

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].

Матеріали і методи

Гексаплоїдні цитологічно сталі та стійкі до борошнистої роси лінії м'якої пшениці є похідними одного з геномно-заміщених амфідиплоїдів з геномною формулою AABBXX, де AABB є тетраплоїдним компонентом м'якої пшениці сорту Аврора, а XX – геномом *Aegilops speltoides* у Авродесу (AABBSS), *Ae. sharonensis* у Аврозису (AABBS^{sh}S^{sh}) та *Ae. umbellulata* у Авролати (AABBUU) [4]. Вивчено ДНК сорту Аврора, амфідиплоїдів Авродес, Аврозис, Авролата, 18 ліній – похідних Авродесу, 3 ліній – похідних Аврозису, 12 ліній – похідних Авролати щодо спектру ампліконів з праймерами мікросателітних локусів, специфічних до хромосом 6D та 7D *Triticum aestivum* (рис. 1). Методику виділення ДНК та умови ПЛР оприлюднено [5]. Через малий обсяг вибірок статистичну обробку проводили з використанням точного критерію Фішера.

Результати та обговорення

Із всіх перевірених мікросателітних локусів, специфічних до хромосом 6D та 7D, було обрано 5, 3, 4 та 4 таких, що давали різний продукт ампліфікацій на ДНК Аврори та геномно-заміщених амфідиплоїдів та були декларовані при їхньому створенні як специфічні, відповідно, до 6DS, 6DL, 7DS, 7DL. Очікувалось, що вони не даватимуть продуктів ампліфікації на ДНК амфідиплоїдів, позбавлених геному D. Це виявилось вірним зі всіма локусами хромосоми 6D (табл. 1) та локусами *Xcfd41*, *Xbarc111*, *Xbarc53*, *Xcfd69* хромосоми 7D для ДНК Авролати та локусами хромосоми 6D *Xcfd42*, *Xcfd287*, *Xcfd60* та *Xbarc111*, *Xbarc53*, *Xcfd69* хромосоми 7D для Авродеса. ДНК Аврозиса не дала продукт майже по всім локусам, за виключенням *Xcfd42*, *Xbarc96*, *Xgwm44*, *Xcfd69*.

Статистично значущої різниці у наявності/відсутності продукту ампліфікації між трьома амфідиплоїдами встановлено не було ($P = 0,031$ та $P = 0,459$ для хромосом 6D та 7D, відповідно). Лише три локуси, *Xcfd60-6D*, *Xbarc111-7D*, *Xbarc53-D*, виявилися специфічними до відповідних хромосом, з праймерами локусу *Xgwm44* було отримано продукт з ДНК всіх амфідиплоїдів. Ампліфікацію ДНК з праймерами локусів, специфічних до геному D, якого немає у амфідиплоїдів може бути викликано будь-яким з двох чинників: локуси, задекларовані як специфічні для геному D, можуть бути у наявності в інших геномах, в тому числі

субгеномах A та B пшениці, та геномах S, S^{sh}, U; локуси є специфічними до D-геному, проте геноми амфідиплоїдів перебудовані настільки, що сегменти D-хромосом присутні як транслокації на хромосомах інших субгеномів. Друга причина здається нам мало ймовірною, оскільки перевірка кон'югації хромосом в мейозі МКП амфідиплоїдів не реєструвала наявність мультивалентів, які б мали бути за наявності транслокованих хромосом [6]. Отже, йдеться про не специфічність локусів до D геному. Тим не менш, вони можуть бути корисними для вивчення ліній щодо аналогічності їхнього генотипу рекурентному генотипу Аврора, тому що поява у спектрі амфідиплоїда продукту ампліфікації, не властивого ДНК Аврори, свідчить, що ампліфікується геном, якого у Аврори немає, тобто S, S^{sh} або U.

Характеристики стійких ліній показали, що жодна з них за набором SSR-локусів для хромосом 6D та 7D не відповідає ні Аврорі, ні відповідному амфідиплоїду (табл. 1). Це може бути доказом того, що жодна лінія не має повного чужинного заміщення 6D чи 7D або хоча б одного плеча. Судячи з набору алелів SSR-локусів (рис.), хромосоми виглядають перебудованими, такими, що включають сегменти хромосоми D-геному та чужинної хромосоми. Проте раніше нами вже було показано на групі інтрогресивних ліній, ретельно проаналізованих щодо обсягу включень. Результати скрикування чужинного хроматину з застосуванням мікросателітного та цитологічного аналізу [7] та у дослідженні хромосоми 3D, побудованому аналогічно даному дослідженню [5], що результати мікросателітного аналізу не бувають однозначними, коли досліджуються геноми гібридного походження.

Як і при вивченні ліній за хромосоною 3D [5], спостерігали велику кількість нових алелів, в тому числі утворення 0-алелів, коли такий алель не був властивий жодному з компонентів вихідного схрещування. З 16 вивчених локусів нових алелів не було лише в двох, *Xcfd60-6D* та *Xcfd41-7D*. Обидва розташовані усередині плечей. Крім того, спостерігали гетерозиготні генотипи (табл. 2). Порівняння ліній, що пішли від Авродеса та від Авролати за картиною змін проте очікуваної наявності батьківських алелів в будь-якому сполученні, показало, що статистично процес утворення нових алелів не характеризується видоспецифічністю (табл. 2, останній рядок).

Таблиця 1. Характеристика інтрогресивних ліній за мікросателітними локусами, специфічними до хромосом 6D та 7D. 0 – ампліфікація не відбулася, 1 – алель, притаманний Аврорі, 2 – алель, притаманний генотипно-заміщеному амфідиплоїду, н – новий алель, г – гетерозигота

Амфідиплоїди та лінії, що від них походять	SSR-локуси локалізовані на 6D							SSR-локуси локалізовані на 7D								
	<i>Xbarc173</i> S	<i>Xcfd42</i> S	<i>Xcfd132</i> S	<i>Xbarc196</i> S	<i>Xcfd287</i> S	<i>Xcfd95</i> L	<i>Xcfd60</i> L	<i>Xbarc96</i> L	<i>Xwmc506</i> S	<i>Xcfd41</i> S	<i>Xbarc154</i> S	<i>Xgwm44</i> S	<i>Xbarc172</i> L	<i>Xbarc111</i> L	<i>Xbarc53</i> L	<i>Xcfd69</i> L
Авродес	1	0	1	1	0	2	0	1	2	2	2	2	2	0	0	0
3	н1	1	1	1	0	2	1	1	1	1	1	2	1+н1	1	1	1
3-1	н1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	2	н1	1	0	1	1
4	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	2	2	1	0	1	1
7	1+н2	1	1	н1	0	2	1	1	н1	1	1	н3	2+н1	н1	1	1
12-1	1	1	1	1	0	2	1	1	1	1	2	н1	1	1	1	1
25	1	1	1	н1	0	2	1	1	н2	0	2	1	1+н1	н1	1	1
33-2	1	1	1	н1	0	2	1	1	н1	1	1	г1	н2	1	1	1
38	н3	1	1	1	0	1	н1	1	1	1	1	г2	н1	н2	1	1
39	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	г1	1	н1	1	н1
53	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	н4	1	1	1	н1
55	1	1	1	1	0	2	1	1	н1	0	2	г2	0	0	1	1
70	1	1	1	1	0	2	1	1	1	1	1	г2	н2	н1	1	1
83	0	1	1	1	0	2	1	0	1	1	2	н2	н1	1	1	0
1092	н3	1	1	н1	0	2	1	1	1	1	1	н5	1	1	1	1
1105-1	1	1	1	н1	0	2	1	1	1	1	1	1	н3	1	1	1
1106	1	1	1	н1	0	2	1	1	1	1	1	г1	н3	н3	0	1
1112	1	1	0	н2	0	1	0	н1	1	0	2	н5	0	0	0	1
1114	1+н2	1	1+н1	1+н2	0	1	н2	н2	н1	1	1	г1	1	0	1	1
Аврозис	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	2
113	1	0	1	1	н1	1	1	н1	1	1	н1	1	н	1	1	1
141	1+н	0	1	1	0	1	н1	1	1	1	1	1	н	1	1	1
143	1	н	н	н	н2	1	1	2	1	1	1	г	1	1	1	1
Авролата	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	2	0	0	0
166	н1	0	1	1	0	1	1	н1	1	1	1	1	1	1	1	1
190	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
206	н1	0	1	1+н	0	1	1	1	1	1	1	н1	1	1	н1	1
207	1	0	1	н1	0	1	1	н1	1	1	1	1	1	н1	н2	1
212-2	н1	0	н1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
215	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	н2	1	1	1	1
216-3	1	н1	1	н1	0	1	1	н1	1	1	1	1	1	1	0	1
217	1	н1	н1	н1	0	1	1	1	1	1	н2	1	1	1	1	1
221-1	1	0	н1	н1	0	1	1	н1	1	1	н2	1	1	0	0	1
221-2	н1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	н2	н1	1	1	1
222	1	н1	1	н1	0	1	1	н1	1	1	1	1	1	1	1	1
254	0	1	н1	0	0	1	0	н1	0	0	0	0	0	0	0	1
2599	н2	1	1	1	0	1	1	н2	1	1	1	1	н2	1	1	1

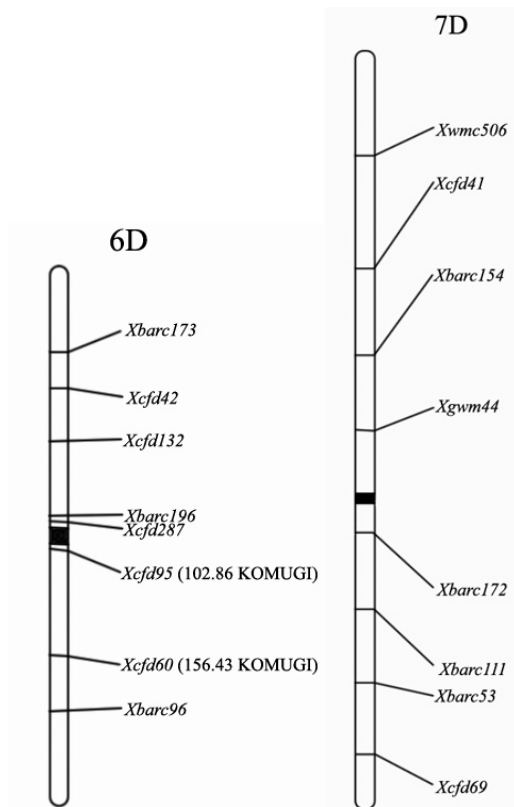


Рис. Розташування вивчених SSR-локусів на хромосомах 6D та 7D

Таблиця 2. Мінливість за мікросателітними локусами в інтрогресивних лініях та імовірність (P) розбіжностей за мінливістю між сукупністю ліній різного походження

Алель	SSR-локуси локалізовані на 6D								SSR-локуси локалізовані на 7D							
	<i>Xbarc173 S</i>	<i>Xcfd42 S</i>	<i>Xcfd132 S</i>	<i>Xbarc196 S</i>	<i>Xcfd287 S</i>	<i>Xcfd95 L</i>	<i>Xcfd60 L</i>	<i>Xbarc96 L</i>	<i>Xwmc506 S</i>	<i>Xcfd41 S</i>	<i>Xbarc154 S</i>	<i>Xgwm44 S</i>	<i>Xbarc172 L</i>	<i>Xbarc111 L</i>	<i>Xbarc53 L</i>	<i>Xcfd69 L</i>
Кількість ліній – похідних Авродесу з певними алелями																
батьківський	8	18	16	9	18	18	16	12	13	14	18	4	7	12	18	18
новий	4	0	0	7(2)	0	0	2(2)	2(2)	5(2)	4	0	7	6	6(3)	0	0
0-алель	4	0	1	1	0	0	0	4	0	0	0	0	2	0	0	0
гетерозигота	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	7	3	0	0	0
Кількість ліній – похідних Авролати з певними алелями																
батьківський	8	9	9	7	13	13	13	6	12	13	9	7	10	12	11	13
новий	5(2)	4(2)	4	5				7(2)			3(2)	3(2)	2(2)	1	2(2)	
0-алель									1		1	3	1			
гетерозигота				1												
P	0,47	0,02	0,21	1,0	1,0	1,0	0,50	0,29	0,36	0,12	0,02	0,13	0,07	0,19	0,17	1,0

Щодо розташування мікросателітного локусу на хромосомі, результати не можна трактувати однозначно. Так, при порівнянні співвідношення між батьківськими та новими алелями мікросателітів статистичну різницю на користь припущення, що прицентромерним мікросателітам притаманна стабільність, було встановлено для обох плечей хромосоми 6D для ліній – похідних Авродеса ($P = 0,003$ для короткого та $P = 0,019$ для довгого), але лише для довгого плеча ($P = 0,005$) для ліній – похідних Авролати. Для мікросателітів хромосоми 7D в жодному з чотирьох порівнянь значущої різниці не було.

Мінливість усередині мікросателітних повторів взагалі підвищена у порівнянні з іншими локусами. Сама повторювана природа таких локусів збільшує частоту мутування в їхніх межах під час реплікації та кросинговеру. Гібридна природа геномів інтрогресивних ліній, в яких відбувається інтенсивний процес молекулярної стабілізації та активується рух транспозонів, по-видимому, очевидно є ще одним чинником виникнення нових, щодо батьківських, алелів мікросателітів. Тому, результати мікросателітного аналізу не можна трактувати однозначно при вивченні геномів таких ліній. Свідчити на користь факту заміщення пшеничної хромосоми або її плеча чужинними гомологами без даних цитологічного аналізу вони не можуть, проте цілком придатні для визначення гомологічної належності чужинного хроматину. Крім того, розташування на хромосомі мікросателітного локусу, за яким лінії демонструють алель, властивий амфідиплоїду, дає можливість оцінити розмір фрагмента пшеничної

хромосоми, заміщений на чужинний, а від цього залежить цінність лінії як потенційного джерела чужинного гена стійкості.

Висновки

Інтрогресивні лінії м'якої пшениці, стійкі до борошнистої роси, мають включення чужинного хроматину замість пшеничного хроматину хромосом 6D та 7D трьох видів егілопсу. Лінії характеризуються алельним поліморфізмом за вісьмома локусами, специфічними для хромосоми 6D та такою ж кількістю – для 7D. Специфічність вивчених локусів для D геному обмежена. Для багатьох з них показана можливість ампліфікації ДНК геномів егілопсів. Алельний поліморфізм ліній виходить за межі, встановлені генотипами батьківських форм, що брали участь в їхньому створенні. Зареєстровано наявність нових у порівнянні з батьківськими генотипами алелів мікросателітних локусів. Рівень алельної мінливості за вивченими локусами хромосом 3D та 7D виявився однаковим для груп інтрогресивних ліній, що мали інтрогресії від *Ae. speltoites* та *Ae. umbellulata*. Оскільки алельний поліморфізм серед ліній виходить за межі батьківських форм ініціальних гібридів, він не може бути пояснений лише прямою інтрогресією чужинного хроматину до геному м'якої пшениці. Результати аналізу варто використовувати для встановлення хромосомної локалізації гена (генів) стійкості ліній до борошнистої роси через скринювання популяцій, що розщеплюються, від схрещування стійких ліній одна з одною та генотипом Аврора, а також для ідентифікації мікросателітного маркера гену стійкості хоча б в межах чужинного фрагменту хроматину.

Література

1. McIntosh R.A., Yamazaki Y.Y., Dubkovsky J. et al. Catalogue of gene symbols for wheat / 12th International Wheat Genetics Symposium, 8–13 September, 2013.
2. Gill B.S., Friebe B., Raupp W.J. et al. Wheat Genetics Research Center: the first 25 years // *Advances in Agronomy*. – 2006. – 89. – P. 73–136.
3. Ayala-Navarrete L., Thompson N., Ohm H., Anderson J. Molecular markers show a complex mosaic pattern of wheat-*Thinopyrum intermedium* translocations carrying resistance to YDV [Електронний ресурс] // *Theor. Appl. Genet.* – 2010. – Режим доступу: DOI 10.1007/s00122-010-1365-y.
4. 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*. – Київ: Логос, 2001. – 2. – С. 368–375.
5. Антонюк М.З., Штефюк Т.С., Терновська Т.К. Поліморфізм інтрогресивних ліній м'якої пшениці за алелями мікросателітних локусів // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. – Київ: Логос, 2013. – 12. – С. 97–101
6. Жиров Е.Г., Терновская Т.К. Геномная инженерия у пшеницы // *Вестник с.-х. науки*. – 1984. – № 10. – С. 58–66.

7. Antonyuk M.Z., Bodylyova M.V., Ternovskaya T.K. Genome structure of introgressive lines *Triticum aestivum/Aegilops sharonensis* // Cytology and Genetics. – 2009. – 43. – N 6. – C. 58–67.

SHTEFYUK T.V., ANTONYUK M.Z.

*National University of Kyiv-Mohyla Akademy, MONMS Ukraine,
Ukraine, 04070, Kyiv, G. Skovorody str., 2, e-mail: m_antonyuk@yahoo.com*

THE SSR ANALYSIS OF 6D AND 7D CHROMOSOMES OF INTROGRESSIVE WHEAT LINES RESISTANT TO POWDERY MILDEW

Aims. Evaluation of polymorphism of wheat lines with introgressions from *Aegilops* species for microsatellite loci specific to 6D and 7D chromosomes. **Methods.** PCR of genome DNA with primer of specific SSR-loci. **Results.** The allelic polymorphism for SSR-loci of introgressive lines exceeds the limits, which determines by genotypes of parental genotypes. New alleles that are uncharacteristic to parental genotypes were reveal. Investigated loci have limited specificity to D genome. **Conclusions.** Polymorphism of SSR loci limits the potential of their use for investigation of introgressive lines genome structure. Microsatellites can be used for screening segregating populations taking into consideration the possibility of new allele appearance.

Key words: microsatellite analysis, SSR alleles, introgressive wheat lines, powdery mildew.