

результат усиления взаимодействия между миозиновыми головками. Более строгое доказательство этого положения позволило бы лучше разобраться в структурных аспектах работы миозинового мостика.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Леднев В. В. В сб.: Механизмы контроля мышечной деятельности. 101—123, Л., 1985.
2. Тикунев Б. А. Биолог. ж. Армения, 39, 3, 196—200, 1986.
3. Тикунев Б. А. Биолог. ж. Армения, 41, 5, 383—388, 1988.
4. Тикунев Б. А. В сб.: Биохимия и биофизика биологической подвижности. 34, Тбилиси, 1987.
5. Тикунев Б. А. Биофизика, 24, 2, 319—321, 1989.
6. Тикунев Б. А. Биофизика. (в печати).
7. Чачикян А. М., Эвма В. Л., Трезубов В. С., Омельянюк В. С., Маренич В. А. В сб.: Биохимия мышц. 105—106, Телави, 1985.
8. Шиндров Э. Л., Каличиенко Л. П., Борисова М. А., Пермяков Е. А. В сб.: Биохимия мышц. 118, Телави, 1985.
9. Fahlsto F., Fahlst A. J. *Physiol.*, 75, 463—505, 1979.
10. Greene L. E. *Biochem. J.* 29, 2120—2126, 1981.
11. Fuhrstad A., Högberg T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79, 958—962, 1982.
12. Schaub M. C., Partridge G., Perry S. V. *Biochem. J.*, 107, 263—269, 1967.
13. Shterick K. T., Thomas L. L., Albert N. R. *Biophys. Biochim. Acta*, 393, 124—133, 1975.
14. Spector T. *Anal. Biochem.*, 85, 142—146, 1978.
15. Weber K., Osborn M. J. *Biol. Chem.*, 244, 4400—4411, 1969.

Поступило 27.III 1989 г.

Биолог. ж. Армения, № 6 (42) 1989

УДК 577.963.3

### К ИССЛЕДОВАНИЮ НЕКОТОРЫХ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ДНК ЗЛАКОВЫХ

Л. А. МИНАСБЕКЯН, П. О. ВАРДЕВАНЯН, А. Г. СИМОНЯН, Г. А. НАПОСЯН  
ИЭБ АН АрмССР, Ереванский государственный университет, кафедра биофизики

Методом термической денатурации ДНК, изолированных из сухих эмбрионов семян злаков пшеницы сортов Безостая-1, Воскеаск и Армянка-60, а также из полбы сорта Аршалуйс и тритикале сорта СпС 1, было показано, что имеются как межвидовые, так и внутривидовые различия между исследуемыми сортами пшеницы и других злаков. Они различаются по температурам плавления, профилям дифференциальных кривых плавления и содержанию ГЦ-пар.

Յորենազգիների՝ *Քերաստյա -1*, *Ուզնեակ* և *Արմյանկա -60* սորտերի ջորենների, ինչպես նաև *Արշալույս* սորտի հունարի և *Սիս -1* տեկակի տրիտիկալի սկզբների շար սաղմերից ստացված ԳՆԹ-ների թերմիկ զենատուրացիայի մեթոդի միջոցով ցույց է տրված, որ ուսումնասիրվող ջորենի տեսակների և այլ ջորենազգիների միջև զույտից ունեն ինչպես ներտեսակային, այնպես էլ միջտեսակային տարբերություններ, նրանք տարբերվում են չափան ջերմաստիճանով, չափան զիֆերենցիալ կորերի պրոֆիլներով և ԳՑ-զույգերի պարունակությամբ:

DNA was isolated from dry embryos of cereals seeds, from Bezostaya-1, Voskehask and Armiyanka sorts of wheats and from Arshaluy's sort of *Tr. dicoccum* and Sis-1 sort of triticity. Interspecific differences were shown, as well as intraspecific ones between the studied sorts of wheats and other cereals by thermal denaturation method. These sorts differed by melting curve profiles and G—C pair content.

Злаки—ДНК—плавление—GC-содержание.

Методы молекулярной биологии дают возможность исследовать изменения, происходящие в геноме растений, в зависимости от факторов внешней среды, возраста растений, дифференциации тканей и др.

На родах *Phaseolus*, *Brassica* и др. показано, что их ядерные ДНК характеризуются асимметричным распределением в градиенте плотности хлористого цезия, что свидетельствует о гетерогенности ДНК по нуклеотидному составу [1]. На основании этого можно предположить, что высшие растения с асимметричным характером распределения ядерной ДНК являются древними аллополиплоидами, возникшими на основе гибридизации растений с различным нуклеотидным составом ядерных ДНК. Примером тому могут служить гексаплоидные пшеницы с формулой генома AABBDD, которые являются аллогексаплоидами с одним геномом диплоидных пшениц (геном А) и двумя геномами *Aegilops* (геномы В и D).

Результаты исследований Флавега [5] показали, что геномы *Triticum* и разных видов *Aegilops* имеют некоторые различия, позволяющие отличать геномы диплоидных родителей от гексаплоидных пшениц. ДНК высших растений [10] обладает различными семействами повторяющихся последовательностей и количеством их. Каждое семейство повторяющихся последовательностей ДНК в основном имеет различный состав оснований и ведет себя как кооперативно плавящееся «бляшка» при плавлении. Обнаружены сортовые различия в частоте повторения фракций, уникальной ДНК пшеницы при очень широком варьировании частоты повторения у разных сортов [3], в то же время не выявлены межсортовые различия в температуре плавления, содержании азотистых оснований и др. [2]. К тому же необходимо отметить количественные различия в генетической информации между сортами и линиями мягкой пшеницы [4], диплоидных и тетраплоидных видов, включая *Triticum monoccum* и *Triticum timopheevii* [6, 7], а также внутривидовые изменения в сортах с различной плоидностью [8].

Цель настоящей работы состояла в выявлении методом термической денатурации особенностей в кривых плавления различных сортов пшениц, а также полбы и тритикале в пределах семейства и в определении параметров, характеризующих эти различия.

**Материал и методика.** Получение растительного материала и выделение ДНК. Препараты ДНК получали из сухих эмбрионов пшеницы сортов Безостая-1, Армянка-60, Воскевск, тритикале сорта СиС 1 и полбы сорта Аршалуйс. Эмбрионы из семян злаков изолировали по методу Джонстона-Штерна. ДНК из сухих эмбрионов семян, измельченных в ступке, получали по методике Мармура [9] в буфере, содержащем 0,15 М NaCl, 0,1 М ЭДТА, 0,15 М цитрат.

Na и 0,1 M трис-НCl. Депротеинизацию проводили смесью изоамил-хлороформ, с последующей обработкой рибонуклеазой, диастазой и протазой. Дальнейшую очистку препарата проводили в NaCl и SDS. Чистоту полученных препаратов проверяли спектрофотометрически, она соответствовала оптическим параметрам по Мармуру [9]. Выделение препаратов ДНК проводили восемь раз для каждого сорта пшеницы и ячменя.

**Термическая денатурация молекул ДНК.** Термическую денатурацию ДНК проводили на SP-8-100 спектрофотометре (Pye Unicam, England) при концентрациях 20—30 мкг/мл в 0,1XSSC в кварцевых кюветках, герметически закрытых тefлоновыми пробками. Нагревание осуществляли температурным программным устройством с линейной скоростью нарастания 0,25 град/мин. Поглощение ( $A_{260}$ ) регистрировали на программируемом микроконтроллере ИР-978 1,0. Первую производную поглощения вычисляли следующим образом. Вначале находили промежутки возрастания и убывания дифференциальной кривой плавления, затем, используя полученную информацию, на основе ортогональных многочленов Чебышева строили искомую кривую. Вычисления производили на компьютере «Электроника У-5» (СССР).

Среднее содержание ГЦ-пар ДНК определяли по ранее предложенному методу по формуле [12].

**Результаты и обсуждение.** Вопрос о схожести и возможных различиях между геномами высших растений и пределах вида давно исследуется учеными. Методом равновесного ультрацентрифугирования в градиенте плотности CsCl были исследованы ядерные ДНК *T. monoccoccum*, (геном А), *Triticum polazo-colch.* (геномы А и В) и *Aegilops squarrosa* (геном Д), а также *Secale cereale* и межродовых гибридов *Triticum-Aegilops* и *Triticum-Secale*. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии различий между ядерными ДНК отдельных видов и межродовых гибридов подтрибы *Triticinae* в пределах чувствительности этого метода. Метод термической денатурации оказался в этом отношении достаточно чувствительным. Нам выявлены различия как межвидовые в пределах подтрибы *Triticinae*, так и внутривидовые. Наиболее интересным нам представляется тот факт, что они различаются как по температурам плавления (табл.), так и по профилям ДКП (рис.). Это можно интерпретировать как изменение состава отдельных участков ДНК от одного вида к другому. К подобным выводам склоняются также и авторы работы [10], в которой методом термической денатурации показано, что *Zea mays*, *Pisum* и *Solanum tuberosum* плавятся как дискретные, кооперативно плавящиеся сегменты с различным составом оснований. Эти сегменты или блоки различаются по среднему содержанию ГЦ-пар.

На (рис. а) представлена дифференциальная кривая плавления ДНК пшеницы сорта Безостая-1, характерный интервал плавления которой составляет  $\Delta T = 11,8^\circ$ , что указывает на гетерогенный состав ДНК. Пшеница сорта Безостая-1 относится к гексаплоидным пшеницам со сложным геномом AABBDD. Некоторые авторы доказывают, что доноры цитоплазмы для пшениц с геномами AABBDD, AABB и AACCC являются *Aegilops longissima*, *Aegilops aucheri* [11].

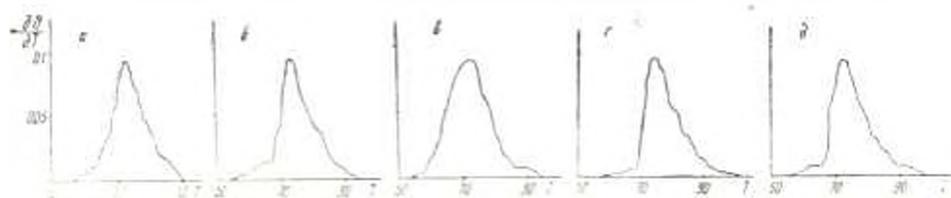
На (рис. б и в) представлены соответственно дифференциальные кривые плавления пшеницы Воскояск и Армянка-60, которые хотя и имеют одинаковые цитоплазмы, однако все же качественно различаются по геномам на субмолекулярном уровне, по температуре плавления

ния, интервалу плавления, ядерной ДНК и по форме дифференциальной кривой плавления. Полученные различия между гексаплоидными пшеницами наводят на мысль о неодинаковых источниках происхождения их геномов А, В, Д.

**Характеристики ДНК различных сортов пшеницы и других злаков**

п/п	Наименование	Формула генома	T (в град.)	T (в град.)	% ГЦ
1.	Безостая-1	ААВВDD	73,7±0,2	31,8	49,0
2.	Воскеаск	ААВВDD	73,0±0,3	12,1	47,1
3.	Армянка-60	ААВВDD	72,3±0,2	12,2	46,0
4.	Сис-1	ААВВRR	72,8±0,1	12,0	47,0
5.	Аршалауэс	ААВВ	74,3±0,2	12,3	50,1

Имеются отличия в формах ДКП ДНК полбы и тритикале В наших экспериментах была использована черноколосая белозерная полба сорта Аршалауэс с формулой генома ААВВ и тритикале с формулой генома ААВВRR. По всей видимости, появление нового по качеству генома RR и приводит к увеличению низкотемпературного пика плавления и общему понижению температуры плавления, а в области высоких



Дифференциальные кривые плавления ДНК злаковых: Безостая-1, Воскеаск (б), Армянка-60 (в), полба (г) и тритикале (д)

температур имеющиеся пики на ДКП ДНК полбы для ДКП ДНК тритикале сглаживаются. В результате общий профиль кривой ДКП ДНК тритикале Сис-1 смещается в область низких температур. По всей видимости, геному RR присуще количественное преобладание блоков с большим содержанием АТ-пар. Температура плавления для полбы равна  $T_m = 74,3^\circ$ , т. е. на  $1,3^\circ$  больше, чем для пшеницы Воскеаск и Безостая-1, и на два градуса больше, чем для пшеницы сорта Армянка-60.

Появление трех выраженных пиков в области высоких температур свидетельствует о более высоком содержании ГЦ-пар в этой ДНК. И, наконец, промежуточное положение занимает ДКП тритикале сорта Сис-1. Температура плавления ДНК тритикале в наших опытах  $T = 72,9^\circ$ , т. е. приблизительно такая же, как и у гексаплоидных пшениц, хотя и различается по профилю ДКП.

Для всех исследуемых нами злаковых интервал плавления приблизительно равняется ( $\Delta T = 12 \pm 0,2^\circ C$ ) для каждого сорта, данные приведены в таблице.

Среднее содержание ГЦ-пар ( $\bar{x}$ ) ДНК определяли по формуле [12]:

$$\bar{x} = 1 - \frac{S}{T_{ГЦ} - T_{АТ}}$$

где  $S$ —площадь под интегральной кривой плавления ДНК, которая вычисляется в интервале плавления от  $T_{АТ}$  до  $T_{ГЦ}$ ;  $T_{АТ}$  и  $T_{ГЦ}$  температуры плавления поли- $d$  (АТ) и поли- $d$  (ГЦ) тимополимеров соответственно.

Данные, обобщенные в таблице, показывают, что существуют различия не только между злаками в пределах подтрибы *Triticinae*, различающимися между собой по пloidности геномов, но и между пшеницами со схожими геномами.

Таким образом, установлено, что ДНК пшеницы сортов Воскесак, Безостая-1 и др. с формулой генома AABB.DD отличаются друг от друга как по форме дифференциальных кривых плавления, так и по среднему содержанию азотистых пар оснований.

Авторы выражают благодарность д. б. н., профессору Гандияну П. А. за именные советы и ценные указания.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Беридзе Т. Г., Гордизе А. Д. Генетика, 9, 11, 172–174, 1973.
2. Дискалик А. П., Остапюк А. П. и др. Физ. и биол. культ. раст. 13, 5, 513–518, 1981.
3. Сивовин Ю. М., Дьяченко Л. Ф., Новогелов А. Н. Молекулярная биология, 11, 4, 877–881, 1977.
4. Carozza M. L., Giorgi L., Cremonini R. Z. Pflanzenzucht, 84, 254–293, 1980.
5. Flavell R., O'Dell M. Heredity, 42, 3, 309–322, 1973.
6. Furuta Y., Nishikawa K., Taniguchi T. Japan J. Genetics, 49, 4, 179–187, 1974.
7. Furuta Y., Hagi T., Nishikawa R. Wheat Int. Serv., 40, 15–16, 1975.
8. Liang G., Wang A., Phillips R. Canad. J. Genet. Cytol., 19, 425–435, 1977.
9. Marmur J. Mol. Biol., 3, 209, 1961.
10. Pivce L., Horsca P. BBA, 340, 199–207, 1974.
11. Tsunewaki, Genetics, 155–171, 1983.
12. Vardevanyan P. O., Panosyan G. N., Tiratsuyan S. G., Babayan Yu. S., Vardapetyan R. R. Studia biophysica, 97, 3, 209–212, 1983.

Поступило 5.X 1988 г.