

frequency of chromosomal inversions dynamics due to thermal mode of existence populations. Long-term trend reversal frequency in the malaria mosquito population *Anopheles messeae* explains the effects of global warming.

Key words: chromosomal polymorphism, adaptation of species inversion of global warming.

УДК 631.523:575.222

ШПИЛЬЧИН В.В., МАРТИНЕНКО В.С., ТЕРНОВСЬКА Т.К.

Національний університет «Києво-Могилянська Академія» МОН України,
Україна, 04070, г. Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: vshpylchyn@bigmir.net

ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ АВРОТИКИ (ААВВТТ) ЗА ОЗНАКОЮ НАЯВНІСТЬ ВОСКОВОЇ ОСУГИ

Воскова осуга вкриває поверхню вегетативних органів всіх наземних рослин. У злаків восковий шар (осуга) може бути міцним і тоді рослина має блакитний відтінок (осуга у наявності), а може бути слабким, рослина виглядає зеленою (осуга відсутня). У м'якій пшениці (*Triticum aestivum* L.) інтенсивний шар осуги забезпечують домінантні алелі серії ортологічних генів, *W1* (2BS), *W2* (2DS). Рецесивні гомозиготи за цими генами воскової осуги не мають. Домінантні алелі іншої серії ортологічних генів, *Iw1* (2BS), *Iw2* (2DS), інгібують дію *W1* та *W2*, рецесивні алелі такої дії не мають [1]. Інший інгібітор осуги, *Iw3*(1BS) інгібує експресію промоторів воскової осуги хромосом групи 2 у колосі і не впливає на їхню експресію у листках пшениці [2]. За нашими даними, чужинно-заміщені лінії, в яких хромосома 1D сорту Аврора була заміщена гомеологом з геному *S Ae. speltoides* або *S^{sh} Ae. sharonensis*, характеризувалися яскраво-зеленим колосом та листками, вкритими восковою осугою. Отже, інгібітор воскової осуги *Iw3* властивий не лише тетраплоїдній пшениці, а й видам егілопса також.

Гексаплоїд Авротика (ААВВТТ) є амфідиплоїдом тетра-Аврори (АВ) та диплоїдного виду *Aegilops mutica* (Т). Сорт озимої м'якої пшениці Аврора, також як його тетракомпонент ААВВ, вкриті восковою осугою, *Aegilops mutica* не має воскової осуги. Щойно створений амфідиплоїд був зеленим, тобто не мав осуги. Отже, геном егілопсу несе домінантний інгібітор воскової осуги *Iw*. Серед гексаплоїдів Авротики незабаром з'явилися два нових морфотипи: Авротика 3 з більш рихлим колосом та Авротика 2, яка мала на колосі невеликі остеподібні відростки. Саме в Авротіці 2 за кілька генерацій серед зелених рослин з'явилися блакитні з міцним шаром

осуги. Пізніше, за 8–10 генерацій, серед зелених рослин Авротики 1 стали з'являтися блакитні рослини та рослини, колос яких зелений, а листя блакитне (зелено-блакитний зразок). Тобто незрозумілим чином у згаданому матеріалі відбувається зміна стану гена – інгібітора воскової осуги з домінантного до рецесивного, і, відповідно, втрачається його інгібіторна дія. Процес появи блакитних або зелено-блакитних рослин серед нащадків зелених набув перманентного характеру та спостерігається не лише в Авротіці, а й в інших геномно-заміщених амідиплоїдах, а також у чужинно-заміщених ліній, від них отриманих, геть до втрати зелених зразків.

Останнім часом в літературі надається все більше уваги процесам, які відбуваються в природних та штучно створених амфідиплоїдах під час формування їхнього геному [3–5]. Схоже, що у геномі Авротики, якій має інтрогресивне походження, відбувається якийсь процес, наслідком чого є мутування домінантного алелю до рецесивного з частотою, яка набагато перевищує відомі нам середні частоти спонтанного виникнення мутації на ген на покоління. У статті представлено результати гібридологічного аналізу різних морфотипів Авротики за ознакою наявності/відсутності воскової осуги та мікросателітним локусам, локалізованим у коротких плечах хромосом групи 2 гомеологів пшениці, виконаного з метою ідентифікації гена, який змінюється при зміні градації ознаки.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал: амфідиплоїди Авротика (ААВВТТ), контрастні за ознакою воскової осуги: зелені Авротика 1 та Авротика 2 (без воскової осуги), зелено-блакитна Авротика 1 (колос без воскової осуги, листки з восковою осугою), блакитна Авротика 2 (з

восковою осугою). Гібриди F_1 , та F_2 та F_3 від схрещування контрастних морфотипів. Воскову осугу компонентів схрещування та гібридів оцінювали візуально і рослину характеризували однією з трьох градацій: 1 – воскова осуга у наявності (блакитна), 2 – воскова осуга відсутня (зелена), 3 – колос без воскової осуги, листя вкриті осугою (зелено-блакитна).

ДНК виділяли за модифікованою із STAB-буфером. Мікросателітний аналіз з праймерами SSR-локусів, специфічних до хромосом 2B та 2D м'якої пшениці, виконано на ДНК рослин F_3 . Генотип рослин F_2 за аллелями мікросателітних локусів визначали за чотирма нащадками F_3 . Для перевірки відповідності між отриманими та очікуваними обсягами фенотипних класів використовували критерій χ^2 та точний критерій Фішера.

Результати та обговорення

Гаплотиipi різних морфотипів Авротики було запропоновано на основі інформації про їхнє походження [6] та відомостей про генетичний контроль ознаки [1]. Частина геному AABV Авротики має бути $W1 iw1$, генів $W2$ та $iw2$ в ньому немає, оскільки відсутній субгеном D. Ген $Iw3$ в хромосомі 1B представлений рецесивним алелем $iw3$, інакше сорт Аврора мав би зелений колос та блакитне листя, а це не так. Оскільки амфідиплоїд блакитного тетракомпонента AABV Аврори та зеленого диплоїда *Ae. mutica* є зеленим, геном T у хромосомі гомологічної групи 2 містить доміантний ген $Iw2(T)$, член однойменної серії ортологів *Triticinae*. Його епістатична дія пригнічує прояв гену $W1$, розташованого у хромосомі 2B. Доміантний інгібітор $Iw3(T)$ цілком може бути наявним у хромосомі 1T, хоча його прояв маскується епістатичною дією гена $Iw2(T)$: гібриди F_1 від схрещування зелених та зелено-блакитних рослин, як правило, зелені [7]. Для Авротики це припущення підтверджується вищепленням з зеленої Авротики 1 рослин зелено-блакитних. Тому вихідний амфідиплоїд Авротики мав мати гаплотип $iw3 W1 iw1 Iw2(T) Iw3(T)$, а зелено-блакитна форма – $iw3 W1 iw1 iw2(T) Iw3(T)$, розрізняючись лише за одним геном. Між зеленою Авротикою 1 та блакитною Авротикою 2 припущено різницю у два гени, гаплотип блакитної форми $iw3 W1 iw1 iw2(T) iw3(T)$.

Запропоновані гаплотиipi знайшли підтвердження у результатах гібридологічного аналізу при схрещуванні контрастних фенотипів. Раніше нами було показано [7, 8], що при схрещуванні контрастних генотипів

розщеплення за фенотипними класами у F_2 та BC_a не відповідає очікуваним співвідношенням при моно- чи дигенної моделі успадкування через суттєве збільшення проти теоретично очікуваного обсягу фенотипного класу «блакитні рослини». Більш того, в кількох випадках від схрещування зелених (доміантна ознака) з блакитними чи зелено-блакитних (доміантна ознака) з блакитними рослинами F_1 мали рецесивний блакитний фенотип. Тому надалі при підготовці матеріалу до гібридизації всі рослин з доміантним фенотипом, які були задіяні в отриманні гібридів F_1 у якості материнських чи батьківських форм, перевірялось на гомозиготність через спостереження за нащадками, отриманими від самозапилення кожної рослини, що брала участь у схрещуванні. Так було зроблено через те, що, за нашими багаторічними спостереженнями, вищеплення блакитних рослин серед нащадків доміантного фенотипу спостерігалось постійно, і виникла думка про те, що доміантні рослини, які ми беремо у якості компонента схрещування, можуть бути гетерозиготними та бути причиною спотворення співвідношення розщеплення проти очікуваного. Результати розщеплення в F_2 це припущення підтвердили. Коли у схрещування брали участь тільки гомозиготні рослини з доміантним фенотипом, співвідношення розщеплення не відрізнялось від моногібридного для комбінацій Авротики 2 зелена x Авротики 2 зелено-блакитна ($\chi^2 = 0,55$), Авротики 2 зелено-блакитна x Авротики 2 блакитна ($\chi^2 = 0,79$), Авротики 1 зелена – Авротики 1 зелено-блакитна ($\chi^2 = 0,48$). Співвідношення розщеплення 12 : 3 : 1, характерне для дигібридного розщеплення з доміантним епістазом між генами спостерігали при схрещуванні Авротики 2 зелена x Авротики 2 блакитна ($\chi^2 = 4,24$), Авротики 1 зелена x Авротики 2 блакитна ($\chi^2 = 3,23$).

Результати гібридологічного аналізу довели, що різниця між контрастними за фенотипом формами Авротики забезпечується одним геном для зеленої та зелено-блакитної Авротики 1 та двома генами для зеленої та блакитної Авротики 2. Вивчення поліморфізму контрастних форм за мікросателітними локусами та його можливого зв'язку з ознакою наявності/відсутності осуги було здійснено для коротких плечей хромосом 2B та 2D. Вибір саме цих хромосом пояснюється, що на них локалізовані інгібітори воскової осуги Iw , епістатичні як до генів $W1$ та $W2$, так і до гена $Iw3(T)$. Отже, мікросателітному аналізу було

піддано популяцію [Авротика 1(2) x Авротика 2(1)]F₂, яка розщеплюється за геном *Iw2(T)*.

Мікросателітні локуси вважаються одними з найефективніших молекулярних маркерів через високий рівень їхнього поліморфізму, чинником якого є молекулярна структура сукупності повторів. SSR-локусів, специфічних для генома Т, поки не ідентифіковано, а, судячи з припущених нами гаплотипів, розщеплення відбувається за генами саме цього геному. Із 9 перевірених локусів, специфічних для хромосоми 2В, продукту не дав один, а поліморфними для контрастних батьківських форми були лише два, *Xwms429* та *Xbarc167*. Із 18 локусів, специфічних до хромосоми 2D, продуктів не було отримано з 7 парами праймерів, а поліморфними виявилися 3 локуси, *Xbarc142*, *Xwms102* та *Xwms702*. Цей останній результат узгоджується з відсутністю геному D в рослинах та підтверджує гомеологію між геномами Т та D, про яку свідчить також регулярне утворення бівалентів між хромосомами цих двох геномів.

Перевірка кожного з п'яти поліморфних локусів на відповідність моногенному розщепленню серед рослин F₂ гібриду Авротика 1 зелена x Авротика 2 блакитна показала, що всі п'ять SSR-локусів є селективно нейтральними та можуть бути використані для перевірки їхнього зв'язку з ознакою інтересу (за результатами розрахунку χ^2 або точного критерію Фішера $P > 0,05$ для всіх локусів). Розподіл нащадків F₂ за сполученням алелів двох мікросателітних локусів, специфічних для хромосоми 2В, свідчить, що батьківські сполучення алелів переважають над рекомбінантними: 5 рослин із гаплотипом 208-254 та 8 рослин з гаплотипом 206-260 проти теоретично очікуваних двох рослин. Це відповідає факту розташування цих локусів на хромосомі 2В (рис. 1).

На невеликій відстані від локусів *Xwms429* та *Xbarc167* локалізовані два гени, що беруть участь у контролі воскової осуги, *W1* та *Iw1*. Проте запропоновані нами гаплотипи батьківських форм не завбачують розщеплення за цими генами, адже є однаковими за ними. Гаплотип 206-260 за мікросателітними локусами хромосоми 2 притаманний Авротичі 2 з восковою осугою. Якщо розщеплення за ознакою наявності/відсутності воскової осуги дійсно не має відношення до локусів *Xwms429* та *Xbarc167*, серед рослин F₂ з гаплотипом 206-260 теоретично очікується 6 зелених та 2 блакитні, насправді було 5 зелених та 3

блакитні, що не відрізняється від очікуваних кількостей (за точним критерієм Фішера, $P = 1,0$). Отже, за генами *W1* та *Iw1* розщеплення дійсно не відбувається, що підтверджує запропоновані нами гаплотипи батьківських рослин.

З праймерами до локусів, специфічних до хромосоми 2D, відбувається ампліфікація ДНК Авротики з геномом ААВВТТ, де геному D немає. Зважаючи на добре задокументоване явище transferability для різних геномів *Triticinae*, цілком легітимним є припущення, що локуси *Xbarc142*, *Xwms102* та *Xwms702* є специфічними не лише для хромосоми 2D, а й для хромосоми 2Т. При цьому не можна виключити також можливість ампліфікації ДНК хромосоми 2В з праймерами локусів, специфічних для хромосоми 2D. В такому випадку, зважаючи на хромосомну локалізацію п'яти мікросателітних локусів, що розглядаються (рис. 1), слід очікувати асоційованого успадкування алелів мікросателітних локусів, специфічних для хромосом 2В та 2D. Вивчення рослин F₂ за сумісним розщепленням за алелями мікросателітних локусів, специфічних для хромосом 2В та 2D, показало, що вони успадковуються незалежно один від одного. Це прямо вказує на те, що ампліфікація з праймерами до локусів хромосоми 2D відбувається з ДНК хромосоми 2Т, а не 2В.

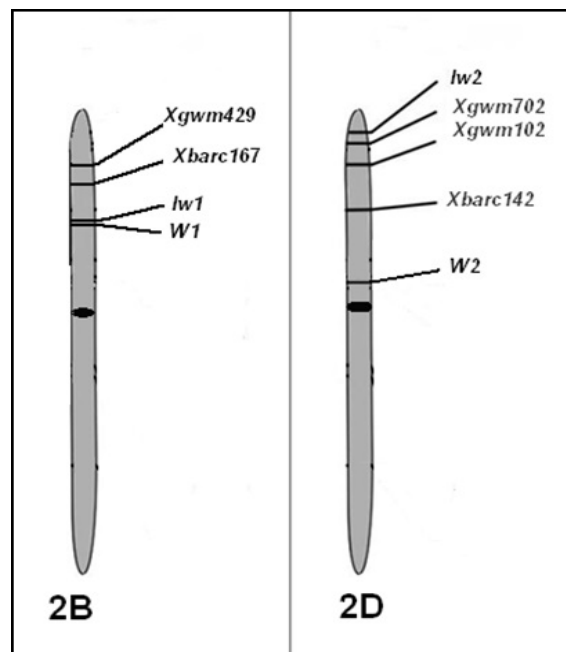


Рис. 1. Хромосомна локалізація мікросателітних локусів, що вивчалися, та генів воскової осуги (<http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/graingenes/browse.cgi?class=marker> [1, 9])

Перевірка незалежності успадкування трьох мікросателітних локусів, розташованих на хромосомі 2Т, не виявила зв'язку між локусами *Xbarc142* та *Xwms102*, *Xbarc142* та *Xwms702*, в той час як успадкування алелів локусів *Xwms102* та *Xwms702* у батьківських сполученнях переважало над незалежним їх успадкуванням. Рослин F₂ з гаплотипом 203 147, що він характеризує Авротику 1 зелену, було 5, а з гаплотипом 195 144, властивим Авротиці 2 блакитній – 4 замість теоретично очікуваних двох в обох випадках. Ці локуси розташовані поруч на карті хромосоми 2D, таке їхнє розташування зберігається на хромосомі 2Т.

З двох генів, *Iw2(T)* *Iw3(T)*, за якими, виходячи з запропонованих гаплотипів батьківських форм відбувається розщеплення, ми можемо дослідити на зв'язок з мікросателітними алелями лише ген *Iw2(T)*, оскільки ген *Iw3(T)* має бути розташований у хромосомі 1Т, яку ми не досліджували за допомогою мікросателітів. За локусом *Xwms102* блакитній Авротиці 2 властивий алель 195. Серед 8 рослин F₂, гомозиготних за цим алелем, було 6 зелених та 2 блакитних та зелено-блакитних, які формуються генотипом *iw2(T) iw2(T)*. Саме такі кількості очікуються при незалежному успадкуванні локусів *Xwms102* та *Iw2(T)* (за точним критерієм Фішера, P = 1,0). Серед 10 рослин F₂, гомозиготних за властивим тій самій формі алелем 268 локусу *Xbarc142*, було 6 зелених та 4 блакитних та зелено-блакитних, що не відрізнялось від очікуваних величин 8 та 2, відповідно (за точним критерієм Фішера, P = 0,628). Серед 10 рослин F₂, гомозиготних за алелем 144 локусу *Xwms702*, властивого блакитній формі Авротики 2, було 2

зелених та 8 блакитних і зелено-блакитних рослин проти 8 та 2 очікуваних, відповідно (за точним критерієм Фішера, P = 0,023, різниця достовірна рівні значущості 0,05). Отже, ген *Iw2(T)* та локус *Xwms702* не характеризуються незалежним успадкуванням і можуть бути зчепленими у хромосомі 2Т.

Висновки

Беручи до уваги походження та структуру геному різних морфотипів Авротики, а також їхні гаплотипи щодо генів ортологічних серій *W* та *Iw*, слід вважати, що розщеплення відбувається за геном, розташованим у геномі Т, який замінив собою геном D м'якої пшениці. Ген позначено *Iw2(T)*. Контрастні за ознакою воскова осуга морфотипи геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротики відрізняються за одним (зелена – блакитно-зелена Авротики) та двома (зелена – блакитна Авротики) генами. В першому випадку відбувається мутація *Iw2(T) → iw2(T)* і після самозапилення утворюється зелено-блакитний морфотип. Для виникнення блакитного морфотипу потрібна ще одна мутація на додаток до першої: *Iw3(T) → iw3(T)* з наступним самозапиленням. Поява блакитних рослин серед нащадків зеленої Авротики 2 спостерігається регулярно, хоча для цього потрібно одночасне мутування в двох генах. Факт одночасного мутування в двох різних генах не може бути пояснений з позицій випадковості мутагенезу. Пояснення такому факту слід шукати у молекулярних подіях, які відбуваються під час стабілізації геному гібридного походження, а саме такими є геноми Авротики, геномно-заміщеного амфідиплоїда, в якому субгеномі А та В м'якої пшениці сполучається з геномом Т диплоїдного егілопу.

Література

1. Tsunewaki K., Ebana K. Production of near-isogenic lines of common wheat for glaucousness and genetic basis of this trait clarified by their use // *Genes and Genetic systems*. – 1999. – 74. – P. 33–41.
2. Dubcovsky J., Echaide M., Giancola S., Rousset M., Luo M.C., Joppa L.R., Dvorak J. Seed-storage-protein loci in RFLP maps of diploid, tetraploid, and hexaploid wheat // *Theor. Appl. Genet.* – 1997. – 95. – P. 1169–1180.
3. Liu B., Xu Ch., Zhao N., Qi B., Kimatu J.N., Pang J., Han F. Rapid genomic changes in polyploid wheat and related species: implications for genome evolution and genetic improvement // *J. Genet. Genomics*. – 2009. – 36. – P. 519–528.
4. Tiwari V.K., Rawat N., Neelam K., Kumar S., Randhawa G.S., Dhaliwal H.S. Random chromosome elimination in synthetic *Triticum-Aegilops* amphiploids leads to development of a stable partial amphiploid with high grain micro- and macronutrient content and powdery mildew resistance // *Genome*. – 2010. – 53, N 12. – P. 1053–1065.
5. Zhao N., Xu L., Zhu B., Li M., Zhang H., Qi B., Xu C., Han F., Liu B. Chromosomal and genome-wide molecular changes associated with initial stages of allohexaploidization in wheat can be transit and incidental // *Genome*. – 2011. – 54, N 8. – P. 692–699.
6. Жиров Е.Г. Геномы пшеницы: исследование и перестройка: Дис. ... докт. биол. наук: 03.00.15. – Краснодар. – 1989. – 366 с.

7. Шпильчин В.В., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Фенотипний поліморфізм за ознакою воскова осуга серед представників підтриби *Triticinae* // Наукові записки НаУКМА. – 2010. – 106. Біологія та екологія. – 2011. – С. 3–8.
8. Шпильчин В.В., Терновська Т.К. Зміна прояву ознаки воскова осуга у генераціях амфідиплоїдів підтриби *Triticinae* // Наукові записки НаУКМА. – 2011. – Біологія та екологія. – 119. – С. 3–7.
9. Ganai M.W., Ruder M.S. Microsatellite and SNP markers in wheat breeding. Genomics-Assisted Crop Improvement. Genomic Applications in Crops. R.K. Varshney, R. Tuberosa Eds. – Springer, 2007. – 2. – P. 1–24.

SHPYLCHYN V.V., MARTYNENKO V.S., TERNOVSKA T.K.

National University of "Kyiv-Mohyla Academy",

Ukraine, 04070, Kyiv, Skovorody str., 2, e-mail: vshpylchyn@bigmir.net

GENETIC ANALYSIS OF AUROTICA (AABBTT) BASED ON GLAUCOUSNESS TRAIT

Aims. The aim of our work is to identify genotypes of the three morphotypes of genome-substituted Aurotica amphidiploids, which demonstrate permanent variation by the genes controlling the glaucousness trait.

Methods. Genetic analysis through crossing and assessment of segregating populations. PCR of genome DNA of alternative genotypes. **Results.** Haplotypes of contrasting morphotypes based on glaucousness trait: Aurotica green *iw3 W1 iw1 Iw2(T) Iw3(T)*, Aurotica green-blue *iw3 W1 iw1 iw2(T) Iw3(T)*, Aurotica blue *iw3 W1 iw1 iw2(T) iw3(T)*. Based on the results of SSR analysis *Iw2* is one of the segregated genes, which is located on T genome, not on B genome. **Conclusions.** Contrasting Aurotica morphotypes differ by one mutation *Iw2(T)→iw2(T)* (green – blue Aurotica) or two, the second mutation is *Iw3(T)→iw3(T)* (green – green-blue Aurotica).

Key words: glaucousness, microsatellite, amphidiploids.

УДК 575.2+575.222.73

ШТЕФІЮК Т.В., АНТОНІУК М.З.

Національний університет «Києво-Могилянська Академія» МОН України,

Україна, 04070, м. Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: m_antonyuk@yahoo.com

МІКРОСАТЕЛІТНИЙ АНАЛІЗ ХРОМОСОМ 6D ТА 7D ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ, СТІЙКИХ ДО БОРОШНИСТОЇ РОСИ

Найбільш ефективним заходом для боротьби з борошнистою росою пшениці є вирощування сортів з генетичною стійкістю до цього захворювання. На сьогодні на 18 хромосомах різних зразків м'якої пшениці локалізовано понад 40 локусів з різною кількістю алелів, що контролюють стійкість до борошнистої роси [1]. Більшість з ідентифікованих генів стійкості є компонентами системи ген-на-ген, це домінуючі гени *R*, які мають спеціальну назву *Pm* та обумовлюють вертикальну стійкість рослин. Стійкість, що цими генами забезпечується, швидко долається завдяки природній еволюції збудника. Особливо помітним цей процес є для генів стійкості, широко розповсюджених у світі, які входять до складу генома більшості сортів, стійких до борошнистої роси. Саме з цим пов'язана необхідність постійного поновлення запасу генів стійкості у генетичному пулі м'якої пшениці. Близько 30 з таких генів пов'язані

своїм походженням зі спорідненими до м'якої пшениці видами, проте лише 10 отримано від видів, які не мають спільних з м'якою пшеницею генів [1, 2]. Серед них гени *Pm12*, *Pm32* отримано від *Aegilops speltoides* [1] і вони зберігають свою ефективність тривалий час, *Pm39* – від *Ae. umbellulata*. Якщо геноми – донори та реципієнти гена стійкості є різними, це ускладнює передачу гена за рахунок рекомбінації, фрагмент з геном стійкості транслокується до реципієнтного генома, результати цього процесу не можна передбачити, а реципієнтний геном переживає певну перебудову, яка може відбиватися на його властивостях та має вивчатися. Мікросателітні локуси (SSR) можна використовувати для отримання уявлення про те, наскільки значно перебудувався геном інтрогресивних ліній, які отримали ген стійкості від генома, з яким не кон'югують хромосоми резидентного геному, стосовно інтактного реципієнтного генома [3].