

ПЕРМАНЕНТНА ГЕНЕТИЧНА МІНЛИВІСТЬ У ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЯХ ТА АМФІДИПЛОЇДАХ *TRITICEAE*

Гібридне походження геному організму останнім часом розглядається як чинник певної генетичної нестійкості, що притаманна таким геномам. На моделі амфідиплоїдів та інтрогресивних ліній пшениця — егілопс наводяться докази перманентних змін в їхніх геномах, які відбиваються на фенотипному рівні при вивченні морфологічних та біохімічних ознак у послідовних генераціях певних генотипів, а також гібридів F_1 та F_2 . Чинниками такої мінливості в умовах геномного шоку може бути як дія транспозонів, так і внутрішньохромосомні перебудови, спричинені гаметоцидною хромосомою $4S^{sh}$.

Ключові слова: геномно-заміщені амфідиплоїди, нестійкість геному гібридного походження, гліадини, бета-амілаза, морфологічні ознаки, генетичний аналіз.

Вступ. Тридцять років тому було створено три геномно-заміщених амфідиплоїди, в яких субгеном DD озимого сорту м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L., AABBDD) Аврора був заміщений геномом одного з диплоїдних видів егілопсу, *Aegilops speltoides* у Авродеса (AABBSS), *Ae. sharonensis* у Аврозиса (AABBS^{sh}S^{sh}) та *Ae. umbellulata* в Авролати (AABBUU) (рис. 1) [1]. Гібриди F_1 від схрещування цих амфідиплоїдів з генотипом Аврора стали джерелом для створення певного розмаїття 42-хромосомних інтрогресивних ліній м'якої пшениці з різним обсягом чужинного хроматину від вказаних видів егілопсу, від однієї транслокації до трьох хромосом (рис. 2) [2]. Виходячи з геномної структури вихідних генотипів та гібридів F_1 , всі заміщення хромосом пшениці на чужинні хромосоми мали відбуватися в процесі формування гамет гібридом AABBDX, де X — геном егілопсу, і стосуватися хромосом лише субгеному D. Частина AABB мала залишатися незмінною [3]. Гексаплоїдні лінії добирали за допомогою цитологічного контролю [4, 5], і їхню цитологічну стабільність неодноразово перевіряли впродовж наступних поколінь [6,

7]. Наявність, кількість та обсяг чужинних заміщень встановлювали через вивчення хромосомної конфігурації при кон'югації хромосом у гібриді F_1 за умов максимальної асоціації хромосом у мейозі I материнських клітин пилку [6, 8, 9]. Гомеологічну належність хромосом встановлювали із застосуванням біохімічних маркерів, специфічних для семи гомеологічних груп хромосом *Triticeae* [2]. Ще один геномно-заміщений амфідиплоїд, Авротика (AABBTT), створили із застосуванням диплоїда *Ae. mutica* пізніше [3], проте інтрогресивних ліній за його участі на сьогодні ще немає.

Іншу групу амфідиплоїдів, геномно-доданих, отримали від звичайного об'єднання геному лінії тетраплоїдної пшениці *T. durum* Desf. (AABB) з геномом MM диплоїда *Ae. comosa* (Міоза, AABBMM) та DD виду *Ae. tauschii*, природного джерела субгеному D м'якої пшениці (MIT^D, AABBDD), підвидів *eusquarrosa* та *strangulate* [3, 10].

Міоза стала першим амфідиплоїдом, який привернув до себе увагу незрозумілим феноменом: за кілька генерацій після його створення серед рослин, що не мали воскової осуги (колір рослини зелений, ознака домінантна), стали постійно з'являтися рослини, які за морфологією повністю збігалися з вихідним амфідиплоїдом, проте мали воскову осугу (колір рослини блакитний, ознака рецесивна) [11, 12]. Блакитний варіант амфідиплоїда характеризувався стабільністю і ніколи не повертався до вихідного фенотипу. Питання про можливе переzapилення амфідиплоїда Міоза з пшеничними генотипами, серед яких наявність воскової осуги є звичайною ознакою, навіть не розглядалось через те, що кількарізкові спроби отримати фертильний F_1 від схрещування Міози з м'якою пшеницею або іншими геномно-доданими амфідиплоїдами виявилися марними. Пізніше той самий феномен зареєстрували для п'яти з шести амфідиплоїдів MIT^D, створених

з різними зразками егілопсу, причому МІТ^{D334} у вихідному зеленому варіанті нині зовсім втрачений.

Нестабільність за ознакою відсутність/наявність воскової осуги встановили також у Авротики, позбавленої воскової осуги. Незабаром після її створення серед рослин безостої Авротики виявили рослини з остеподібними відростками, і саме серед них почали знаходити рослини із восковою осугою [11]. За кілька років рослини з восковою осугою було виявлено також серед безостої Авротики. Авродес та Авролата – зелені амфідиплоїди. В Аврозиса є воскова осуга, а в егілопсу Шарона її немає. Беручи до уваги гомеологію серед представників *Triticaceae*, егілопс Шарона мав

бути носієм гена-інгібітора воскової осуги, який забезпечував зелений колір амфідиплоїду Аврозис. Нестабільністю за вказаною ознакою характеризувались інтрогресивні лінії, створені на основі Авродеса, Аврозиса, Авролати [12], причому зелені інтрогресивні лінії є серед похідних Аврозиса, хоча сам амфідиплоїд на сьогодні представлений лише блакитним варіантом [11]. Процес зміни виразу ознаки від зеленої до блакитної є перманентним, незворотним і настільки невпинним, що деякі амфідиплоїди та інтрогресивні лінії у вихідному зеленому вигляді нами втрачені.

Беручи до уваги досягнення генетики останніх років, сукупність яких спростувала нашу впевненість у стабільності геному впро-

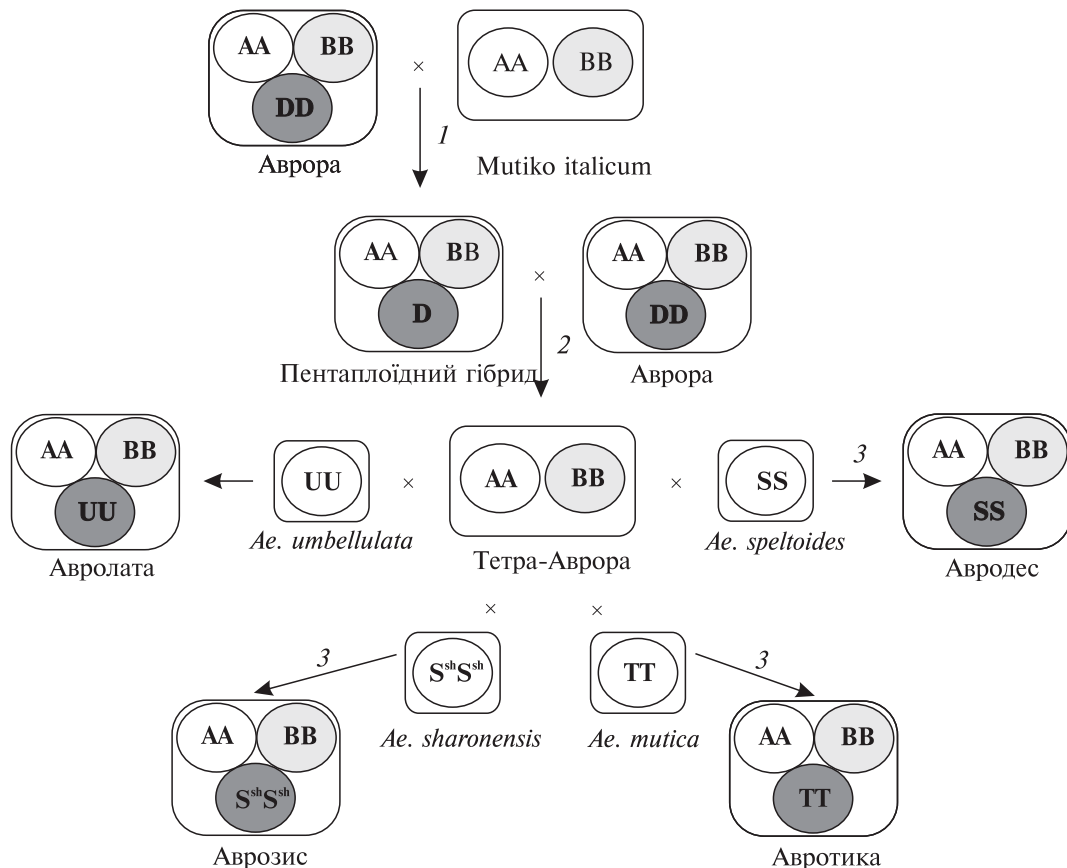


Рис. 1. Схема створення генетично-заміщених амфідиплоїдів на основі геному AABBDD сорту Аврора: 1 – пентаплоїдний гібрид AABBDD отримується від схрещування *T. aestivum*, сорт Аврора, та *T. durum*, лінія Mutiko italicum; 2 – пентаплоїд шість разів бекросується з сортом Аврора, серед нащадків від самозапилення рослин шостого бекросу цитологічно виділяють тетраплоїди AABB; 3 – тетра-Аврора схрещується з одним із вказаних диплоїдних егілопсів, гібрид F₁ обробляється колхіцином, утворюється амфідиплоїд з субгенами А та В від сорту Аврора та третім субгеномом егілопсу

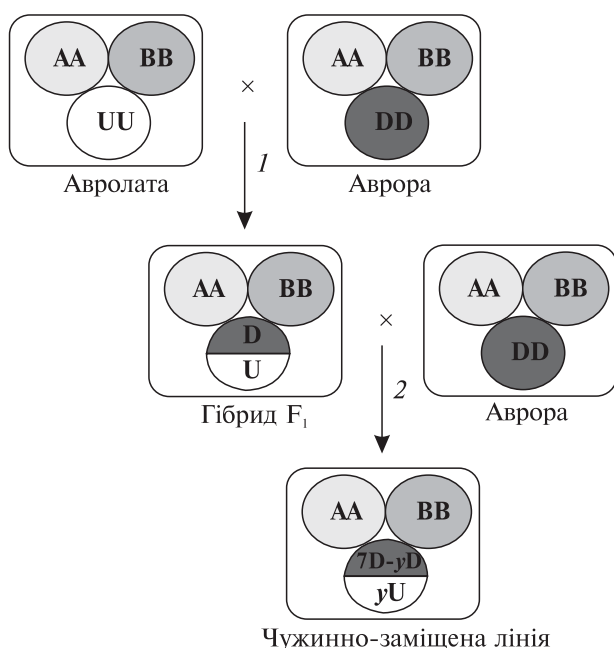


Рис. 2. Схема створення чужинно-заміщених і транслокаційних ліній пшениці з використанням геномно-заміщеного амфідиплоїда на прикладі Авролати: 1 – гібрид F_1 від схрещування Авролати і Аврори бекросується з Авророю 1–3 рази до відновлення самофертильності; 2 – серед нащадків від самозапилення бекросних рослин цитологічно виділяють 42-хромосомні рослини, доводять, що у пар хромосом D заміщені на у пар хромосом U, та перевіряють на наявність транслокацій

довж онтогенезу і, перш за все, геному гібридного походження [13–18], ми припустили, що у цитологічно сталих амфідиплоїдів та інтрогресивних ліній відбуваються якісь зміни у генетичному матеріалі, про що на рівні морфологічного фенотипу свідчить зміна у прояву ознаки відсутність/наявність воскової осуги на рослині. У даній роботі наведено результати вивчення амфідиплоїдів, інтрогресивних ліній м'якої пшениці та їхніх гібридів за ознаками морфології рослин та біохімічними ознаками для доказу факту генетичної мінливості, яка притаманна геномам гібридного походження.

Матеріали і методи. Рослинний матеріал представлений кількома групами: 1) геномно-заміщений амфідиплоїд Авротика, геномно-доданий амфідиплоїд Міоза, гібриди F_1 та F_2 від схрещування рослин цих амфідиплоїдів, а також деяких інтрогресивних ліній з альтернативними

градаціями за відсутності/наявності воскової осуги; 2) інтрогресивні лінії м'якої пшениці, які характеризуються стійкістю до однієї чи кількох грибних захворювань пшениці, серед них 72 лінії — похідні Авродеса, 42 — Аврозиса, 53 — Авролати (оцінку ліній виконано за ознаками морфології колосу, рис. 3); 3) 19 ліній — похідних Авродеса у 63 генераціях, 12 ліній — похідних Аврозиса у 33 генераціях та 18 ліній — похідних Авролати у 34 генераціях вивчено за електрофоретичним спектром гліадинів. Застосовували насіння рослин, вирощених у 2009 р. з насіння різних генерацій, від 2002 до 2008 рр. Досліджували лише ті лінії, що виявилися нестабільними за ознаками морфології. Для електрофорезу та візуалізації спектрів використовували оприлюднену методику [19]; 4) за електрофоретичними спектрами β -амілази [20] досліджували 19 ліній, що брали участь у створенні 37 популяцій F_2 . Один з компонентів схрещування, стійкий до борошнистої роси, був гібридом F_1 від схрещування інтрогресивних ліній різного походження щодо вихідного геномно-заміщеного амфідиплоїда. Другий, стійкий чи не стійкий, був лінією — похідною Аврозиса з гаметоцидною хромосомою 4S^{sh} або без неї. Лінії вивчали в одній генерації 2009 р., по чотири рослини, шість зернівок на рослину, генотип рослин F_2 встановлювали за насінням F_3 , 6–8 насінин на рослину. Ще чотири популяції F_2 , що досліджували за спектром β -амілази, отримали від схрещування інтрогресивних ліній різного походження з рекурентним генотипом Аврора.

Для статистичної обробки результатів використовували метод χ^2 для чотирьохпольних таблиць з поправкою Єйтса та урахуванням поправки Бонферроні, а також точний критерій Фішера [21].

Результати досліджень та їх обговорення. *Ознаки морфології.* Частина з цитологічно стабільних інтрогресивних ліній — похідних Авродеса, Аврозиса та Авролати — зареєстровані нами як такі, що не зберігають одноманітності за деякими ознаками морфології рослини (рис. 3). Нестабільність за переліченими ознаками виявлялася в тому, що серед нащадків самозапиленних рослин постійно з'являлися такі, в яких чужинна градація певної ознаки змі-

нювалась на градацію, притаманну м'якій пшениці, зокрема сорту Аврора. Різні лінії були нестабільними за різною кількістю ознак, від однієї до п'яти. Цитологічна стабільність таких ліній повністю зберігалась. Проте мінливістю за морфологічними ознаками характеризувались не всі лінії. Так, серед 72 ліній – похідних Авродеса, 42 ліній – похідних Аврозиса та 53 ліній – похідних Авролати нестабільність хоча б за одною із перелічених ознак зареєстрована відповідно в 40, 18 та 18 ліній, що склало у відсотках $55,6 \pm 5,87$; $42,6 \pm 7,64$ та $34,0 \pm 6,51$. Незважаючи на різницю між наведеними числами, статистичної значущості при порівнянні обсягів класів стабільних та нестабільних ліній методом χ^2 для чотирьохпольних таблиць не виявлено. Величини χ^2 , розраховані з поправкою Єйтса, становили 1,24 для пари Авродес–Аврозис, 4,88 для пари Авродес–Авролата, 0,46 для пари Аврозис–Авролата, а табличне значення $\chi^2_{0,05}$ з урахуванням поправки Бонферроні для трьох порівнянь – 5,92. Отже, групи ліній – похідних різних геномно-заміщених амфідиплоїдів – не відрізнялись за своєю генетичною стабільністю. Тому чинник генетичної нестабільності не залежав від джерела інтрогресії, хоча для похідних Авродеса таким чинником можна було б розглядати локус *Ph¹*, який дозволяє кон'югацію гомеологів [22], а серед похідних Аврозиса – гаметоцидний ген *Gc*, який сприяє утворенню хромосомних перебудов за участі негомологічних ділянок хроматину [23]. Те, що всі лінії, обрані для дослідження, мали у своєму геномі якійсь обсяг чужинного хроматину або якимось іншим чином відрізнялись від вихідного генотипу Аврора, засвідчувалось тим, що кожна з них характеризувалась стійкістю хоча б до одного з грибних захворювань пшениці (борошнеста роса, стеблова, листкова, жовта іржа), яке не притаманне сорту Аврора.

Ознаки морфології частіше за все характеризуються різним ступенем експресивності, тобто не є дуже надійними свідками змін на генетичному рівні при деяких змінах на рівні фенотипу. Більш придатними ознаками вважаються продукти експресії генів, що кодують ензими та запасні білки, які надійно та безпомилково візуалізуються на треках електрофоретичних спектрів, тому лінії вивчали за мін-

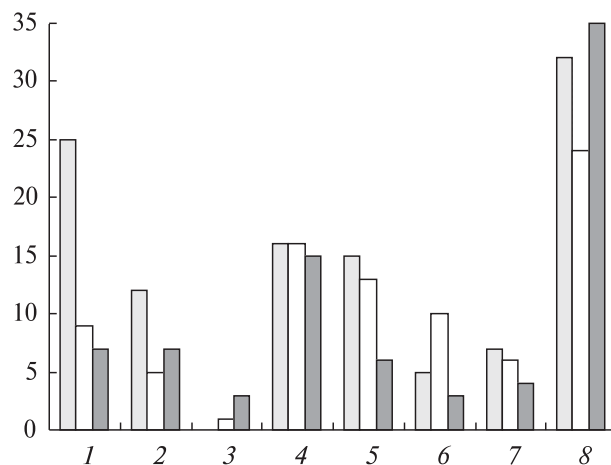


Рис. 3. Кількість ліній (по вертикалі, шт.) – похідних Авродеса (□), Аврозиса (□), Авролати (■), які виявляли мінливість за ознаками остистість (1); колір зрілої луски (2); опушення луски (3); вдавненість основи луски (4); жорсткість луски (5); розподіл пігменту на лусці (6); форма колоса (7); 8 – кількість мономорфних ліній

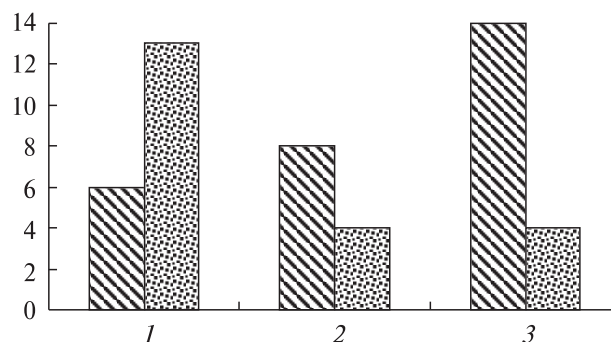


Рис. 4. Кількість ліній (по вертикалі, шт.) – похідних Авродеса (1); Аврозиса (2); Авролати (3), стабільних (■) та нестабільних (■) за електрофоретичним спектром гліадинів у різних генераціях

ливістю їхніх гліадинових спектрів та β -амілази.

Гліадини. Генетичний контроль окремих компонентів електрофоретичного спектра гліадинів добре вивчено як у геномно-заміщених амфідиплоїдів, так і у отриманих від них інтрогресивних ліній. В даному дослідженні одержували та порівнювали електрофоретичні спектри гліадинів з індивідуальних насінин одних і тих самих гексаплоїдних ліній різних генерацій для того, щоб охарактеризувати кожен ліній щодо її міжгенераційної та внутрішньогенера-

ційної мінливості за гліадиновим спектром, а також за її подібністю до спектра Аврори чи геномно-заміщених амфідиплоїдів за окремими компонентами (рис. 4). Нестабільні за гліадиновим спектром лінії виявлено серед похідних всіх трьох амфідиплоїдів, хоча серед похідних Авродеса таких ліній було більше. Різниця у кількості стабільних та нестабільних ліній була достовірною лише при порівнянні похідних Авродеса та Авролати (за точним критерієм Фішера, $P = 0,0081$). Для пари похідні Авродеса – похідні Аврозиса $P = 0,075$, для пари похідні Аврозиса – похідні Авролати $P = 0,678$.

Із 130 проаналізованих генерацій встановлено лише 8, в яких гліадиновий спектр насіння повністю збігався зі спектром генотипу Аврора. Серед них були похідні всіх геномно-заміщених амфідиплоїдів. Під час ідентифікації 42-хромосомних ліній, похідних Авродеса, Аврозиса та Авролати, щодо гомеологічної належності наявного в них чужинного хроматину, саме електрофоретичні спектри гліадинів застосували для пошуку компонентів спектрів, поява яких пов'язана з експресією генів егілопсів [19]. Ми маємо задокументованими електрофоретичні спектри гліадинів всіх гексаплоїдних ліній генерації 1993 р., в тому числі тих, що вивчалися в даному дослідженні. Двадцять років тому лише обмежена частина цих ліній виявляла якісь відмінності від спектра сорту Аврора, і ці відмінності завжди можна було пов'язати з наявністю компонентів, притаманних спектру відповідного геномно-заміщеного амфідиплоїда [19]. Внутрішньогенераційної мінливості не реєстрували. На той період лінії були щойно виділеними як цитологічно стабільні гексаплоїди серед багатьох рослин гібридного походження. В період 1993–2008 рр. лінії пройшли як мінімум десять генерацій у польових умовах під ізоляторами. Факти їхньої нестабільності за морфологічними ознаками почали реєструватися нами з 2002 р., перш за все для ознаки відсутність/наявність воскової осуги. За п'ять років нестабільність досягла рівня, який демонструється у даній статті, і стало очевидно, що не всі цитологічно стабільні лінії є стабільними генетично. Беручи до уваги схему створювання цих ліній, не можна було очіку-

вати, що ми маємо справу з рекомбінаційною мінливістю, яка має місце при становленні чистих ліній у процесі багатократного самозапилення нащадків гетерозиготи F_1 . По-перше, у гібрида F_1 був лише один субгеном, представлений хромосомами різних видів, D та X. Частина АВ була гомозиготною [3]. При ідентифікації новостворених ліній за гомеологічною належністю чужинного хроматину спочатку дійсно встановили, що заміщення та великі транслокації стосуються в хромосомах лише субгеному D [2]. Пізніше при використанні інтрогресивних ліній в дослідженнях з генетичного аналізу виявилось, що це не завжди так [24]. Схоже, що в геномах інтрогресивних ліній чиняться процеси, які породжують генетичну мінливість в межах гібридного генома, хоча на цитологічному рівні це не відбивається. Гліадинові спектри є дуже зручною моделлю для виявлення хоча б частини такої мінливості через свою поліморфність та участь в їхньому контролі шести різних генів.

Гліадини є мономерними білками спирторозчинної фракції клейковини зерна пшениці, кожен з яких кодується окремим геном. На електрофоретичному спектрі гліадинів традиційно виділяються чотири зони компонентів, кожна з яких контролюється певними генами *Gli*. Ці гени розташовані кластерами на хромосомах першої та шостої гомеологічних груп [25] і містять повторювальний домен, консенсусна послідовність якого складається з тринуклеотидних повторів САА, відомих як елементи мікросателітних локусів [26]. Наявність у складі гена таких повторів підвищує їхню поліморфність через помилки при рекомбіногенезі [27] та через відомий механізм утворення нових алелів мікросателітних локусів при проковзуванні полімерази під час реплікації ДНК [28]. Ділянки, розташовані між окремими генами кластера, надзвичайно насичені транспозонами, які можуть сприяти підвищенню внутрішньогеномної мінливості, якщо переходять до активного стану [29]. На сьогодні доведено, що причиною активації транспозонів у геномі може стати будь-який стрес організму, в тому числі гібридне походження геному [30, 31]. Крім того, встановлено можливість появи нових алелів на

прикладі глютенінових генів у інтрогресивних ліній *Triticum aestivum*/*Agropyron elongatum* [32], у пшенично-житніх гібридів [33] в геномно-заміщеній формі Авродес [19]. В досліджуваних лініях нові компоненти найчастіше зустрічалися у ω -зоні, рідше в γ - та β -зонах (рис. 5), в α -зоні — дуже рідко. Таке розподілення за зонами можна частково пояснити розмірами та роздільною здатністю електрофоретичних спектрів цих зон. Так, ω -зона містить близько половини усього спектра, в той час як γ -, β - та α -зони займають решту. На α -зону в середньому припадає від трьох до п'яти компонентів. Те, що високою мінливістю за генами *Gli* характеризуються саме інтрогресивні лінії, у той час як стабільним геномам звичайних сортів пшениці зовсім не притаманна така мінливість, наводить на думку про активізацію в гібридному геномі інтрогресивних ліній якихось механізмів, які ініціюють внутрішньокластерну мінливість генів *Gli*. Цілком можливо, що ми зіткнулися з наслідками активізації транспозонів.

β -Амілаза. Щоб прослідкувати генетичну мінливість у поколіннях від схрещування інтрогресивних ліній, було обрано β -амілазу через легку ідентифікацію компонентів електрофоретичного спектра та добру вивченість їхнього генетичного контролю [20]. Електрофоретичний спектр ізоферментів β -амілази генотипу Аврора складається з чотирьох компонентів (рис. 6, а). Подвійний компонент 12 контролюється геном β -*Amy-D1* (хромосома 4D), компонент 4 — геном β -*Amy-B1* (4B), компонент 6 — геном β -*Amy-A1* (5A). Спектр Аврозиса, крім компонентів 4 та 6, має специфічний, більш рухливий компонент, ще рухливіший компонент — у Авродеса. Спектр Авролати має тільки компоненти 4 та 6. Компонент 4 контролюється геном β -*Amy-B1* (4B). Відсутність мінливості серед ліній за цим геном стала причиною виключення його із подальшого розгляду.

Серед 13 ліній — похідних Авродеса, 16 ліній — похідних Аврозиса та 9 ліній — похідних Авролати виявлено такі, що мають алелі β -*Amy*, не властиві ні Аврорі, ні геномно-заміщеному амфідиплоїду, отже є новими. За геном β -*Amy-D1* таких ліній було 2, 1 та 4 серед вказаних похідних відповідно, для гена β -*Amy-A1* — 5, 4 та 2. Деякі лінії виявилися поліморфними

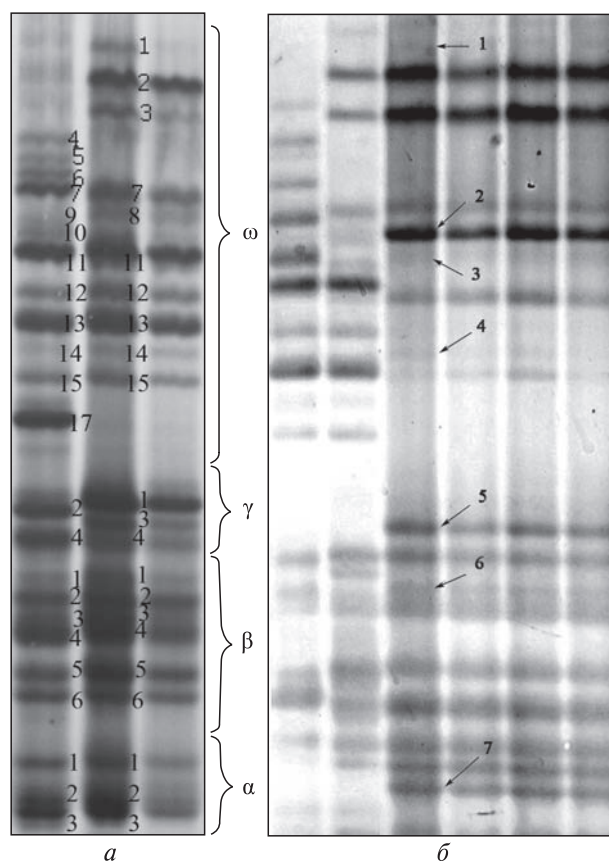


Рис. 5. ω , γ , β , α -зони електрофоретичних спектрів гліадинів у Авродеса, Аврори та лінії, яка від Аврори не відрізняється (а), та спектри гліадинів Аврозиса, Аврори та лінії, яка має компоненти спектра Аврозиса (3, 6) та нові компоненти (1, 2, 4, 5, 7) (б)

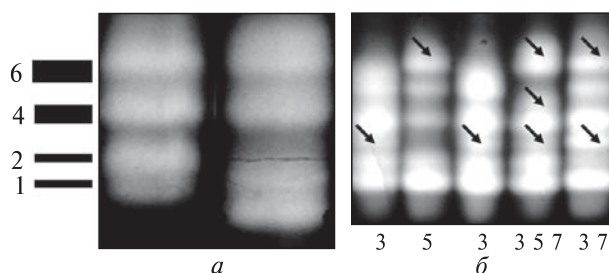


Рис. 6. Спектри β -амілази Аврори (зліва) і Аврозиса (а) та незвичайні компоненти спектра β -амілази в інтрогресивних лініях (б)

за алелями одного гена, тобто, суворо кажучи, чистими лініями їх вважати не можна.

Беручи до уваги походження ліній, слід очікувати, що будь-яка з них за геном β -*Amy-D1* виявляла наявність або алеля 12, властивого

генотипу Аврори, або чужинного алеля для ліній, похідних Аврозиса та Авродеса. Для ліній, похідних Авролати, компоненти 12 можуть бути відсутні. За геном β -Amy-*A1* в лініях очікується наявність лише одного алеля 6, властивого генотипу Аврори, адже за хромосомами геномів А та В ми не припускали заміщень та перебудов.

Отримані результати відрізнялись від очікуваних (табл. 1). Спектри ліній 16, 60, 106 та 254 не виявляли компонента 12, їхній алельний стан за геном β -Amy-*D1* було записано як 0, що є легітимним лише для лінії 254, похідної Авролати. Лінії 214, 221 та 243 мали на спектрі компонент 3 (рис. 6, б), рухливість якого дещо менше за подвійний компонент 12. Цей алель не притаманний жодному з ініціальних компонентів схрещування при створенні інтрогресивних ліній, отже є новим у цьому матеріалі. Те саме стосується компонентів 5 та 7 спектра β -амілази, які не властиві ні Аврорі, ні геномно-заміщеним амфідиплоїдам, від яких було отримано інтрогресивні лінії. Їхнє походження не може бути

пов'язано з перезапиленням досліджуваних ліній із сторонніми генотипами, адже колосся під час цвітіння ізолюється. Відсутність перезапилення підтверджується наявністю у каріотипі ліній двох хромосом із супутниками, що характерно для сорту Аврори, замість чотирьох, властивих всім генотипам м'якої пшениці, які не мають транслокації 1BL/1RS. Отже, нові алелі мають мутантне походження, а як мутагенні чинники можуть розглядатися всі згадані процеси, що супроводжують становлення геному гібридного походження. Поліморфність деяких ліній свідчить, що вони тепер не є однорідними і складаються з субліній, кожна з яких характеризується різними алелями за генами β -Amy-*A1* або β -Amy-*D1*. Спектр β -амілази вивчали на шести зернівках, взятих від чотирьох рослин з кожної лінії. Ті лінії, які за даними табл. 1 виглядають стабільними, цілком можливо такими не є, просто насіння було взято від рослин з однаковим алелем за генами β -амілази.

Алельність нових генів визначали генетичним аналізом із використанням чотирьох по-

Таблиця 1. Фенотипна характеристика інтрогресивних ліній за компонентами спектра β -амілази

Лінія	Фенотип за геном		Лінія	Фенотип за геном	
	β -Amy1-4D	β -Amy1-5A		β -Amy1-4D	β -Amy1-5A
2	12	6	125	0, 12, 3	6
3	12	7	127	S	6
4	12	5, 6, 7	128	S	5, 7
8	12	5, 6	130	12	6
16	0	6	132	12	6
23	12	6	137	12	6
26	12	6	139	12	6
33	12	6	141	12	5
34	12	0, 5, 7	147	12	6
60	0	6	148	12	6
66	12	6	193	12	6
67	12	7	201	12	6
87	12	6	209	12	5, 7
106	0	6	210	3	5, 7
115	S*	6	214	3	6
117	S	7	221	3	6
118	S	7	243	3	6
121	12	6	252	12	6
122	12	6	254	0	6

Примітка. Лінії 2–87 є похідними Авродеса, 106–148 — Аврозиса, 193–254 — Авролати. * Компонент спектра, властивий Аврозису та *Ae. sharonensis*.

пуляцій F_2 від схрещування інтрогресивних ліній з сортом Аврора. Генотипи рослин F_2 встановлювали за спектрами насінин F_3 по чотири зернівки на рослину і з'ясували, що компоненти 12, 3 та 0 контролюються алейними генами, тобто алелями гена β -*Amy-D1*, а компоненти 5 та 7 – алелями гена β -*Amy-A1*.

Для статистичного порівняння ліній різного походження за частотою появи нового алеля за кожним з двох генів β -амілази (рис. 7) використовували точний критерій Фішера. Всі три групи ліній, що походять від різних геномно-заміщених форм, не відрізнялись одна від одної за частотою виникнення зміни за геном β -*Amy-A1*. Щодо гена β -*Amy-D1*, не відрізнялись одна від одної групи ліній – похідних Авродеса та Аврозиса, а після їхнього об'єднання статистично значуще відрізнялась від них більшою частотою зміни алеля 12 на аель 3 група ліній – похідних Авролати ($P_{\text{інш.}} = 0,036$, $P_{\text{сум}} = 0,041$). На наш погляд, такі результати є наслідком невеликої кількості досліджених груп. Вони можуть стати іншими при тотальному дослідженні всіх інтрогресивних ліній з нашої колекції і не засвідчують залежності частоти мутування генів β -амілази від джерела інтрогресії.

Електрофоретичні спектри β -амілази вивчені серед нащадків F_2 37 комбінацій схрещування. У всіх випадках материнський компонент був гібридом F_1 від схрещування двох інтрогресивних ліній, кожна з яких виявляла

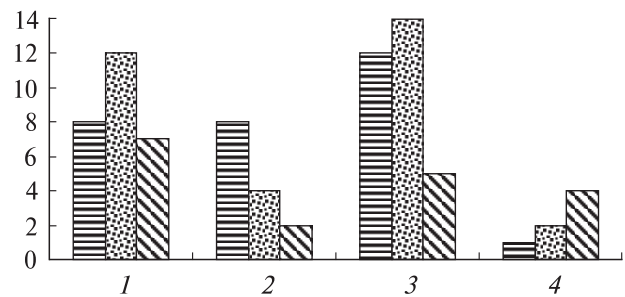


Рис. 7. Кількість ліній (по вертикалі) – похідних геномно-заміщених форм Авродеса (■), Аврозиса (▨), Авролати (▩) з очікуваними (1) та зміненими (2) алелями за генами β -*Amy-A1* та β -*Amy-D1* (3 і 4 відповідно)

стійкість до одного зі згаданих грибних захворювань пшениці.

Як батьківський компонент схрещування використовували або лінію – похідну Аврозиса з гаметоцидною хромосомою для ініціації транслокацій серед нащадків (25 комбінацій), або лінію – похідну Аврозиса без гаметоцидної хромосоми для контролю (12 комбінацій).

Рослини, з яких брали пилок, перевіряли *post factum* щодо стабільності за генами β -*Amy1*, змін алелів не реєстрували. Генотип рослин F_2 встановлювали за генами β -амілази при вивченні 6–8 насінин з рослини. Зафіксували феномен, який вимагав пояснення: у 10 комбінаціях, судячи зі спектрів насінин F_3 , деякі рослини F_2 мали не два, а три алеля гена

Таблиця 2. Розщеплення за алелями гена β -*Amy-D1* серед нащадків F_3 гібридів, у походженні яких брала участь лінія з гаметоцидною хромосомою 4S^{sh}

Номер гібрида	Кількість рослин F_2 , що передавали нащадкам три алеля гена β - <i>Amy-D1</i>	Кількість насінин з таким генотипом								
		ss	12 s	12 12	3 s	12 3	3 3	3 0	0 0	13 0
85	3 (12 s 3)	6	10	0	3	0	0	0	0	0
96	3 (12 s 3)	11	9	0	9	1	0	0	0	0
	2 (12 s 0)	4	16	4	0	0	0	0	2	2
93	1 (12 s 3)	1	0	1	1	0	0	0	0	0
104	1 (12 s 3)	1	1	0	2	1	0	0	0	0
135	2 (12 s 0)	3	4	1	0	0	0	0	2	2
147	8 (12 s 3)	12	34	1	15	0	0	0	0	0
163	2 (12 s 3)	2	4	1	2	0	0	0	0	0
185	5 (12 s 3)	10	11	0	6	0	0	0	0	0
199	15 (12 s 3)	46	53	2	42	1	0	0	0	0
201	3 (12 s 3)	4	9	0	3	0	0	0	0	0

Amy1-D1 (табл. 2). У всіх таких комбінаціях схрещування одним із компонентів була лінія — похідна Аврозиса з гаметоцидною хромосомою 4S^{sh}, гомеологічною хромосомі 4D, в якій розташований ген *β-Amy1-D1*. Крім того, розщеплення за алелями *β-Amy1-D1* було значно зсунуто на користь гетерозигот у порівнянні з кожною гомозиготою.

Результати розщеплення за геном *β-Amy-A1* продемонстрували аналогічну картину: у 11 комбінацій схрещування виявлено рослини F₂, які, судячи з нащадків, мали не два алеля гена *β-Amy-A1*, а три, причому один з них — новий, не властивий жодній з батьківських ліній (табл. 3). Для жодного з обстежених гібридів не спостерігали розщеплення окремо за алелями 5 та 7 чи 5 та 6. Розщеплення відбувалось або за алелями 6 та 7, або за трьома алелями одночасно. У той же час жодного разу не зустрічався спектр, який одночасно містить би компоненти, що відповідають трьом алелям. І для гена *β-Amy-A1* неочікуване розщеплення спостерігали лише в комбінаціях схрещування, отриманих за участі ліній з гаметоцидною хромосомою 4S^{sh} як пилкового компонента схрещування.

Розщеплення серед гібридів F₃, отриманих без участі ліній з гаметоцидною хромосомою, цілком відповідає моногенному успадкуванню ознаки для обох генів — *β-Amy-D1* та *β-Amy-A1*. Оскільки за геном *β-Amy-A1* можна відокремлювати всі гомозиготи від гете-

розигот, було перевірено та відкинуто припущення про стійку гетерозиготність ліній з гаметоцидною хромосомою як наслідок хромосомних аберацій, викликаних дією гена: гетерозигот серед рослин ліній знайдено не було. Це примушує зробити припущення, що зміна алеля *β-амілази*, яка призводить до появи в спектрі нового компонента, відбувається при формуванні гамет рослиною F₂, гемізиготною за хромосомою 4S^{sh}, а в генотипі самої рослини F₂ такого алеля не було. Активізацію мутаційних процесів за участі транспозонів саме під час мейозу вже було встановлено на рослинах [31, 34].

Непряме підтвердження припущення, що зміна алеля проти тих, які були властиві компонентам схрещування, відбуваються в рослині протягом спорогенезу, отримано нами при вивченні геномно-заміщених амфідиплоїдів та інтрогресивних ліній за ознакою відсутність/наявність воскової осуги. По-перше, при схрещуванні зелених рослин з блакитними серед 54 комбінацій схрещування в 43 комбінаціях спостерігали розщеплення серед рослин F₁ на зелені та блакитні, причому в трьох комбінаціях блакитними були всі гібриди F₁. По-друге, при самозапиленні зелених гібридів F₁ у F₂ отримували розщеплення, яке відрізнялось від моногенного 3 зелених : 1 блакитне в напрямку збільшення блакитних рослин. Обидва факти свідчать про те, що або рослини зеленого компонента схрещування були не гомозиготні

Таблиця 3. Розщеплення за алелями гена *β-Amy-A1* серед нащадків F₃ гібридів, у походженні яких брала участь лінія з гаметоцидною хромосомою 4S^{sh}

Номер гібрида	Кількість рослин F ₂ , що надавали нащадкам три алеля гена <i>β-Amy-D1</i> : 5, 6, 7	Кількість насінин з таким генотипом					
		6 6	5 5	7 7	5 6	5 7	6 7
81	2	3	0	2	0	5	6
85	3	2	0	3	5	0	0
88	4	3	0	12	0	19	6
93	2	2	0	0	0	4	3
96	8	11	2	19	0	16	0
163	2	0	0	2	4	4	2
197	8	11	4	0	0	12	20
199	8	20	3	10	4	14	21
201	3	1	0	2	0	10	10
271	5	10	0	0	0	11	19
279	3	3	0	8	0	8	5

за критичним домінантним геном, або були гомозиготними, але рецесивний алель виникає під час споро- або гаметогенезу в гомозиготних рослинах. Ми віддаємо перевагу другому припущенню, тому що саме воно пояснює, звідки виникають гетерозиготи серед зелених рослин. А те, що вони з'являються, переконливо засвідчується постійним вищепленням блакитних рослин у генераціях зелених амфідиплоїдів.

Висновки. Результати вивчення амфідиплоїдів, інтрогресивних ліній та їхніх гібридів за кількома ознаками морфології рослин та двома біохімічними ознаками свідчать, що частина зразків рослинного матеріалу гібридного походження характеризується генетичною нестабільністю, яка відбивається на фенотипному рівні через ознаки, що вивчалися. Ті лінії, які виявилися при дослідженні стабільними, цілком можливо стабільними не є, просто елементи їхньої генетичної нестабільності не потрапили до тих, що були вивчені наразі. Генетична нестабільність рослинного матеріалу гібридного походження сьогодні вже не розглядається як виключення або артефакт, або доказ забрудненості матеріалу. У практичному аспекті її наявність примушує нас ретельно досліджувати генетичну стабільність інтрогресивних ліній, що використовуються при генетичному аналізі, саме щодо тієї ознаки (ознак), за якою лінії аналізуються.

*M.Z. Antonyuk, V.V. Shpylychyn,
T.K. Ternovska*

PERMANENT GENETIC VARIABILITY
IN INTROGRESSIVE LINES
AND AMPHIDIPOIDS OF *TRITICEAE*

National University of Kyiv-Mohyla Academy
E-mail: tern@ukma.kiev.ua

Hybrid origination of genome is regarded as a cause of genetic instability that is inherent in such genomes. Using the model of amphidiploids and introgressive wheat/*Aegilops* lines the proofs are given that in their genomes the permanent alterations are happened. They are displayed at the phenotypic level under studying the morphological and biochemical characters in sequential generations of certain genotypes and also in F₁ and F₂ hybrids. Both transposon action and intrachromosome arrangements through the gametocidal chromosome 4S^{sh} can be considered as recognized causes of such variability.

*M.Z. Antonyuk, V.V. Shpylychyn,
T.K. Ternovska*

PERMANENTНАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ИЗМЕНЧИВОСТЬ В ИНТРОГРЕССИВНЫХ
ЛИНИЯХ И АМФИДИПОИДАХ *TRITICEAE*

Гибридное происхождение генома организма в последнее время рассматривается как причина определенной генетической нестабильности, свойственной таким геномам. На модели амфидиплоидов и интрогрессивных линий пшеница – эгилопс приводятся доказательства постоянных изменений в их геномах, которые регистрируются на фенотипическом уровне при изучении морфологических и биохимических признаков в последовательных поколениях определенных генотипов, а также гибридов F₁ и F₂. Причинами такой изменчивости в условиях геномного стресса может быть как действие транспозонов, так и внутривхромосомные перестройки, обусловленные гаметоцидной хромосомой 4S^{sh}.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Жиров Е.Г., Терновская Т.К.* Геномная инженерия у пшеницы // Вестн. с.-х. науки. – 1984. – № 10. – С. 58–66.
2. *Антонюк М.З., Терновська Т.К.* Створення чужинно-заміщених ліній м'якої пшениці методом «змішування» хромосом у межах одного субгеному // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. Том 2. – Київ : Логос, 2001. – С. 368–375.
3. *Жиров Е.Г.* Геномы пшеницы: исследование и перестройка : Дис. ... д-ра биол. наук. – Краснодар, 1989. – 366 с.
4. *Терновская Т.К.* Замещение хромосом генома D мягкой пшеницы хромосомами геномов U или S¹ эгилопсов // Цитология и генетика. – 1994. – № 5. – С. 50–55.
5. *Терновская Т.К., Антонюк М.З., Созинов А.А.* Замещенные линии мягкой пшеницы с одной парой хромосом *Aegilops sharonensis* // Доп. НАН України. – 1995. – № 12. – С. 118–120.
6. *Вдовиченко Ж.В., Терновская Т.К.* Цитогенетическое изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы, устойчивых к мучнистой росе // Агроэкология та біотехнологія : Зб. наук. праць Ін-ту агроекології та біотехнології. – Київ, 1999. – Вип. 3. – С. 70–78.
7. *Маньковська О.С., Терновська Т.К., Антонюк М.З.* Цитологічна стабільність та життєздатність інтрогресивних ліній з гаметоцидною хромосомою 4S¹ та їх гібридів // Наук. зап. Нац. ун-ту «Кієво-Могилянська академія». – 2009. – Т. 93. Біологія та екологія. – С. 23–26.
8. *Жиров Е.Г., Терновская Т.К.* Передача пшенице *Triticum aestivum* L. хромосомы *Aegilops sharonensis* Eig., придающей ей устойчивость к мучнистой росе // Генетика. – 1993. – № 4. – С. 639–645.

9. Antonyuk M.Z., Bodylyova M.V., Ternovskaya T.K. Genome structure of introgressive lines *Triticum aestivum/Aegilops sharonensis* // Cytology and Genetics. – 2009. – 43, № 6. – С. 58–67.
10. Терновская Т.К. Геном D мягкой пшеницы. Наследование некоторых признаков морфологии колоса // Цитология и генетика. – 1997. – 31, № 4. – С. 11–18.
11. Терновская Т.К. Перестройка генома мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) для ее генетического анализа и интрогрессии генов : Дис. ... д-ра биол. наук. – Киев, 1999. – 417 с.
12. Шпильчин В.В., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Фенотипний поліморфізм за ознакою воскова осуга серед представників підтриби *Triticinae* // Наук. зап. Нац. ун-ту «Киево-Могилянська академія». – 2010. – Т. 106. Біологія та екологія. – С. 3–8.
13. Adams K.L., Percifield R., Wendel J.F. Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid // Genetics. – 2004. – 168. – P. 2217–2226.
14. Anssour S., Krügel T., Sharbel T.F. et al. Phenotypic, genetic and genomic consequences of natural and synthetic polyploidization of *Nicotiana attenuata* and *Nicotiana obtusifolia* // Ann. Bot. – 2009. – 103. – P. 1207–1217.
15. Gaeta R.T., Pires J.Ch., Iniguez-Luy F. et al. Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype // Plant Cell. – 2007. – 19. – P. 3403–3417.
16. Liu B., Xu Ch., Zhao N. et al. Rapid genomic changes in polyploid wheat and related species: implications for genome evolution and genetic improvement // J. Genet. Genom. – 2009. – 36. – P. 519–528.
17. Wang Y., Jha A.K., Chen R. et al. Polyploidy-associated genomic instability in *Arabidopsis thaliana* // Genesis. – 2010. – 48, № 4. – P. 254–263.
18. Zhao N., Xu L., Zhu B. et al. Chromosomal and genome-wide molecular changes associated with initial stages of allohexaploidization in wheat can be transit and incidental // Genome. – 2011. – 54, № 8. – P. 692–699.
19. Антонюк М.З., Терновская Т.К., Созинов А.А. Идентификация блоков электрофоретических компонентов запасных белков, кодируемых генами трех видов эгилопса // Физиология и биохимия культур. растений. – 1994. – 26, № 5. – С. 474–481.
20. Антонюк М.З., Терновская Т.К. Изоферменты бета-и альфа-амилазы для идентификации генетического материала трех видов *Aegilops*, включенного в геном мягкой пшеницы // Цитология и генетика. – 1995. – 29, № 2. – С. 3–9.
21. Glantz S.A. Primer of Biostatistics. – New York : McGraw-Hill, 2002. – 468 p.
22. Dvorak J., Deal K.R., Luo M.C. Discovery and mapping of wheat *Ph1* suppressors // Genetics. – 2006. – 174. – P. 17–27.
23. Endo T.R. Gametocidal chromosomes and their induction of chromosome mutations in wheat // Japan J. Genet. – 1990. – № 65. – P. 135–152.
24. Antonyuk M.Z., Prokopyuk D.O., Martynenko V.S., Ternovska T.K. Identification of the genes promoting awnedness in the *Triticum aestivum/Aegilops umbellulata* introgressive line // Cytology and Genetics. – 2012. – 46, № 3. – P. 136–143.
25. Shewry P.R., Holford N.G., Lafiandra D. Genetics of wheat gluten proteins // Adv. Genet. – 2003. – 49. – P. 111–171.
26. Ang S., Kogulanathan J., Gordon A.M. Structure and heterogeneity of gliadin: a hydrodynamic evaluation // Eur. Biophys. J. – 2010. – 39. – P. 255–261.
27. Gao S., Gu Y.Q., Wu J. Rapid evolution and complex structural organization in genomic regions harboring multiple prolamin genes in the polyploid wheat genome // Plant Mol. Biol. – 2007. – 65. – P. 189–203.
28. Kristin A., Hile S., Hile E. Every microsatellite is different: intrinsic DNA features dictate mutagenesis of common microsatellites present in the human genome // Mol. Carcinog. – 2009. – 48. – P. 379–388.
29. Gu Y.Q., Crossman C., Kong X. Genomic organization of the complex α -gliadin gene loci in wheat // Theor. Appl. Genet. – 2004. – 109. – P. 648–657.
30. Petit M., Guidat C., Daniel J. et al. Mobilization of retrotransposons in synthetic allotetraploid tobacco // New Phytol. – 2010. – 186. – P. 135–147.
31. Raskina O., Belyayev A., Nevo E. Activity of the En/Spm-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. // Chromosome Res. – 2004. – 12. – P. 153–161.
32. Liu Sh., Zhao Sh., Chen F., Xia G. Generation of novel high quality HMW-GS genes in two introgression lines of *Triticum aestivum/Agropyron elongatum* // Evol. Biol. – 2007. – 7. – P. 76–84.
33. Yuan Zh., Liu D., Zhang L. et al. Mitotic illegitimate recombination is a mechanism for novel changes in high-molecular-weight glutenin subunits in wheat-rye hybrids // PLoS. – 2011. – 6, № 6. – P. 51–60.
34. Joanin P., Hershberger R.J., Benito M.I., Walbot V. Sense and antisense transcripts of the maize MuDR regulatory transposon localized by in situ hybridization // Plant Mol. Biol. – 1997. – 33. – P. 23–36.

Надійшла 08.01.13