

М.З. АНТОНЮК, Д.О. ПРОКОПИК,
В.С. МАРТИНЕНКО, Т.К. ТЕРНОВСЬКА
Національний університет «Києво-Могилянська академія», Київ
E-mail: tern@ukma.kiev.ua

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНІВ – ПРОМОТОРІВ ОСТИСТОСТІ В ІНТРОГРЕСИВНОЇ ЛІНІЇ *TRITICUM AESTIVUM/AEGILOPS UMBELLULATA*



Виконано генетичний аналіз інтрогресивних ліній *Triticum aestivum/Aegilops umbellulata* щодо ознаки остистість колоса. За даними вивчення ліній і гібридів за остистістю та спектрами мікросателітних компонентів запропоновано дигенну модель контролю ознаки з геном – інгібітором остистості *B1 (5AL)* та геном – промотором остистості *Awn1*, локалізованим у хромосомі *6U* егілопсу зонтичного. Хромосома *5A* остистої лінії перебудована відносно такої ж хромосоми генотипу сорту Аврора, і відстань між *SSR*-локусом *Xwtc705-5AL* та перебудованим фрагментом чи локусом *B1/b1* визначено як *15,5 cM*.

© М.З. АНТОНЮК, Д.О. ПРОКОПИК,
В.С. МАРТИНЕНКО, Т.К. ТЕРНОВСЬКА, 2012

Вступ. Відомо, що на хромосомах м'якої пшениці локалізовано три гени, які беруть участь у контролі ознаки остистість, причому домінантні алелі кожного з цих генів пригнічують розвиток остей *Hd (4AS)*, *B1 (5AL)*, *B2 (6BL)* [1]. Наявність остей – ознака рецесивна. Домінантні алелі кожного з вказаних генів інгібують розвиток остей у різній мірі. Присутність принаймні двох домінантних генів повністю пригнічує утворення остей [1, 2]. У диплоїдних та тетраплоїдних пшениць остистість може домінувати над безостістю [3], хоча гени – промотори остистості дотепер не ідентифіковано. Ген, який контролює утворення остей у рослин виду *T. durum*, було локалізовано нами на хромосомі *6B* за фактом зчеплення з мікросателітним локусом *Xbarc178*, розташованим на цій хромосомі [4]. Досі не ідентифіковані та не локалізовані гени – промотори остистості у м'якої пшениці.

Озимий сорт м'якої пшениці Аврора (*Triticum aestivum*, AABBD), джерело субгеномів АВ геномно-заміщеної форми Аврората (AAB-VUU), є безостим. За даними Арбузової (1994, цит. за [1]), він має ген *B1*. Сорт Кавказ, сестринська лінія сорту Аврора [5], яка відрізняється від сорту Аврора тільки за датою колосіння, містить у хромосомі *6D* ген – промотор розвитку остеподібних відростків, *b_n*, гіпостатичний до гена *B1* [6]. Скоріш за все сорт Аврора також має цей ген. Про вплив хромосоми *6D* на розвиток остей повідомлялось для сорту м'якої пшениці Казахстанська 126 [7].

Колос виду *Aegilops umbellulata* (UU) остистий, отже він має якийсь ген – промотор остистості. Амфідиплоїд Аврората, що об'єднує геноми АВ та U, має остеподібні відростки, тобто за розвитком остей відрізняється від сорту Аврора наявністю остеподібних утворень, а від виду егілопсу – більш слабким їхнім розвитком. Отже геном цього егілопсу має промотор остистості і не має домінантних інгібіторів остистості. Розвиток на колосі Аврората остеподібних відростків свідчить про те, що інгібітор *B1* геному Аврори не є повністю епістатичним стосовно промотора остистості егілопсу, який позначимо як *Awn1*.

Інші геномно-заміщені амфідиплоїди, що об'єднують субгеноми АВ та геном диплоїдного спорідненого виду, також мають більш слабкий розвиток остей, ніж вид – донор

третього субгену амфідиплоїду. Це Авроале (AABBRR), R від остистого *Secale cereale* L., Авродес (AABBSS), S від остистого *Ae. speltoides*, Аврозис (AABBS^{sh}S^{sh}), S^{sh} від остистого *Ae. sharonensis* [8]. Отже, ген *B1* поводить, як ген з неповним домінантним епістазом стосовно генів – промоторів остистості чужинного походження. Повністю безостим є амфідиплоїд Авротика (AABBTT), третій субгену якого, T, отримано від безостого виду *Ae. mutica* [8].

Метою даної роботи було ідентифікувати ген – промотор остистості, наявний в інтрогресивній лінії *Triticum aestivum/Aegilops umbellulata*.

Матеріали та методи. Інтрогресивні лінії *res206* та *res211* походять від схрещування геномно-заміщеної форми Авролата (геном AABB^{uu}, AABB – тетраплоїдний компонент м'якої пшениці *Triticum aestivum* озимого сорту Аврора, UU – геном диплоїдного виду *Aegilops umbellulata*) з генотипом Аврора (AABBDD). Цитологічно стабільні, вони мають 42 хромосоми з двома супутниковими хромосомами. Для встановлення генетичного контролю остистості було отримано та вивчено гібридні популяції F₁, F₂ та F₃ від схрещування ліній *res206* та *res211*, а для характеристики структури геному щодо наявності чужинних включень – хромосомні конфігурації у метафазі I мейозу материнських клітин пилку (MI МКП) гібридів *res206* × Аврора, *res211* × Аврора.

Рослини вихідних генотипів (Аврора, Авролата, *res206*, *res211*) та гібридів F₁, F₂ та F₃ за ознакою остистості були віднесені до одного з трьох класів – безості, остисті, з остеподібними відростками (рисунок). Колос лінії *res206* остистий, лінії *res211* – безостий. Аврора має безостий колос, колос Авролати характеризується слабо розвиненими остями, які ми називаємо остеподібними відростками, *Ae. umbellulata* має остистий колос.

Вихідні генотипи та гібриди F₁ і F₂ було оцінено за електрофоретичним спектром компонентів ампліфікації з праймерами мікросателітних локусів, специфічних, за даними оригінальних, до хромосом 5A, 6B та 6D (список наведено у табл. 2). ДНК виділяли з паростків насінин (вихідні генотипи) та з листків рослин, що вегетують, після коло-

сіння (гібриди F₁ та F₂) за допомогою СТАВ-буфера [9]. Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 50 мкл містила: 250 нМ кожного праймера, 50 нг ДНК, 0,2 мМ dATP, dCTP, dTTP, dGTP; 1,5 мМ MgCl₂; 2 од. Таq-полімерази («Fermentas», Литва) з буфером, рекомендованим виготовником. Умови проведення ПЛР відповідали рекомендаціям оригінальних мікросателітних локусів [10–12]. Електрофорез продуктів ампліфікації проводили у денатуруючому ПААГ.

Результати досліджень та їх обговорення. Лінії *res206* та *res211* через своє походження можуть містити у геномі якийсь обсяг чужинного хроматину. Лінія *res211* за остистістю не відрізняється від сорту Аврора, отже немає підстав вважати, що вона відрізняється від Аврори за генами *B1* та *b_n*. Остиста лінія *res206*, по-перше, отримала від егілопу промотор остистості *Awn1* у складі цілої хромосоми егілопу чи транслокації хромосоми егілопу на хромосому пшениці. Беручи до уваги склад геномів вихідних генотипів, схрещування яких дало початок інтрогресивним лініям AABB^{uu} та AABBDD, варто очікувати, що заміщення хромосом перш за все відбулося за хромосомами геному D. Проте Авролата, яка через свою геномну конституцію обов'язково містить промотор остистості *Awn1*, характеризується колосом з остеподібними відростками. Отже, ген *Awn1* пригнічується (піддається епістазу) інгібітором остистості *B1* геному Аврори (хромосома 5A). Щоб бути остистою, лінія *res206* має відрізнятися від Авролати за ге-



Колосся пшениці з остеподібними відростками (зліва), безості (у центрі), остисті (справа)

ном *В1*. Можливі два варіанти виникнення такої різниці: лінія *res206* має делецію термінальної ділянки довгого плеча хромосоми 5A, де локалізований ген *В1*; у гені *В1* відбулася мутація під час геномних перебудов, які супроводжували процес становлення інтрогресивної лінії, оскільки він не експресується.

Первинну інформацію про великі структурні зміни геному всередині інтрогресивних ліній стосовно геному реципієнтного генотипу ми отримуємо через вивчення хромосомних конфігурацій у М1 МКП гібридів між інтрогресивними лініями чи між інтрогресивними лініями та реципієнтним сортом [13]. Лінія *res211* при схрещуванні з Авророю не демонструвала відмінностей у хромосомному наборі стосовно Аврори (табл. 1). Серед 97 МКП з метафазами 78 мали 21 закритий бівалент (21^{Пз}), 11 — 20^{Пз} та 8 — 19^{Пз}.

Геном лінії *res206*, за даними вивчення мейозу, характеризується декількома змінами стосовно геному Аврори. Два облігатних уніваленти, тобто такі, що присутні у всіх метафазних пластинках, свідчать про наявність в геномі лінії або заміщеної чужинної хромосоми, або великої хромосомної перебудови, такої як транслокація за участі чужинної хромосоми. В той же час вивчення метафази мітозу показує відсутність телоцентричних хромосом, дицентриків. У частині метафаз кількість унівалентів зростає до 4, і це підтверджується максимальною кількістю мікроядер у тетрадах (табл. 1).

Для перевірки припущення про перебудову хромосом, що містять задіяні у контролі остистості гени, в інтрогресивних ліній сто-

совно хромосом генотипу Аврора було використано мікросателітний аналіз із застосуванням мікросателітів, специфічних до хромосом 5A та 6B, в яких локалізовані відомі інгібітори остистості у м'якої пшениці *В1* та *В2*, а також хромосоми 6D, оскільки, за нашими попередніми даними [6, 14], в цій хромосомі розташований промотор остистості *b_n* (табл. 2).

За результатами порівняння спектрів ампліфікації, які утворює геномна ДНК Аврори, Авролати та двох інтрогресивних ліній з праймерами мікросателітних локусів, що за даними оригінальних є специфічними для хромосоми 6B, очікувані результати отримали з праймерами локусів *Xwmc105-6B*, *Xbarc178-6B*, *Xbarc24-6B*, *Xgwm219-6B*. Продукти ампліфікації всіх чотирьох зразків не відрізнялися один від одного. Для двох інших SSR-локусів результати не були очікуваними. Праймери локусу *Xbarc134-6B* з ДНК інтрогресивних ліній утворюють три компоненти замість одного, притаманного геному Аврори та Авролати. У випадку якоїсь перебудови хромосоми 6B у наших лініях, це не стосується остистості, оскільки лінії контрастні за цим фенотипом. Праймери локусу *Xcfa2110-6B* дали різні результати ампліфікації у всіх чотирьох зразках, навіть для Аврори та Авролати.

Продукти ампліфікації ДНК чотирьох вивчених форм з праймерами локусів *Xwmc110-5A* та *Xwmc2155-5A* були однаковими, а з праймерами локусів *Xwmc705-5AL* та *Xbarc141-5A* ДНК лінії *res206* ампліфікації не дала на відміну від ДНК Аврори, Авролати та лінії *res211*. Локуси *Xwmc705-5AL* та *Xbarc141-5A* карто-

Таблиця 1

Результати вивчення хромосомних конфігурацій у М1 МКП гібридів між інтрогресивними лініями та сортом Аврора

Гібриди F ₁	Кількість МКП з метафазами/тетрадами	Розмах кількості					
		бівалентів		унівалентів	мультивалентів		мікроядер у тетрадах
		закритих	відкритих		тривалентів	квадривалентів	
<i>res211</i> × Аврора	97/46	19–21	0–2	0–1	0–1	0	0–1
<i>res206</i> × Аврора	105/36	16–20	2–4	2–5	0–1	0	0–1
<i>res211</i> × <i>res206</i>	56	17–20	2–4	2–3			

вані на довгому плечі хромосоми 5A, так само як ген – інгібітор остистості *BI*, хоча і на деякій відстані від нього [15]. Отримані дані свідчать на користь припущення про делецію термінальної ділянки плеча 5AL або його перебудову. В обох випадках у МІ мейозу може спостерігатися гетероморфний або відкритий бівалент або два уніваленти замість нього.

З десяти перевірених SSR-локусів хромосоми 6D чотири виявились неспецифічними для неї. Два з них, *Xbarc132-6D*, 188-6D, да-

вали продукт ампліфікації, такий як у Аврорі чи інший, при застосуванні ДНК Авролати як матриці. Праймери локусів 287-6D та *Xcfd33-6D* не дали продуктів ампліфікації з генотипом Аврори, який має геном D, хоча останній з двох дав продукти ампліфікації з іншими генотипами, що досліджуються. Шість праймерів локусів хромосоми 6D виявились специфічними для цієї хромосоми і дали продукти ампліфікації з ДНК Аврори та лінії *res211*, але не з ДНК Авролати та лінії *res206*. Отже при-

Таблиця 2
Результати ампліфікації геномної ДНК інтрогресивних ліній та вихідних при їхньому створенні форм з праймерами різних мікросателітних локусів

SSR-локус та хромосома	Відносна (щодо Аврори) характеристика електрофоретичних компонентів при ампліфікації геномної ДНК			
	Аврори	Авролати	лінії <i>res206</i>	лінії <i>res211</i>
<i>Xbarc141-5A</i>	Поодинокий	Як у Аврори слабкий	Немає	Як у Аврори
<i>Xwmc705-5AL</i>	Поодинокий слабкий	»	»	»
<i>Xwmc410-5A</i>	Поодинокий	Немає	Як у Аврори слабкий	»
<i>Xwmc110-5A</i>	»	Як у Аврори	Av	»
<i>Xcfa2155-5A</i>	»	»	»	»
<i>Xwmc105-6B</i>	»	»	»	»
<i>Xbarc134-6B</i>	»	»	Три специфічні компоненти	Три специфічні компоненти
<i>Xbarc24-6B</i>	»	»	Av	Як у Аврори
<i>Xbarc178-6B</i>	»	»	»	»
<i>Xcfa2110-6B</i>	»	Поодинокий специфічний	Немає	Як у Аврори та Авролати
<i>Xgwm219-6B</i>	»	Як у Аврори	Av	Як у Аврори
<i>Xcfd132-6D</i>	Поодинокий слабкий	»	»	Як у Аврори слабкий
<i>Xcfd33-6D</i>	Немає	Поодинокий специфічний	Як у Авролати	Немає
<i>Xcfd76-6D</i>	»	Немає	Немає	Як у Аврори
<i>Xcfd60-6D</i>	»	»	»	»
<i>Xcfd188-6D</i>			Всі спектри різні	
<i>Xcfd5-6D</i>	»	Немає	Як у Аврори слабкий	Немає
<i>Xcfd49-6D</i>	»	»	Немає	Поодинокий специфічний
<i>Xcfd45-6D</i>	»	»	»	Як у Аврори
<i>Xcfd95-6D</i>	»	»	»	»
<i>Xcfd287-6D</i>	Немає	»	Поодинокий	Немає

родним виявилось припущення, що лінія *res206* має заміщення 6D/6U, чим і пояснюється наявність двох облігатних унівалентів у МІ мейозу МКП гібридів *res206* × Аврора та *res211* × *res206*.

За результатами мікросателітного аналізу геном лінії *res206* має деякі відмінності від геному сорту Аврора. Хромосома 5A не дає продуктів ампліфікації з праймерами двох мікросателітних локусів, *Xwmc705-5A* та *Xbarc141-5A*, специфічними до її довгого плеча, де розташований ген – інгібітор остистості *BI*. Це може свідчити на користь припущення про делецію термінальної ділянки 5AL з геном *BI* та вказаними мікросателітними локусами, проте не виключає перебудову відповідної ділянки хромосоми з втратою функції гена *BI*. Замість хромосоми 6D сорту Аврора в геномі лінії у наявності хромосома 6U від *Ae. umbellulata*, остистого донора субгеному U штучного гексаплоїда Аврлата (AABBUU), від якого веде своє походження остиста лінія *res206*, отже, саме хромосома 6U має містити ген – промотор остистості *Awn1*. Ген не рецесивний, оскільки Аврлата має яскраво виражені остеподібні відростки, розвиток яких має контролюватися геном-промотором із субгеному U. Геном лінії *res211* не змінений відносно геному Аврори за тими хромосомами, які ми досліджували.

За результатами оцінки ліній та їхніх гібридів ми припускаємо, що лінії мають такі генотипи щодо генів, які беруть участь у контролі ознаки остистість колоса: лінія *res206* – *b1b1* (або *delBI delBI*) (5A) *Awn1 Awn1* (6U), лінія *res211* – *B1B1* (5A) *b_nb_n* (6D), де *BI* – доміантний інгібітор остистості сорту Аврора, локалізований у хромосомі 5A, *Awn1* – доміантний промотор розвитку остей, наявний у хромосомі 6U та гіпостатичний до гена *BI*, у присутності останнього ості редукуються до добре виражених остеподібних відростків, *b_n* – промотор остеподібних відростків, які розвиваються тільки у відсутності доміантного алеля *BI*. Оскільки *b_n* розташований у хромосомі 6D, гомеологічній до 6U, можна припустити його алельність до *Awn1* та позначити як *awn1*.

Гібриди F₁ від схрещування *res206* × *res211* характеризуються колосом з остеподібними відростками. Серед нащадків F₂ від дигіб-

ридного схрещування гени – інгібітори і промотори остистості та остеподібних відростків будуть зустрічатися в різних комбінаціях та мають сформувати наступні співвідношення між фенотиповими класами: 9 частин *BI-Awn1* та 1 частина *b1b1 awn1 awn1* – колос з остеподібними відростками, 3 частини *BI-awn1 awn1* – колос безостий, 3 частини *b1b1 Awn1* – колос остистий. Фактично спостерігали 25 безостих, 15 остистих та 37 з остеподібними відростками, що не відповідає очікуваному співвідношенню ($\chi^2 = 10,32$, $p < 0,01$).

Хоча ознака остистість колоса поза всяким сумнівом вважається якісною та такою, що піддається альтернативній оцінці, але її оцінка не завжди є однозначною в тому плані, що впевнено відрізнити остистий фенотип від напівостистого, коли остеподібні відростки виражені добре, не завжди можна. Легко також помилитися та віднести до безостих форм рослини із слабо вираженими остеподібними відростками (рисунок). Перевірити, чи правильно оцінено фенотип рослини F₂, можливо за даними розщеплення у F₃. Так, виходячи з нашої гіпотези генетичного контролю ознаки, безості рослини не повинні мати серед нащадків рослин з остеподібними відростками, тим більш з остями. Якщо такий випадок спостерігався, і серед рослин F₃, нащадків від самозапилення рослини F₂, безості за нашою оцінкою, переважали рослини з остеподібними відростками або зустрічалася остиста рослина, фенотип рослини F₂ був визнаний як безостий помилково – рослина мала бути класифікована як рослина з остеподібними відростками (табл. 3). Остисті рослини F₂ серед нащадків F₃ не повинні мати остеподібних відростків. Якщо нащадки мали остеподібні відростки, рослина F₂ неправильно була класифікована як остиста, її слід віднести до класу рослин з остеподібними відростками. Із 77 рослин F₂ за фенотипом F₃ було перевірено 68, і нове співвідношення між фенотипами виглядало як 13 безостих, 10 остистих, 45 з остеподібними відростками, що цілком задовольняє нашої гіпотезі про генетичний контроль ознаки ($\chi^2 = 0,75$, $p > 0,05$). Перевірка правильності класифікації рослин F₂ за даними оцінки розщеплення у F₃ виявилась

дуже доречною при спробі зв'язати дві ознаки: (остистість колоса та спектр ампліфікації ДНК гібридів F₂) з праймерами мікросателітних локусів, специфічних до хромосом 5A та 6D.

За електрофоретичними спектрами продуктів ампліфікації, що отримані з праймерами мікросателітних локусів *Xwmc705-5A*, *Xwmc105-6B*, *Xcfd45-6D*, було оцінено 76 рослин F₂. В будь-якому разі різниця між спектрами ліній *res206* та *res211* полягала у відсутності компонента спектра для лінії *res206*, тому мікросателітний локус у розщепленні поведився як домінуючий з очікуваним співвідношенням 3 «1» (у спектрі компонент присутній) : 1 «0» (у спектрі компонент відсутній). Для мікросателітів *Xwmc705-5A* та *Xcfd45-6D* фактичні обсяги класів «1»–«0» відповідали очікуваному 3:1, а для локусу *Xwmc105-6B* 0,01 < p < 0,05 результат виявився неоднозначним (табл. 4). Перевірка комбінування алелів різних локусів підтвердила його незалежність, що впливає із локалізації мікросателітних локусів.

У мікросателіта *Xcfd45-6D* серед 68 рослин F₂, оцінку яких за остистістю перевірено за даними розщеплення у F₃, було 58 рослин з наявним у спектрі компонентом та 18 рослин без компонента ($\chi^2 = 0,02$). Далі розглядали два варіанти сполучення ознак остистості колоса та спектр компонентів ампліфікації. Нехай ген *awn1* розташований у будь-якій хромосомі, відмінній від хромосоми 6D, яку маркує мікросателіт *Xcfd45-6D*. Розщеплення у F₂ становить 3 безостих : 10 остеподібних відростки : 3 остистих. Вільне комбінування градацій ознаки остистості та компонентів мікросателітних спектрів має дати розщеплення, наведене у табл. 5.

Незважаючи на низьку імовірність існування первинної таблиці (табл. 5), яка відбиває отримані нами дані, повна величина точного критерію Фішера (p = 0,349) засвідчує, що градації ознаки остистості та алелі мікросателітного локусу, специфічного до хромосоми 6D, мають розглядатися як такі, що сполучаються незалежно.

Другий варіант сполучення градацій ознаки та компонентів спектра варто розглянути виходячи з припущення, що ген *awn1* локалізований у хромосомі 6D. Тоді, беручи до

Таблиця 3
Результати перевірки фенотипу рослин F₂ за результатами розщеплення у F₃

Фенотип рослин F ₂ та їхня кількість	Фенотип рослин F ₃		
	Безості	Остисті	З остеподібними відростками
Безості			
13	81	0	0
10	15	19	29
Остисті			
10	0	70	0
2	1	4	5

Таблиця 4
Співвідношення між фенотиповими класами мікросателітних локусів серед 76 рослин F₂ від схрещування *res206* × *res211*

SSR-локус	Кількість рослин з таким спектром		χ^2 для співвідношення 3«1»:1«0»*	P
	компонент «1»	компонента немає «0»		
<i>Xwmc705-5A</i>	55	23	0,86	>0,05
<i>Xwmc105-6B</i>	66	10	5,07	>0,01
<i>Xcfd45-6D</i>	52	24	1,423	>0,05

* Розраховано з поправкою Єйтса.

уваги нашу гіпотезу про дигенний контроль ознаки, очікуємо наступне сполучення градацій ознаки остистості та компонентів спектра: 1) серед безостих рослин з генотипом *B1-awn1 awn1* всі будуть мати компонент «1», бо він властивий компоненту схрещування (*res211*) з геном *awn1*; серед остистих рослин 1/3 будуть мати компонент «0», це носії генотипу *b1b1Awn1Awn1*, а 2/3 – компонент «1», це носії генотипу *b1b1Awn1 awn1*; серед рослин з остеподібними відростками 3/16 генотипів *B1-Awn1Awn1* (*2B1b1Awn1Awn1* + *1B1B1Awn1Awn1*) будуть мати «0» у спектрі, 6/16 генотипів *B1-Awn1-* (*2B1B1Awn1awn1* + *4B1b1Awn1awn1*) та 1/16 генотипів *b1b1awn1awn1* будуть мати «1» у спектрі, тобто 7/16 рос-

Таблиця 5
Комбінування градацій за ознакою остистість та компонентів спектрів мікросателітного локусу *Xcfd45-6D*

Фенотипові класи	Градація за остистістю	Компонент у спектрі ампліконів	Кількість рослин генотипового класу	
			фактична	теоретична
1	Безостий	1	13	10
2	Безостий	0	0	3
3	Остистий	1	7	10
4	Остистий	0	3	3
5	Остеподібні відростки	1	28	31
6	Остеподібні відростки	0	17	10

Примітка. Через замалу кількість рослин у класах 2 та 4 замість методу χ^2 використано точний критерій Фішера [17]. Імовірність вихідної таблиці $0,0007 < 0,01$, імовірність за двобічним критерієм $0,349 > 0,05$.

Таблиця 6
Порівняння теоретичного та емпіричного співвідношення розщеплення у F_2 , виходячи з припущення, що ген остистості локалізований у хромосомі 6D

Співвідношення розщеплення	Остисті рослини		P*	З остеподібними відростками		P*
	«1»	«0»		«1»	«0»	
Фактичне	7	3	0,5	17	28	0,3
Очікуване	2	1	1,00	3	7	0,73

*Перше значення у стовпчику розраховане для початкової таблиці, друге – результат двобічного точного критерію Фішера.

лин з «1» та 3/16 з «0». Оскільки співвідношення рослин з «1» та «0» серед рослин з різними градаціями остистості очікується різне, розглянемо окремо дві чотиріпільні таблиці емпіричних та очікуваних величин (табл. 6).

Порівняння результатів, наведених у табл. 5 та 6, показує, що імовірності отримання фактичних даних за другим варіантом набагато вище, ніж за першим, навіть для початкових таблиць $p \gg 0,05$. Отже, ген – промотор ос-

тистості локалізований у хромосомі 6D, причому в цій хромосомі локалізований його рецесивний алель *awn1*, який у гомозиготному стані спричинює розвиток остеподібних відростків при відсутності інгібітора остистості, а алель *Awn1* увійшов до складу геному інтрогресивної лінії разом з хромосомою 6U. Хромосоми 6D та 6U не кон'югують у профазі мейозу, оскільки не гомологічні, тому розрахувати зчеплення, якщо воно навіть є, між геном *Awn1* та мікросателітним локусом *Xcfd45-6D*, специфічним для хромосоми 6D, на цьому матеріалі неможливо.

Були визначені генотипи рослин F_2 за алелями мікросателітного локусу *Xwmc705-5AL*, специфічного до хромосоми 5A. Обґрунтовуючи гіпотезу про генетичний контроль остистості, ми припускали, що лінія *res206* має або термінальну делецію на довгому плечі цієї хромосоми, яка включає ген *B1*, або мутантний алель цього гена, який втратив здатність інгібувати ген – промотор остистості. В іншому разі рослини лінії не були б остистими. Спектр ампліфікації геному лінії *res211* з праймерами цього мікросателітного локусу представлений одним компонентом «1», у спектрі лінії *res206* компонента немає. Здавалось би, що відсутність компонента ампліфікації з праймерами мікросателітних локусів, специфічних до хромосоми 5A, у спектрі остистої лінії може свідчити на користь припущення про делецію термінальної ділянки цієї хромосоми у складі геному лінії *res206*. Тоді серед нащадків F_2 мають з'явитися чотири фенотипові класи: остисті з «0» за мікросателітом, з остеподібними відростками з «0», з остеподібними відростками з «1» за мікросателітом та безості з «1». Фактично спостерігаються шість класів, які включають, крім перелічених, остисті рослини з «1» та безості рослини з «0», що не мали б з'являтися, якщо мікросателітний локус знаходиться у ділянці хромосоми 5A, яка делетована в остистої лінії *res206*. Отже, ми маємо припустити, що відсутність прояву гена *B1* у складі лінії *res206* пояснюється не відсутністю частини хромосоми з цим геном (делеція), а якоюсь перебудовою хромосоми, яка призвела до мутації гена *B1* у нефункціональний алель *b1*, а також до утворення нульового алеля за

мікросателітним локусом *Xwtc705-5A*, наявність компонента за яким було констатовано і для геному Аврори, і для генотипу Авролати. Порівняння фактичного розподілу рослин за фенотиповими класами (перший рядок табл. 7) з теоретичними, які очікувались із припущення про незалежне комбінування гена *B1* та локусу *Xwtc705-5A* (другий рядок табл. 7), показує надлишок остистих рослин з фенотипом «0» за мікросателітним локусом та безостих рослин з фенотипом «1» за мікросателітним локусом та нестачу остистих рослин з фенотипом «1» і безостих рослин за фенотипом «0».

Порівняння фактичного розподілу за фенотиповими класами з очікуваним, розрахова-

ним із припущення про незалежне комбінування гена *B1* та мікросателітного локусу *Xwtc705-5A*, наводить на думку про наявність зчеплення між вказаними генами у фазі *B1*«1» (*b1*«0»). Для визначення величини зчеплення θ максимальну правдоподібність розраховували за формулою

$$P = \frac{N!p^a q^b u^c v^d r^e s^f}{a!b!c!d!e!f!}$$

Теоретичні частоти фенотипів *p ... s* та їхні кількості, що спостерігалися, *a ... f*, наведені у табл. 8. Шукали найбільший логарифм відношення двох імовірностей, коли у знамен-

Таблиця 7
Розподіл рослин F_2 за фенотиповими класами за ознакою остистість та спектр ампліконів, що утворюється праймерами мікросателітного локусу *Xwtc705-5A*

Умови формування фенотипових класів	Кількість рослин у фенотипових класах					
	Безості		Остисті		З остеподібними відростками	
	«1»	«0»	«1»	«0»	«1»	«0»
Фактичне	12	1	3	7	36	9
Очікуване при $\theta = 0,5$	10	3	8	5	33	9
Очікуване при $\theta = 0,15$	11	1	84	9	36	7

Таблиця 8
Розрахунок очікуваних частот фенотипових класів за ознаками остистість та спектр ампліфікації з праймерами локусу *705-5A* за $\theta = 0,15$

Генотип гамет ♀	Частота гамет за $\theta = 0,15$	Генотип гамет ♂							
		<i>B1B3</i> «1»	<i>b1B3</i> «0»	<i>B1b3</i> «0»	<i>b1b3</i> «1»	<i>B1B3</i> «1»	<i>b1b3</i> «0»	<i>B1b3</i> «0»	<i>b1b3</i> «1»
		0,2125	0,2125	0,0375	0,0375	0,2125	0,2125	0,0375	0,0375
<i>B1B3</i> «1»	0,2125	0,0425	0,0425	0,01063	0,01063	0,0425	0,0425	0,01063	0,01063
<i>b1B3</i> «0»	0,2125	0,0425	0,0425	0,01063	0,01063	0,0425	0,0425	0,01063	0,01063
<i>B1b3</i> «0»	0,0375	0,0075	0,0075	0,00188	0,00188	0,0075	0,0075	0,00188	0,00188
<i>b1b3</i> «1»	0,0375	0,0075	0,0075	0,00188	0,00188	0,0075	0,0075	0,00188	0,00188
<i>B1b3</i> «1»	0,2125	0,0425	0,0425	0,01063	0,01063	0,0425	0,0425	0,01063	0,01063
<i>b1b3</i> «0»	0,2125	0,0425	0,0425	0,01063	0,01063	0,0425	0,0425	0,01063	0,01063
<i>B1b3</i> «0»	0,0375	0,0075	0,0075	0,00188	0,00188	0,0075	0,0075	0,00188	0,00188
<i>b1b3</i> «1»	0,0375	0,0075	0,0075	0,00188	0,00188	0,0075	0,0075	0,00188	0,00188
$p = 0,5225$	остеподібні відростки «1»			$a = 36$	$v = 0,1025$	остеподібні відростки «0»		$d = 9$	
$q = 0,1675$	безості «1»			$b = 12$	$r = 0,02$	безості «0»		$e = 1$	
$u = 0,06$	остисті «1»			$c = 3$	$s = 0,1275$	остисті «0»		$f = 7$	

нику відношення стоїть імовірність для $\theta = 0,5$, а у чисельнику – для $0,1 < \theta < 0,5$ [18]. Максимальну оцінку $LOD = 3,36$ отримали при $\theta = 0,15$. Такому значенню θ відповідає розрахована за функцією Козамбі [1] відстань між генами, що становить 15,5 сМ.

Показники точного критерію Фішера для ініціальної таблиці та двобічного варіанта критерію свідчать, що імовірність теоретичного розподілу рослин за фенотиповими класами, розрахована за умов незалежного комбінування гена *BI* та мікросателітного локусу *Xwmc705-5A* (0,00015 та 0,597, другий рядок табл. 7), набагато менше відповідних імовірностей, розрахованих за умов зчеплення між вказаними генами на величину $\theta = 0,15$ (0,00092 та 0,978, третій рядок табл. 7).

Висновки. Остиста інтрогресивна лінія *res206*, яка походить від схрещування між безостим сортом озимої м'якої пшениці Аврора та геномно-заміщеною формою Аврората з остеподібними відростками, відрізняється від безостої лінії того самого походження *res211* за двома генами, що беруть участь у контролі остистості. Ген – промотор остистості *Awn1* увійшов до складу геному лінії *res206* в складі хромосоми 6U, яка замістила хромосому 6D м'якої пшениці. Лінія *res211*, як і реципієнтний генотип сорту Аврора, має на хромосомі 6D інший алель цього гена *awn1*, що спричинює розвиток остеподібних відростків у відсутності домінантного інгібітора остистості *BI*, локалізованого на хромосомі 5A генотипу Аврори та лінії *res211*. Лінія *res206* має мутацію гена-інгібітора, алель *b1*, який не впливає на розвиток остей. Мікросателітний локус *Xwmc705-5AL* розташований на відстані 15,5 сМ або до локусу *BI/b1*, або до початку ділянки на хромосомі 5A, яка через перебудови обмежена щодо рекомбінації з гомологічною ділянкою неперебудованої хромосоми 5A.

M.Z. Antonyuk, D.O. Prokopyk,
V.S. Martynenko, T.K. Ternovska

IDENTIFICATION OF GENES THAT PROMOTE AWNEDNESS IN THE *TRITICUM AESTIVUM/AEGILOPS UMBELLULATA* INTROGRESSIVE LINE

Genetic analysis of *Triticum aestivum/Aegilops umbellulata* introgressive line for the character ear awnedness has been realized. According to the studying

the lines and hybrids for the characters awnedness and electrophoresis spectra of microsatellite components the digenic model for control of awnedness is suggested. The model supposes participation of gene – inhibitor of awnedness *BI* (5AL) and gene – promoter of awnedness *Awn1* in chromosome 6U of *Aegilops umbellulata*. Chromosome 5A of the awned line is rearranged relative to the same chromosome of the Aurora genotype. The distance between the *Xwmc705-5AL* SSR-locus and rearranged fragment or locus *BI/b1* is determined as 15,5 сМ.

M.Z. Antonyuk, D.O. Prokopyk,
V.S. Martynenko, T.K. Ternovskaya

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ – ПРОМОТОРОВ ОСТИСТОСТИ В ИНТРОГРЕССИВНОЙ ЛИНИИ *TRITICUM AESTIVUM/AEGILOPS UMBELLULATA*

Выполнен генетический анализ интрогрессивных линий *Triticum aestivum/Aegilops umbellulata* по признаку остистость колоса. По данным изучения линий и гибридов по остистости и спектрам микро-сателлитных компонентов предложена дигенная модель контроля признака с геном – ингибитором остистости *BI* (5AL) и геном – промотором остистости *Awn1*, локализованным в хромосоме 6U эгилопса зонтичного. Хромосома 5A остистой линии перестроена относительно этой же хромосомы генотипа Авроры, и расстояние между SSR-локусом *Xwmc705-5AL* и перестроенным фрагментом или локусом *BI/b1* определено как 15,5 сМ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Somers D.J., Appels R., Devos K.M.* Catalogue of gene symbols for wheat. Distributed at the 11th Int. Wheat Genet. Symp. 2008. <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/Triticum/wgc/2008/>
2. *Sourgille P., Cadalen T., Gay G. et al.* Molecular and physical mapping of genes affecting awing on wheat // *Plant Breed.* – 2002. – **121**. – P. 320–324.
3. *Goncharov N.P.* Comparative-genetic analysis – a base for wheat taxonomy revision // *Czech. J. Plant. Genet. Breed.* – 41 (special issue). – P. 52–55.
4. *Прокопик Д.О., Терновська Т.К.* SSR-маркування генів, залучених до контролю остистості в твердої пшениці (*Triticum durum* Desf.) // *Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів.* – 2010. – **8**, № 1. – С. 31–40.
5. *Лукьяненко П.П.* Селекція і семеноводство озимої пшениці : Избр. тр. – М.: Колос, 1973. – 448 с.

6. Терновская Т.К. Геном D мягкой пшеницы. Наследование некоторых признаков морфологии колоса // Цитология и генетика. – 1997. – **31**, № 4. – С. 11–18.
7. Шулембаева К.К., Джалпакова К.Д. Моносомный генетический анализ качественных и количественных признаков яровой мягкой пшеницы сорта Казахстанская 126 // Цитогенетика зерновых культур. – Таллин, 1990. – 178 с.
8. Жиров Е.Г. Геномы пшеницы: исследование и перестройка: Дис. ... д-ра биол. наук. – Краснодар, 1989.
9. www.le.ac.uk/bl/phh4/dnaiso.htm
10. Sommers D.J., Isaac P., Edwards K. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. – 2004. – **109**, № 6. – P. 1105–1114.
11. Song Q.J., Shi J.R., Singh S. et al. Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat // Theor. Appl. Genet. – 2005. – **110**. – P. 550–560.
12. <http://wheat.pw.usda.gov>
13. Antonyuk M.Z., Bodylyova M.V., Ternovskaya T.K. Genome structure of introgressive lines *Triticum aestivum/Aegilops sharonensis* // Цитология и генетика. – 2009. – **43**, № 6. – С. 58–67.
14. Терновская Т.К., Антонюк М.З., Вдовиченко Ж.В. Генетичний аналіз інтрогресивних ліній м'якої пшениці за остистістю колоса // Наук. зап. Терн. пед. ун-та. Сер. біол. – 2007. – **4** (34). – С. 80–83.
15. <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/maps/markerMap.jsp;jsessionid=E6B7285A37555624B409EE35A82597F5.lb1?chromosome=5>
16. Gadaleta A., Giancaspro A., Giove S.L. et al. Genetic and physical mapping of new EST-derived SSRs on the A and B genome chromosomes of wheat // Theor. Appl. Genet. – 2009. – **118**. – P. 1015–1025.
17. Глянц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
18. <http://genepi.qimr.edu.au/staff/davidD/Course/HTML/part5.html>

Надійшла 20.10.11