

## ПРОЯВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЕНА ЦЕНТРОМЕРНОГО ГИСТОНА H3 У АЛЛОПОЛИПЛОИДНЫХ ГИБРИДОВ ПШЕНИЦЫ И РЖИ

© Ю. А. Липихина,<sup>1</sup> Е. В. Евтушенко,<sup>1</sup> С. С. Гацкая,<sup>1</sup> П. И. Стёпочкин,<sup>2</sup>  
О. М. Люсиков,<sup>3</sup> И. А. Гордей,<sup>3</sup> А. В. Вершинин<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, 630090,

<sup>2</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090,

<sup>3</sup>Институт генетики и цитологии НАН, Минск, 220072;

\* электронный адрес: [avershin@mcb.nsc.ru](mailto:avershin@mcb.nsc.ru)

Отдаленная гибридизация часто вызывает реорганизацию геномов, следствием которой может быть элиминация хромосом одного из родителей, наблюдаемая даже после успешного оплодотворения и объединения двух геномов в гибридной клетке. Центромеры регулируют процесс правильной сегрегации хромосом в ходе деления клетки. Постоянным компонентом центромерного хроматина является специализированная модификация гистона H3 (CENH3). CENH3 состоит из консервативного С-терминального домена (HFD) и более варибельного N-терминального конца (NTT), который играет важную роль при встройке CENH3 в центромерный хроматин в процессе деления клетки. В настоящей работе проведен сравнительный анализ экспрессии вариантов CENH3 у аллополиплоидных гибридов и различных родительских сортов ржи (*Secale cereale* L.) и пшеницы (*Triticum aestivum* L.). В качестве материнских растений были использованы сорта обоих родов. В кодирующих последовательностях NTT CENH3 выявлены полные копии размером 216 п. н., имеющие характерные позиции нуклеотидных замен, и копии с делециями размером 21 или 66 п. н. у родительских форм пшеницы и ржи последовательности с делецией 21 п. н. не имеют различий в структуре ДНК, последовательности с делецией 66 п. н. у ржи имеют две специфические нуклеотидные замены, которые также были обнаружены у 57-хромосомного растения пшенично-ржаных аллополиплоидов. В полных последовательностях NTT CENH3 у ржи присутствуют специфические замены, которые также были выявлены в полных последовательностях у всех проанализированных растений пшенично-ржаных аллополиплоидов. Эти результаты указывают на то, что в гибридных геномах анеуплоидов, возникших из октаплоидных тритикале, наблюдается экспрессия копий гена CENH3, характерных для каждого родителя. У секалотритикум не обнаружено копий NTT CENH3 с делециями. В полных последовательностях выявлены две специфические для ржи нуклеотидные замены, частота встречаемости которых значительно превышает таковую у гексаплоидного тритикале сорта Михась, что указывает на предпочтительный синтез полных копий NTT CENH3, характерных для родительской формы ржи, в геноме секалотритикум.

**Ключевые слова:** центромерный гистон H3 (CENH3), экспрессия генов, аллополиплоиды, рожь, пшеница.

**Принятые сокращения:** п. н. — пары нуклеотидов, HFD — гистонсворачивающий домен (histone fold domain), NTT — N-терминальный конец (N-terminal tail), ORF — открытая рамка считывания (open reading frame), SNP — однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism).

Пшеница и рожь в отличие от большинства других родов растений относительно легко скрещиваются, и их аллополиплоидные гибриды способны давать потомство. Способность к гибридизации на протяжении десятилетий применяется в селекции для получения гибридов, сочетающих полезные свойства обоих родителей. Отдаленная гибридизация часто вызывает реорганизацию геномов, следствием которой может быть элиминация хромосом одного из родителей, наблюдаемая даже после успешного оплодотворения и объединения двух геномов в гибридной клетке. Центромеры являются участками хромосом, на которых происходят сборка кинетохорного комплекса и прикрепление нитей веретена деления. Таким образом, они регулируют процесс правильной сегрегации хромо-

сом в ходе деления клетки. Постоянным компонентом центромерного хроматина является специализированная (центромерная) модификация гистона H3 (CENH3), которая заменяет канонический гистон H3 в нуклеосомах. CENH3 состоит из варибельного N-терминального конца (NTT) и более консервативного С-терминального домена (HFD). HFD необходим для связывания CENH3 с центромерной ДНК (Lermontova et al., 2006). NTT отличается от соответствующего района в каноническом гистоне H3, и его структура варьирует у разных видов (Henikoff et al., 2001). N-терминальный конец играет важную роль при встройке CENH3 в центромерный хроматин в процессе мейоза (Lermontova et al., 2011). Последовательность из 33 аминокислот в N-терминальном конце

CENH3 дрожжей участвует во взаимодействии с различными компонентами кинетохора (Chen et al., 2000). Получены экспериментальные подтверждения того, что для процесса элиминации хромосом у межвидовых гибридов ячменя *H. vulgare* × *H. bulbosum* предпосылкой является потеря CENH3 белков из центромерных районов (Sanei et al., 2011).

Обычно при получении аллополиплоидных гибридов между пшеницей и рожью в качестве материнского растения используется пшеница, в этом случае получают гибриды — тритикале. Тритикале (×*Triticosecale* Wittmack) — это межродовые гибриды между различными видами пшеницы (*Triticum* spp., AA, AABB и AABBDD) и ржи (*Secale cereale*, RR). В настоящее время синтезированы тритикале с разными уровнями плоидности и комбинациями геномов — тетраплоиды (AARR), гексаплоиды (AABBRR), октаплоиды (AABBDDRR). Комбинация двух и более геномов в одном организме часто приводит к изменениям в экспрессии генов в гибридах по сравнению с родительскими видами. Молекулярные исследования показали, что элиминация последовательностей ДНК из генома ржи или потеря экспрессии генов ржи характерна для тритикале (Khalil et al., 2015). В связи с этим большой интерес представляет сравнительный анализ экспрессии генов у аллополиплоидных гибридов, у которых в качестве материнского растения были использованы виды ржи. Такие гибриды, секалотритикум, получены в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси. Секалотритикум (×*Secalotriticum*) — это ржано-пшеничные аллополиплоиды с цитоплазмой ржаного типа, наследуемой от материнской формы ржи (*S. cereale* L.) (Гордей и др., 2011).

В настоящей работе мы провели сравнительное исследование экспрессии вариантов *CENH3* у пшенично-ржаных аллополиплоидов, имеющих различное число хромосом, секалотритикум и их родительских форм.

## Материал и методика

Изогенная линия пшеницы *Triticum aestivum* L. Triple Dirk D (AABBDD,  $2n = 6x = 42$ ) и сорт ржи *S. cereale* L. Короткостебельная 69 (RR,  $2n = 2x = 14$ ) были использованы для получения пшенично-ржаных аллополиплоидов (AABBDDRR,  $2n = 8x = 56$ ). Гибриды секалотритикум (RRAABB,  $2n = 6x = 42$ ,  $F_{12}$ ) были получены на основе родительских форм — сорта тетраплоидной ржи Верасень (RRRR,  $2n = 4x = 28$ ) и гексаплоидного тритикале сорта Михась (AABBRR,  $2n = 6x = 42$ ).

Цитологический анализ растений проводили с использованием методики окраски хромосом по Фельгену (De Tomasi, 1936). Для приготовления реактива Шиффа использовали фуксин отечественного производства. Гидролиз ДНК проводили в 1N HCl при 60 °C в течение 6—8 мин, окрашивание препаратов реактивом Шиффа — 3—12 ч, отмывку в сернистых водах — 20 мин (2 смены по 10 мин). Выделение РНК проводили с использованием TRI REAGENT (MRC, США) (Chomczynski, Sacchi, 1987). Чтобы избежать контаминации геномной ДНК, тотальную РНК обрабатывали ДНКазой (DNA-free™ Kit, Ambion, США). Для синтеза кДНК использовали набор реактивов RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США). Полученную кДНК использовали в серии реакций ПЦР в качестве матрицы с праймерами, синтезированными специально для ампли-

фикации NTT *CENH3*. Последовательности праймеров: 5'-ATGGCCCGCACCAAGC (F), 5'-GAAACTCGACCGA-CTTCTG (R). Ожидаемый размер продукта составлял 216 п. н. Продукты ПЦР клонировали в плазмиду pTZ57R/T (Thermo Scientific, США) и секвенировали по Сэнгеру с использованием BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Продукты реакции разделяли на приборе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Последовательности индивидуальных клонов, полученные для каждого образца, анализировали при помощи программы FinchTV 1.4, пакета программ FASTA (Pearson, Lipman, 1988). Поиск идентичности нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью алгоритма BLAST в базе данных NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Графические изображения подготовлены с использованием программы Jalview (<http://www.jalview.org/>).

## Результаты и обсуждение

Цитологический анализ растений с использованием окраски хромосом по Фельгену показал, что все проанализированные 18 растений тритикале являются анеуплоидами с различным числом хромосом от 52 до 57. В отличие от тритикале гибриды секалотритикум были цитологически стабильны и содержали 42 хромосомы. Исходные формы — рожь Верасень ( $2n = 28$ ) и тритикале сорта Михась ( $2n = 42$ ) — также оказались стабильными.

Сравнительный анализ кодирующих последовательностей NTT *CENH3* у родительских форм пшеницы Triple Dirk и ржи Короткостебельная 69, использованных для создания октаплоидных тритикале, показал наличие полных копий размером 216 п. н. и копий с делециями различной протяженности: 1) 21 п. н., в которой утрачены позиции 66—86 п. н. относительно полноразмерной копии; 2) 66 п. н., позиции 104—169 п. н. (рис. 1). Копии с делецией размером 21 п. н. с частотой 5 % встречаются в клонах как у пшеницы, так и у ржи и не отличаются друг от друга в последовательности нуклеотидов (см. таблицу). Копии с делецией размером 66 п. н. встречаются у 21 % клонов ржи и 30 % клонов пшеницы. Последовательности NTT *CENH3* с делециями различной протяженности не имеют общих позиций нуклеотидных замен. Единственная (синонимичная) замена в позиции 126 п. н. в последовательностях с делецией размером 21 п. н. встречается и в последовательностях без делеций. Копия NTT *CENH3* с делецией 66 п. н. у ржи имеет две специфические несинонимичные замены нуклеотидов в позициях 198 и 209 п. н. относительно полноразмерных копий (рис. 1).

В последовательностях NTT *CENH3* без делеций выявлено шесть идентичных замен нуклеотидов у пшеницы и ржи, но с разной частотой встречаемости в клонах. У пшеницы наиболее часто встречаются замены в позициях 82 (61.5 %), 84 (61.5 %) и 123 п. н. (53.8 %), у ржи — в позиции 144 п. н. (42.9 %) (см. таблицу). Помимо идентичных замен в последовательностях NTT *CENH3* у ржи обнаружены четыре специфические замены в позициях 33 (7.1 %), 73 (7.1 %), 126 (21.4 %) и 145 п. н. (7.1 %), тогда как у пшеницы присутствуют две специфические замены в позициях: 45 (7.7 %) и 129 п. н. (7.7 %). Нуклеотидные замены в позициях 73 и 145 п. н. ведут к замене аминокислоты в белковой последовательности NTT *CENH3*.

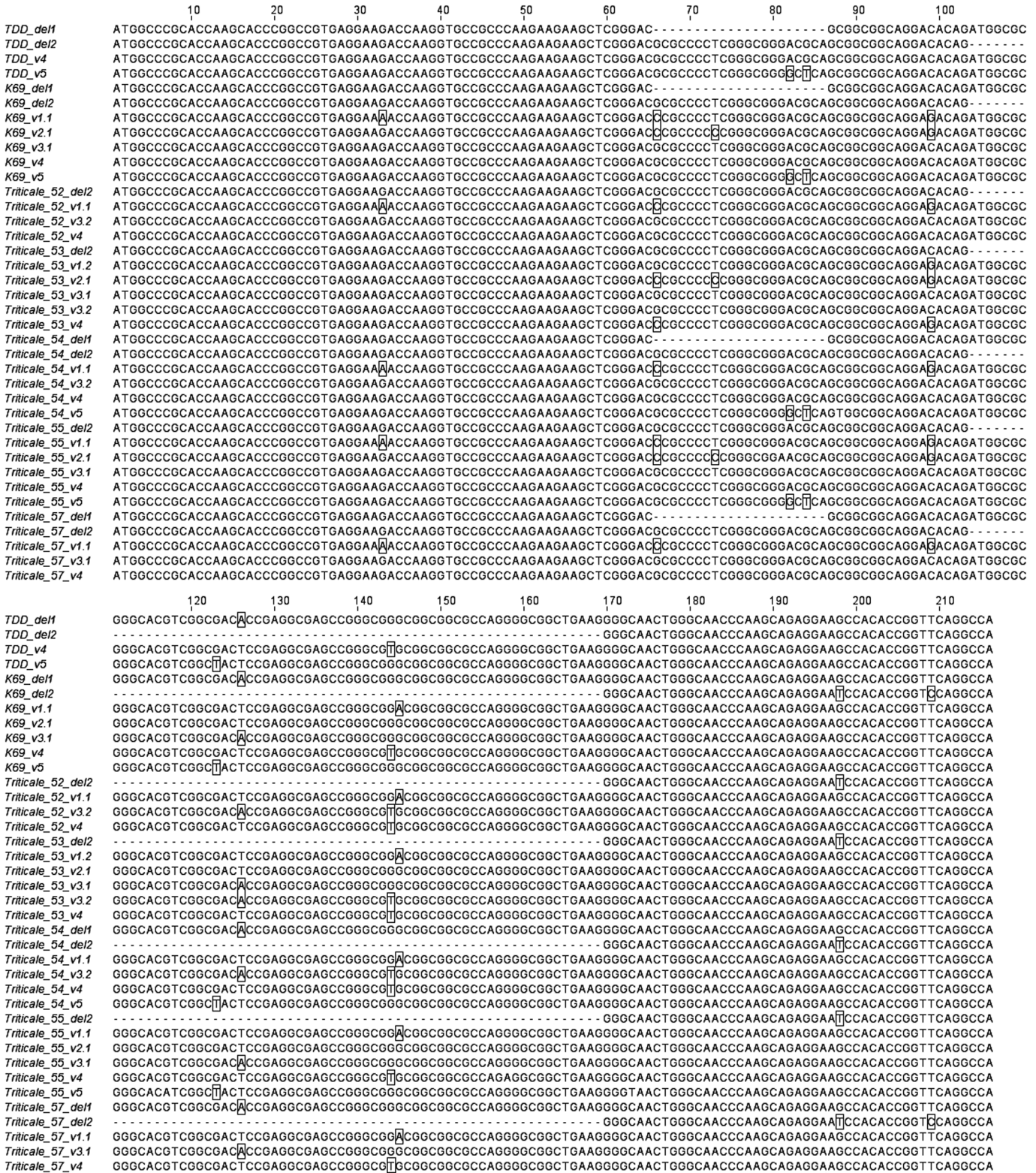


Рис. 1. Нуклеотидные последовательности NTT *CENH3* родительских форм и пшенично-ржаных аллополиплоидов.

*TDD* — *T. aestivum* Triple Dirk D, *K69* — *Secale cereale* Короткостебельная 69, *Triticale\_52* — растение № 1 (2n = 52), *Triticale\_53* — растение № 2 (2n = 53), *Triticale\_54* — растение № 3 (2n = 54), *Triticale\_55* — растение № 4 (2n = 55), *Triticale\_57* — растение № 5 (2n = 57). *del1* — последовательность с делецией размером 21 п. н., *del2* — последовательность с делецией размером 66 п. н. Варианты полных последовательностей (216 п. н.): *v1.1* — SNP в позициях 33 и 145, *v1.2* — только 145; *v2.1* — 73, *v.2.2* — 73 и 126; *v3.1* — 126, *v3.2* — 126 и 144; *v4* — 144; *v5* — 82, 84 и 123. Квадратами выделены основные позиции замен нуклеотидов.

## Частота делеций и нуклеотидных замен (SNPs) в последовательностях NTT CENH3 у родительских форм и гибридов

Растения	Количество клонов	Частота копий с делецией размером 21 п. н., %	Частота копий с делецией размером 66 п. н., %	Частота встречаемости SNP в позициях ORF, %												
				33	45	66	73*	82*	84*	99*	123	126	129	144	145*	
Родительские формы																
<i>Triticum aestivum</i> Triple Dirk D	20	5	30	0	7.7	7.7	0	61.5	61.5	23.1	53.8	0	7.7	15.4	0	
<i>Secale cereale</i> сорта Короткостебельная 69	19	5.3	21.1	7.1	0	14.3	7.1	14.3	14.3	14.3	21.4	21.4	0	42.9	7.1	
Пшенично-ржаные аллополиплоиды																
Растение № 1 (2n = 52)	16	0	18.8	15.4	0	46.2	0	0	0	38.5	0	23.1	0	69.2	15.4	
Растение № 2 (2n = 53)	15	0	20	0	0	25.0	16.7	0	0	33.3	0	33.3	0	50.0	8.3	
Растение № 3 (2n = 54)	13	7.7	7.7	9.1	0	36.4	0	9.1	9.1	27.3	9.1	9.1	0	54.5	9.1	
Растение № 4 (2n = 55)	18	0	22.2	7.1	0	14.3	7.1	7.1	7.1	14.3	14.3	35.7	0	35.7	7.1	
Растение № 5 (2n = 57)	18	11.1	16.7	15.4	0	23.1	0	0	0	23.1	0	7.7	0	61.5	15.4	
Родительские формы																
<i>S. cereale</i> сорта Верасень	16	0	6.3	0	0	0	73.3	0	0	0	6.7	80.0	0	13.3	0	
6× тритикале сорта Михась	15	13.3	13.3	27.3	0	18.2	9.1	0	0	18.2	0	27.3	0	36.4	18.2	
Секалотритикум																
× <i>Secalotriticum</i>	16	0	0	0	0	0	93.8	0	0	0	6.3	93.8	0	0	0	

Примечание. Частота копий с делециями (%) рассчитана относительно общего количества полученных для каждого образца клонов, содержащих полные последовательности NTT CENH3. Показаны позиции нуклеотидных замен, которые присутствуют только в последовательностях без делеций (216 п. н.), звездочкой указаны позиции несинонимичных замен, которые приводят к замене аминокислоты в белковой последовательности.

Две специфические для ржи замены в позициях 198 и 209 п. н., которые обнаружены в копиях с делецией 66 п. н., не встречаются в копиях без делеций. Наоборот, замены в полных копиях не обнаруживаются в последовательностях с делецией размером 66 п. н. Таким образом, сравнение полученных последовательностей NTT CENH3 родительских форм выявило наличие различий между пшеницей и рожью как в полных копиях NTT CENH3, так и в копиях, содержащих делецию размером 66 п. н.

Далее мы проанализировали, каким образом выявленные различия в последовательностях NTT CENH3 родительских форм проявляются в экспрессии гибридных геномов у растений пшенично-ржаных аллополиплоидов с различным числом хромосом. Оказалось, что копии с делецией размером 66 п. н. присутствуют у всех исследуемых растений, но только у растения, содержащего 57 хромосом, выявлены две специфические замены (позиции 198 и 209 п. н.), характерные для родительской формы ржи (рис. 1). Копии с делецией размером 21 п. н. были обнаружены у растений, имеющих 54 и 57 хромосом. В последовательностях NTT CENH3 без делеций наиболее часто встречается замена в позиции 144 п. н., которую обнаружили у всех пяти растений (от 35.7 до 69.2 % клонов у разных растений), также высокая частота замен отмечена в позициях 66 и 99 п. н. (см. таблицу). Кроме

того, у всех исследуемых растений выявлены копии, содержащие замены в позициях, специфических только для родительской формы ржи. Эти замены встречаются с разной частотой в последовательностях NTT CENH3, полученных для каждого растения. Замены в позициях 33 и 145 п. н. наиболее часто встречаются у растений № 1 и 5 (15.4 % клонов), в позиции 73 п. н. — у растения № 2 (16.7 %), в позиции 126 п. н. — у растения № 4 (35.7 %) (см. таблицу). Таким образом, все нуклеотидные замены, специфические для родительской формы ржи, присутствуют также в последовательностях NTT CENH3, синтезированных в геномах пшенично-ржаных аллополиплоидов.

Результаты анализа другой гибридной комбинации — секалотритикум, в которой материнской формой является рожь сорта Верасень, а отцовской — тритикале сорта Михась, показаны на рис. 2. Последовательности NTT CENH3 с делецией размером 66 п. н. выявлены у ржи (6.3 %) и тритикале (13.3 %) (см. таблицу). У ржи эта копия имеет две специфические замены в позициях 198 и 209 п. н., которые также обнаружены в последовательностях NTT CENH3 с такой же делецией у сорта ржи Короткостебельная 69 и 57-хромосомного растения пшенично-ржаных аллополиплоидов (рис. 1, 2). Последовательности с делецией 21 п. н. встретились только у тритикале Михась (13.3 %). Полные копии (216 п. н.) у ржи Вера-

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Ver_del2	ATGGCCCGCACCAAGCACCCGGCCGTGAGGAAGACCAAGGTGCCGCCAAGAAGAAGCTCGGGACGCGCCCTCGGGCGGACGACGCGGGCCAGGACACAG-----									
Ver_v2.2	ATGGCCCGCACCAAGCACCCGGCCGTGAGGAAGACCAAGGTGCCGCCAAGAAGAAGCTCGGGACGCGCCCTCGGGCGGACGACGCGGGCCAGGACACAGATGGCGC									
Ver_v3.1	ATGGCCCGCACCAAGCACCCGGCCGTGAGGAAGACCAAGGTGCCGCCAAGAAGAAGCTCGGGACGCGCCCTCGGGCGGACGACGCGGGCCAGGACACAGATGGCGC									
Ver_v4	ATGGCCCGCACCAAGCACCCGGCCGTGAGGAAGACCAAGGTGCCGCCAAGAAGAAGCTCGGGACGCGCCCTCGGGCGGACGACGCGGGCCAGGACACAGATGGCGC									
Mih_del1	ATGGCCCGCACCAAGCACCCGGCCGTGAGGAAGACCAAGGTGCCGCCAAGAAGAAGCTCGGGAC-----GGGGCGGACGACACAGATGGCGC									
Mih_del2	ATGGCCCGCACCAAGCACCCGGCCGTGAGGAAGACCAAGGTGCCGCCAAGAAGAAGCTCGGGACGCGCCCTCGGGCGGACGACGCGGGCCAGGACACAG-----									
Mih_v1.1	ATGGCCCGCACCAAGCACCCGGCCGTGAGGAAGACCAAGGTGCCGCCAAGAAGAAGCTCGGGACGCGCCCTCGGGCGGACGACGCGGGCCAGGACACAGATGGCGC									
Mih_v2.2	ATGGCCCGCACCAAGCACCCGGCCGTGAGGAAGACCAAGGTGCCGCCAAGAAGAAGCTCGGGACGCGCCCTCGGGCGGACGACGCGGGCCAGGACACAGATGGCGC									
Mih_v3.1	ATGGCCCGCACCAAGCACCCGGCCGTGAGGAAGACCAAGGTGCCGCCAAGAAGAAGCTCGGGACGCGCCCTCGGGCGGACGACGCGGGCCAGGACACAGATGGCGC									
Mih_v4	ATGGCCCGCACCAAGCACCCGGCCGTGAGGAAGACCAAGGTGCCGCCAAGAAGAAGCTCGGGACGCGCCCTCGGGCGGACGACGCGGGCCAGGACACAGATGGCGC									
Sctr_v2.2	ATGGCCCGCACCAAGCACCCGGCCGTGAGGAAGACCAAGGTGCCGCCAAGAAGAAGCTCGGGACGCGCCCTCGGGCGGACGACGCGGGCCAGGACACAGATGGCGC									
	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210
Ver_del2	-----GGGCAACTGGGCAACCCCAAGCAGAGGAATCCACACCGGTTCCAGGCCA									
Ver_v2.2	GGGCACGTCGGCGACACCGAGGCGAGCCGGCGGGCGGGCGCCAGGGCGGCTGAAGGGGCAACTGGGCAACCCCAAGCAGAGGAAGCCACACCGGTTTCAGGCCA									
Ver_v3.1	GGGCACGTCGGCGACACCGAGGCGAGCCGGCGGGCGGGCGCCAGGGCGGCTGAAGGGGCAACTGGGCAACCCCAAGCAGAGGAAGCCACACCGGTTTCAGGCCA									
Ver_v4	GGGCACGTCGGCGACTCCGAGGCGAGCCGGCGGGCGGGCGCCAGGGCGGCTGAAGGGGCAACTGGGCAACCCCAAGCAGAGGAAGCCACACCGGTTTCAGGCCA									
Mih_del1	GGGCACGTCGGCGACTCCGAGGCGAGCCGGCGGGCGGGCGCCAGGGCGGCTGAAGGGGCAACTGGGCAACCCCAAGCAGAGGAAGCCACACCGGTTTCAGGCCA									
Mih_del2	-----GGGCAACTGGGCAACCCCAAGCAGAGGAAGCCACACCGGTTTCAGGCCA									
Mih_v1.1	GGGCACGTCGGCGACTCCGAGGCGAGCCGGCGGGCGGGCGCCAGGGCGGCTGAAGGGGCAACTGGGCAACCCCAAGCAGAGGAAGCCACACCGGTTTCAGGCCA									
Mih_v2.2	GGGCACGTCGGCGACTCCGAGGCGAGCCGGCGGGCGGGCGCCAGGGCGGCTGAAGGGGCAACTGGGCAACCCCAAGCAGAGGAAGCCACACCGGTTTCAGGCCA									
Mih_v3.1	GGGCACGTCGGCGACTCCGAGGCGAGCCGGCGGGCGGGCGCCAGGGCGGCTGAAGGGGCAACTGGGCAACCCCAAGCAGAGGAAGCCACACCGGTTTCAGGCCA									
Mih_v4	GGGCACGTCGGCGACTCCGAGGCGAGCCGGCGGGCGGGCGCCAGGGCGGCTGAAGGGGCAACTGGGCAACCCCAAGCAGAGGAAGCCACACCGGTTTCAGGCCA									
Sctr_v2.2	GGGCACGTCGGCGACTCCGAGGCGAGCCGGCGGGCGGGCGCCAGGGCGGCTGAAGGGGCAACTGGGCAACCCCAAGCAGAGGAAGCCACACCGGTTTCAGGCCA									

Рис. 2. Нуклеотидные последовательности NTT *CENH3* родительских форм и гибрида секалотритикум.

Ver — *Secale cereale* Верасень, Mih — тритикале Михась, Sctr — секалотритикум. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1. Квадратом выделены основные позиции замен нуклеотидов. Замены в данных позициях подтверждены секвенированием нескольких клонов.

сень имеют замены в позициях 73 (73.3 % клонов), 123 (6.7 %), 126 (80 %) и 144 п. н. (13.3 %). У тритикале Михась также встречаются замены в позициях 73 (9.1 %), 126 (27.3 %) и 144 п. н. (36.4 %), и, кроме того, присутствуют копии с заменами в позициях 33, 66, 99 и 145 п. н. (см. таблицу). Таким образом, в полных копиях NTT *CENH3* родительских форм наивысшей частотой замен характеризуются позиции 73 и 126 п. н. у ржи Верасень, 144 п. н. — у тритикале Михась.

В полученных кломах кДНК гибридного растения секалотритикум последовательностей NTT *CENH3* с делециями не обнаружено. В полных копиях размером 216 п. н. выявлены замены в позициях 73 (93.8 % всех клонов), 123 (6.3 %), 126 п. н. (93.8 %) (см. таблицу). Замены в позициях 73 и 126 п. н. встречаются у обоих родителей (рис. 2), но у секалотритикум частота встречаемости этих замен в кломах превышает таковую у сорта ржи Верасень (93.8 против 73.3 % в позиции 73 и против 80 % в позиции 126). В еще большей степени она превышает таковую у тритикале Михась (93.8 против 9.1 % в позиции 73 и против 27.3 % в позиции 126) (см. таблицу). Такое превышение указывает на предпочтительный синтез полных копий NTT *CENH3*, характерных для родительской формы ржи, в геноме секалотритикум.

Суммируя результаты проведенного анализа, следует отметить, что в кодирующих последовательностях NTT *CENH3* выявлены полные копии размером 216 п. н., имеющие характерные позиции нуклеотидных замен, и последовательности с делециями размером 21 или 66 п. н. У родительских форм пшеницы и ржи последовательности с делецией 21 п. н. не имеют различий в структуре ДНК. Последовательности с делецией 66 п. н. у ржи имеют две специфические нуклеотидные замены, которые также были обнаружены у 57-хромосомного растения пшенично-ржаных аллополиплоидов. В полных последовательностях NTT *CENH3* у ржи присутствуют специфические замены, которые также были выявлены в полных последовательностях у всех проанализированных растений пшенично-ржаных аллополиплоидов. Эти результаты указывают на то, что в гибридных геномах анеуплоидов, возникших из октаплоидных тритикале, наблюдается

экспрессия копий гена *CENH3*, характерных для каждого родителя.

У секалотритикум не обнаружено копий NTT *CENH3* с делециями. В полных последовательностях выявлены две специфические для ржи нуклеотидные замены, частота встречаемости которых значительно превышает таковую у гексаплоидного тритикале сорта Михась, что указывает на предпочтительный синтез полных копий NTT *CENH3*, характерных для родительской формы ржи, в геноме секалотритикум.

Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН № 0310-2014-0002 и программы РФФИ и НАН Беларуси по финансированию совместных российско-белорусских проектов.

#### Список литературы

- Гордей И. А., Белько Н. Б., Люсиков О. М. 2011. Секалотритикум (*×Secalotriticum*): генетические основы создания и формирования генома. Минск: Беларус. наука. 214 с. (Gordey I. A., Belko N. B., Lyusikov O. M. 2011. Secalotriticum (*×Secalotriticum*): the genetic bases for the creation and formation of the genome. Minsk: Belarus. nauka. 214 p.)
- Chen Y., Baker R. E., Keith K. C., Harris K., Stoler S., Fitzgerald-Hayes M. 2000. The N terminus of the centromere H3-like protein Cse4p performs an essential function distinct from that of the histone fold domain. Mol. Cell. Biol. 20: 7037—7048.
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162: 156—159.
- De Tomasi J. A. 1936. Improving the technic of the feulgen stain. Biotech. Histochem. 11: 137—144.
- Henikoff S., Ahmad K., Malik H. S. 2001. The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. Science. 293: 1098—1102.
- Khalil H. B., Ehdavand M. R., Xu Y., Laroche A., Gulick P. J. 2015. Identification and characterization of rye genes not expressed in allohexaploid triticales. BMC Genomics. 16: 281—291.
- Lermontova I., Koroleva O., Rutten T., Fuchs J., Schubert V., Moraes I., Koszegi D., Schubert I. 2011. Knockdown of *CENH3* in *Arabidopsis* reduces mitotic divisions and causes sterility

by disturbed meiotic chromosome segregation. *Plant J.* 68 : 40—50.

Lermontova I., Schubert V., Fuchs J., Klatter S., Macas J., Schubert I. 2006. Loading of *Arabidopsis* centromeric histone CENH3 occurs mainly during G2 and requires the presence of the histone fold domain. *Plant Cell.* 18 : 2443—2451.

Pearson W. R., Lipman D. J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 85 : 2444—2448.

Sanei M., Pickering R., Kumke K., Nasuda S., Houben A. 2011. Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 108 : 498—505.

Поступила 1 XII 2015

#### CHARACTERIZATION OF CENTROMERIC HISTONE H3 VARIANTS IN ALLOPOLYPLOIDS OF WHEAT AND RYE

Yu. A. Lipikhina,<sup>1</sup> E. V. Evtushenko,<sup>1</sup> S. S. Gatskaya,<sup>1</sup> P. I. Stepankin,<sup>2</sup> O. M. Lyusikov,<sup>3</sup>  
I. A. Gordey,<sup>3</sup> A. V. Vershinin<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup> Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, 630090,

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, 630090,

and <sup>3</sup> Institute of Genetics and Cytology NAS, Minsk, 220072;

\* e-mail: avershin@mcb.nsc.ru

Chromosome elimination of one parental species in hybrid cell observed even after successful fertilization is one of a common phenomenon and the main problems of remote hybridization. Centromeres regulate the process of faithful segregation of chromosomes during cell division. Constant component of the centromeric chromatin is a specialized histone H3 modification (CENH3). CENH3 consists of a conserved C-terminal domain (HFD) and a more variable N-terminal tail (NTT), which plays an important role for CENH3 loading in centromeric chromatin during cell division. In the present study, we performed comparative analysis of *CENH3* variants expression in allopolyploids, as well as in different parental varieties of rye (*Secale cereale* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). The varieties of both genera were used as maternal plants. In the coding sequences of the NTT *CENH3* we identified the full-length copies of 216 bp with characteristic single nucleotide polymorphisms (SNPs), and copies with 21 bp or 66 bp deletions. The wheat and rye NTT *CENH3* copies with 21 bp deletion have not differences in the nucleotide sequences, the rye copies with 66 bp deletion reveal two specific SNPs, which were also found in plant of wheat-rye allopolyploids having 57 chromosomes. The full-length sequences of rye NTT *CENH3* show specific SNPs, which were also detected in the full-length sequences of all analyzed plants of wheat-rye allopolyploids. These results indicate that expression of *CENH3* copies belonging to each parent was observed in hybrid genomes of aneuploids which arose from octoploid triticales. The NTT *CENH3* copies with deletions were not found in secalotriticum ( $\times$ *Secalotriticum*). The full-length sequences show two rye specific SNPs. Their frequency in secalotriticum significantly exceeds that in hexaploid triticales Mikhas. This fact points to the preferential synthesis of the full NTT *CENH3* copies of the rye parental variety in the secalotriticum genome.

Key words: centromeric histone H3 (CENH3), gene expression, allopolyploids, rye, wheat.