 на востоке, где *Cat2* представлена тремя, примерно одинаково часто встречающимися, аллелями.

4. Описаны ранее неизвестные у видов трибы *Triticeae* гены кислой фосфатазы, *Acph1*, и эстеразы, *Est5*, и проведена их локализация. *Est5* находится в длинном плече хромосомы 3, а *Acph1* расположен в прицентромерном районе длинного плеча хромосомы 2 и тесно сцеплен с SSR маркером *Xgwm157* ($R_f = 0.04$). В соответствии с генной номенклатурой, принятой для мягкой пшеницы, эти гены должны быть обозначены как *Acph-2* и *Est-10*.

5. Показано, что тип развития у *Ae. tauschii* контролируется одним кодоминантным главным геном, который был локализован в дистальном районе длинного плеча хромосомы 4. Полученные данные свидетельствуют, что этот ген ортологичен генам *Vrn-H2* у *Hordeum vulgare* и *Vrn-A2* у *Triticum monocosmum*, и должен быть обозначен как *Vrn-D2*.

6 У *Ae. tauschii* установлены следующие генетические сцепления. В хромосоме 3: *Est5* - *Nadhd2* ($R_f = 0.27$). В хромосоме 4: *Vrn-D2* - *Aco2* - *Cat2* - *Pgm* - *Nadhd1* ($R_f = 0.32, 0.06, 0.42$ и 0.33 , соответственно). В хромосоме 6: *Est2* - *Got2* ($R_f = 0.26$).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТИЦИИ

- Dudnikov A. Ju., Goncharov N. P., 1993. Allozyme variation in *Aegilops squarrosa*. *Hereditas* 119: 117-122.
- Dudnikov A. Ju., 1998. Allozyme variation in Transcaucasian populations of *Aegilops squarrosa*. *Heredity* 80: 248-258.
- Dudnikov A. Ju. 2000. Multivariate analysis of genetic variation in *Aegilops tauschii* from the world germplasm collection. *Genet. Resour. Crop Evol.* 47: 185-190.
- Dudnikov A. Ju., 2001. Chromosomal location of an esterase gene set (*Est-10*) of common wheat orthologous to *Est5* of *Aegilops tauschii*. *Cereal Res. Commun.* 29: 57-60.
- Dudnikov A. Ju., 2001. Multiple correspondence analysis in genetic research: a program for PC. In: Pshenichnikova, T. A. & A. J. Worland (eds.), Proc. 11th EWAC Conf., 24-28 July, 2000, Novosibirsk, pp 108-113.
- Dudnikov A. Ju., 2003. Allozymes and growth habit of *Aegilops tauschii*: genetic control and linkage patterns. *Euphytica* 129: 89-97.
- Dudnikov A. Ju., 2003. Selection in natural populations: what part of allozyme polymorphisms is involved? In: XIX International Genetic Congress. Abstracts & Posters. 6-11 July 2003, Melbourne, pp 209-210.

Дудников А. Ю., 2004. Полиморфизм ферментных локусов и селективные процессы в популяциях: *Aegilops tauschii* как модель адаптивного видообразования. В материалах III съезда ВОГИС, Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития. Москва, 6-12 июня 2004. т. 2, с. 199.

Kirby J., Vinh H. T., Reader S. M., Dudnikov A. Ju., 2005 Genetic mapping of the *Acph1* locus in *Aegilops tauschii*. Plant Breed. 124: 523-524.

Dudnikov A. Ju., Kawahara T., 2005. *Aegilops tauschii*: genetic variation in Iran. Genet. Resour. Crop Evol. (in press)

Подписано к печати 7.10.2005 г.

Формат бумаги 60 x 90 1/16, печ. л. 1, уч. изд. л. 0,7

Тираж 100. Заказ №127

Ротапринт Института цитологии и генетики СО РАН
630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10.

19483

РНБ Русский фонд

2006-4

17838