

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА
ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»**

Антонюк Максим Зиновійович



УДК 631.523.581

**ІНТРОГРЕСІЯ ЯК ІНДУКТОР МІНЛИВОСТІ ГЕНОМУ ПШЕНИЦІ
Triticum aestivum L.**

03.00.15 – генетика

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеню
доктора біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано на кафедрі біології Національного університету «Києво-Могилянська академія» МОН України, м. Київ

Науковий консультант:

доктор біологічних наук, професор
Терновська Тамара Костянтинівна,
Національний університет «Києво-
Могилянська академія», МОН України,
завідувач кафедри біології.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор,
академік НААН України
Стельмах Адольф Фомич,
Селекційно-генетичний інститут –
Національний центр насіннезнавства і
сортовивчення НААН України, головний
науковий співробітник відділу загальної та
молекулярної генетики;

доктор біологічних наук професор,
член-кореспондент НАН України
Кунах Віктор Анатолійович, Інститут
молекулярної біології і генетики НАН
України, завідувач відділом генетики
клітинних популяцій;

доктор біологічних наук, доцент
Козерецька Ірина Анатоліївна, ДУ
«Національний антарктичний науковий
центр» МОН України, заступник директора
з наукової роботи.

Захист відбудеться 29 травня 2019 р. об 11⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.254.01 при ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м.Київ, вул. Осиповського, 2а. Тел/факс: (044) 434 37 77, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

Автореферат розіслано 26 квітня 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук, доцент



Н.Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Інтрогресія – це внесення чужинного генетичного матеріалу у геном реципієнтного організму. Обсяг інтрогресії може бути будь-яким – від цілого геному, і тоді мова йде про створення штучного амфідиплоїда. До окремого гена з утворенням організму, який на сучасній мові називається трансгенним. Людство почало займатися інтрогресією давно, ще до народження генетики, це були 70-ті роки 19 сторіччя. Мета, яку прагнули при цьому досягти, завжди була одна: передати рослинам, що культивуються, певні ознаки інших рослин, які виглядають привабливими в очах людей, що професійно займаються селекцією. Інтенсифікація робіт щодо інтрогресій у геном пшениці почалася після того, як у 1956 році Сірсу вдалось успішно перенести до геному пшениці м'якої ген стійкості до бурої іржі *Lr9* від егілопсу зонтичного (Sears, 1956). У наступні 60 років можна було спостерігати як хвиля робіт з інтрогресивної гібридизації зростала (Sears, 1981, Lukaszewski, Gustafson, 1983, Sharma, 1983), досягла свого піку десь у 80-тих роках (Endo, Gill, 1996, Jiang et al., 1994), помітно впала наприкінці сторіччя і знов пішла вгору в останні 15 років (Ceoloni, Jauhar, 2006, Ogbonnaya et al., 2013, Molnár-Láng et al., 2014, Chaudhary et al., 2014, Lukaszewski, 2015, Ceoloni et al., 2015, Crespo-Herrera et al., 2017, Rasheed et al., 2017). Цьому є пояснення.

Всі ознаки, за якими селекціонери хотіли б покращити свої сорти, можна звести до трьох груп: стійкість до біотичних стресів, стійкість до абіотичних стресів, якість продукції. З початком робіт з інтрогресії була серйозна надія, що це вдасться здійснити. За п'ятдесят років після інтенсивного початку робіт з метою суттєво збагатити генофонд пшениці за рахунок генів дикорослих споріднених видів з бажаними ознаками стало очевидним, що очікуваного успіху вдалося досягти тільки для першої групи ознак. Причому йдеться майже виключно про передачу поодиноких генів вертикальної стійкості до різних захворювань, коли стійкість визначається взаємодією «ген-на-ген» (Cox, 1998, Cai et al., 2005, Niu et al., 2011, McIntosh et al., 2014). Що стосується підвищення стійкості до абіотичних стресів (Gill et al., 2006, Mujeeb-Kazi et al., 2008, Rasheed et al., 2017) та покращення якості продукції (Qi et al., 2007, Xu et al., 2005) успіхи інтрогресивної гібридизації більш помірні. Ми не беремо до уваги ті окремі випадки, коли за допомогою методів генної інженерії в геном рослини включались певні гени з інших біологічних таксонів та їхня експресія виявлялася ефективною для покращення певних ознак рослини (Li et al., 2006, Rasheed et al., 2017). Ми залишаємося виключно в межах статевої інтрогресивної гібридизації, яка, на наш погляд, має деякі переваги перед методами генної інженерії, тому що при цьому залишаються задіяними природні механізми добору життєздатних структур, починаючи з гамет.

Природним було вважати, що головна причина того, що надзвичайно важко створити генотип, що має чужинні гени і не поступається високопродуктивним та якісним сортам пшениці, – це наявність генетичного тягаря, яким є великий обсяг привнесеного чужинного хроматину, чи то хромосома чи її плече. У світовій цитогенетиці пшениці ретельно

відпрацьовано всі етапи зменшення обсягу інтрогресивного матеріалу для досягнення бажаної мети – передачі одного гена, який покликаний покращити ознаку (Ceoloni et al., 2015, Lucaszewski, 2015). І накопичено переконливий досвід, який свідчить, що відчутного успіху, який би полягав у появі певної технології з етапами, які раз за разом відтворюються, ми не досягли. Мається на увазі технологія, яка б гарантувала не лише передачу чужинних генів, а і таку їхню експресію у резидентному геномі, яка б забезпечила розвиток ознаки у бажаному вигляді. Як і раніше, головним пунктом роботи з інтрогресивним матеріалом є фенотипний добір за ознакою інтересу та ретельна селекційна проробка гібридних нащадків після того, як інтрогресивна лінія залучається до схрещування з комерційними генотипами пшениці. І нема жодних гарантій досягнення успіху.

З іншого боку, поки займалися інтрогресивною гібридизацією та вивченням геномів, що мають гібридне походження, було з'ясовано, що сам факт інтрогресивної гібридизації є чинником, що призводить до підвищення мінливості геному і може, отже, розглядатися як чинник мутацій, тобто змін у послідовності нуклеотидів. А на сучасному рівні наших генетичних знань – і до епігенетичних змін, які зі змінами нуклеотидних послідовностей не пов'язані, проте тим не менш спадкуються (Liu et al., 1999, 2015, Comai, 2003, Bento et al., 2010, Parisod, Senerchia, 2012, Fu et al., 2013, Jiang et al., 2014, Wang et al., 2016). Питання про можливу мутагенну природу інтрогресивної гібридизації є надзвичайно цікавим, актуальним та безумовно потребує розробки на експериментальному рівні.

Можливість до експериментальної розробки цього питання надала наявність певного розмаїття інтрогресивних ліній м'якої пшениці, створених, як 42-хромосомні лінії у 80-ті роки і ідентифікованих щодо обсягу наявного в них інтрогресивного матеріалу у 90-тих роках. Багаторічне спостереження за цими лініями показало, що поряд з такими, що стабільно з генерації до генерації демонструють одні і ті самі характеристики, є лінії, які перманентно змінюються за однією чи кількома ознаками. Перевірка таких ліній на цитологічну стабільність показала, що вони так і залишились 42-хромосомними. Перезапилення з іншими генотипами пшениці не відбувалось. Було висловлено припущення, що генетична нестабільність таких ліній пов'язана з процесами, які відбуваються в їхньому геномі та були запущені свого часу інтрогресивною природою штучно створених геномів. Дослідження побудовано з використанням ознак біохімічних (гени запасних білків та ферментів), морфологічних (остистість, колір зрілої колоскової луски, форма колосу, жорсткість колоскової луски, вдавненість у основі луски, опушення луски) та компонентів спектрів ПЛР, з праймерами до транспозонів та мікросателітних локусів, специфічних до певних гомеологічних груп хромосом чи специфічних хромосом. Генетичний аналіз інтрогресивних ліній за вказаними ознаками дав змогу зробити певні висновки щодо молекулярно-генетичних процесів, що відбуваються у інтрогресивних генотипах і можуть слугувати для підвищення генетичної мінливості не тільки через рекомбіногенез із залученням чужинного хроматину, а й через мутаційні та

епімутаційні події у резидентному геномі, що запускаються гібридним станом геному інтрогресивного організму і можуть виявлятися як фенотипна мінливість інтрогресивних ліній пшениці.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках фундаментальних наукових проектів кафедри біології НаУКМА «Локалізація чужинних генів стійкості до грибних захворювань пшениці у гексаплоїдній пшениці *Triticum aestivum* L., перенесених до її геному від низки видів *Aegilops* та *Triticum*», № держреєстрації 0108U004087, «Формування геному поліплоїдних злаків за умов штучної інтрогресії чужинного хроматину та у природних умовах», № держреєстрації 0110U001272, «Інтрогресивні процеси у геномі м'якої пшениці та їх застосування для генетичного аналізу *Triticinae*», № держреєстрації 0110U001273, «Індукція рекомбіногенезу для перенесення чужинних генів у геном м'якої пшениці», № держреєстрації 0110U001274, «Підвищення екологічної пластичності м'якої пшениці через індукцію рекомбіногенезу за участю інтрогресивного хроматину», № держреєстрації 0112U003159, «Генетична природа динамічності геномів інтрогресивних ліній м'якої пшениці», № держреєстрації 0116U006010 «Розширення генетичного пулу м'якої пшениці за рахунок генофондів дикорослих рослин», № «держреєстрації 0116U004705.

Мета та завдання. На моделі «пшениця м'яка – розмаїття інтрогресивних ліній» надати експериментальні докази припущенню, що інтрогресивна гібридизація є пусковим механізмом активації мінливості реципієнтного геному.

Для досягнення мети були виконані наступні завдання:

1. Вивчити перманентну фенотипну мінливість, яка спостерігається у генераціях штучно створених пшеничних гексаплоїдів з різними геномними формулами.
2. Оцінити наявне розмаїття інтрогресивних ліній – похідних геномно-заміщених амфідиплоїдів Аврозис, Авродес, Авролата, на стабільність прояву ознак фенотипу на рівні морфології рослин, електрофоретичних спектрів білків та спектрів ампліконів, отриманих методом ПЛР з праймерами різних типів.
3. Перевірити цитологічну стабільність інтрогресивних ліній, задіяних у дослідженні.
4. Встановити геномну структуру досліджуваних інтрогресивних ліній щодо наявності та гомеологічної належності інтрогресій стосовно геному Аврори та одна відносно одної.
5. Ідентифікувати гомеологічну належність інтрогресій, з якими пов'язаний фенотип, не властивий Аврорі, за ознаками опушення краю листкової піхви, остистість колосу, стійкість до борошнистої роси.
6. Виконати генетичний аналіз інтрогресивних ліній за ознаками остистість колосу, забарвлення зрілої луски, опушення краю листкової піхви, стійкість до борошнистої роси, спектр ізозимів бета-амілази.

7. Ідентифікувати гени чужинного походження, що контролюють обрані для дослідження ознаки.
8. Використовуючи гібриди від схрещування інтрогресивних ліній з лініями, що мають гаметоцидну хромосому $4S^{sh}$, встановити закономірності впливу цієї хромосоми на результати генетичного аналізу.
9. Ідентифікувати внутрішньохромосомні перебудови пшеничних хромосом, з якими пов'язана поява градацій ознак, не характерних для реципієнтного генотипу.
10. Встановити природу мінливості генів, що кодують гліадини та бета-амілазу інтрогресивних ліній, що кодують гліадини та бета-амілазу.

Об'єкт дослідження – мінливість генотипів гібридного походження у пшениці м'якої, амфідиплоїдів та інтрогресивних ліній пшениці.

Предмет дослідження – механізми мінливості, що відбувається у геномах рослин гібридного походження.

Методи дослідження. Метод штучної гібридизації рослин, цитологічні методи (визначення кількості хромосом в первинних корінцях пшениці, вивчення кон'югації хромосом у М1 мейозу МКП), біохімічні методи (виділення запасних білків та ферментів, їхній електрофорез у ПААГ), методи роботи з ДНК (виділення, ПЛР, електрофорез у агарозному гелі та ПААГ), біоінформатичні (пошук в базах послідовностей, вирівнювання послідовностей, порівняння послідовностей), оцінка рослин за ознаками морфології, методи статистичної обробки даних.

Наукова новизна. 1. На пшенично-егілопських чужинно-заміщених та чужинно-доданих амфідиплоїдах та групі інтрогресивних ліній, що від них походять, уперше показано, що їм властива перманентна, односпрямована та незворотна міжгенераційна мінливість. Перманентність полягає в тому, що зміна однієї градації ознаки на іншу не припиняється геть до зникнення вихідного морфотипу. Односпрямованість полягає в тому, що градація ознаки, властива егілопсу (амфідиплоїду), змінюється градацією, притаманною сортам пшениці. В зворотному напрямку мінливість не спостерігається. Перманентність та односпрямованість змін вказують на цільову, не випадкову та безваріантну дію молекулярних механізмів, що зміни викликають.

2. Структура геному інтрогресивних ліній відрізняється від такої реципієнтного геному Аврори не лише включенням різного обсягу чужинного хроматину. Зміни (мутації у самому широкому сенсі) торкаються власного пшеничного генетичного матеріалу і це вперше доведено на генах гліадинового кластера, гені бета-амілази, гені *B1* – інгібіторі остистості пшениці м'якої.

3. Вперше встановлено, що зникнення компонентів спектру, властивих компонентам ініціального схрещування при отриманні інтрогресивних ліній, та поява нових, не притаманних жодному з них, є невід'ємною рисою мінливості електрофоретичних спектрів всіх вивчених білків та спектрів ампліконів, отриманих з SSR-праймерами.

4. Показано вперше, що певні, односпрямовані мутації у пшеничному геномі ліній інтрогресивного походження викликаються мобілізацією

транспозонів *Sukkula* (гліадинові гени), MITE (ген бета-амілази) та експансією тринуклеотидних повторів CAA і CAG, кодонів глутаміну у гліадинових генах. Пшеничний ген *B1* втрачає функціональність через певні перебудови у відповідній ділянці плеча 5AL, які реєструються мікросателітним аналізом і відбуваються в інтрогресивних лініях – похідних Авродесу та Авролати.

5. Ідентифіковано кілька нових генів *Triticinae*: ген опушення краю листової піхви *Hs-S^{sh}* на хромосомі 4S^{sh}, гени – промотори остистості *Awn1* на хромосомах 1U та 1S^{sh}, ген чорного забарвлення зрілої луски *Bg2* на хромосомі 5U.

Практичне значення результатів дослідження полягає в наступному:

1. Будь-яка аналітична робота з лініями інтрогресивного походження вимагає їхнього ретельного вивчення щодо структури геному у термінах наявності та гомеологічної належності чужинного хроматину. *A priori*, без релевантних доказів, не можна вважати, що лінія інтрогресивного походження має у складі свого геному чужинний хроматин тільки тому, що за ознаками фенотипу вона відрізняється від реципієнтного компонента схрещування.

2. Для збільшення мінливості пшеничного геному не має значення, чи визначається це збільшення привнесенням чужинного хроматину, чи власний пшеничний генетичний матеріал зазнав мутацій через геномний стрес внаслідок перебування у гібридному стані. Інтрогресивна гібридизація сама по собі є мутагенним чинником і у такій якості сприяє розширенню (епі)генетичної мінливості, яка може виходити за межі, які визначались вихідним геномом до того, як він зазнав гібридного стресу.

3. Моделі успадкування, які будуються для пояснення трансмісії та функціонування генів, які у складі геномів інтрогресивних ліній контролюють градації ознак, властивих не пшениці, а виду – джерелу інтрогресії, мають будуватися з урахуванням таких характеристик ліній: фертильність, фенотипна та цитологічна стабільність, кількість, обсяг та гомеологічна належність інтрогресій, якщо вони визначаються. Надійність моделі значно підсилюється, якщо схрещування виконуються за циклічною схемою, до роботи залучаються індивідуальні рослини та нащадки індивідуальних рослин, ведеться ретельний облік виживаності рослин протягом онтогенезу та їхньої фертильності.

4. Лінії інтрогресивного походження і ознаки, якими вони відрізняються від реципієнтного сорту пшениці, являють собою надзвичайно привабливу модель для вивчення механізмів генетичної та епігенетичної мінливості та її місця у формуванні градацій ознак, якими пшениці, що культивуються, відрізняються від дикорослих родичів.

Особистий внесок. Сплановано та виконано експериментальну частину роботи. Підготовлено текст дисертації. Обговорення результатів під час підготовки публікацій виконувалось разом з науковим консультантом Терновською Т.К.

Апробація результатів досліджень. Результати роботи доповідались усно або були представлені як стендові доповіді на Міжнародній конференції «Наукові основи стабілізації виробництва продукції рослинництва» 5–8 липня 1999. Харків, 1999, Mendel Centenary Congress, March 7–10, 2000, Brno, Czech

Republic, 11-й Конференции Европейского общества по анеуплоидии пшеницы, 24–28 июля, 2000, Новосибирск, Россия, International Symposium «Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources», Yalta 26–31 May 2002, Conference for Young Scientists, PhD Students and Students on Molecular Biology and Genetics, September 25–27, 2003, Kiev, Ukraine, Proceedings of the Tenth International Wheat Genetic Symposium, Paestum, Italy, September, 1–6 2003, International Triticeae Mapping Initiative - COST Action Tritigen Joint Workshop 2009 - Clermont-Ferrand, FRANCE August 31th – September 4th 2009, V Международной научной конференции «Факторы экспериментальной эволюции организмов», 21–25 сентября 2009 г., г. Алушта, VI Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», Львів, 21–24 вересня, 2010 р., International Durum Wheat Symposium «From Seed to Pasta», Bologna, Italy, 2010, VI Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», 20–24 вересня 2010 р., м. Алушта, 2nd International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources. Bologna, Italy, 24–27 April 2010, The 9th Plant Genomics European Meeting, May 4–7, 2011 Istanbul, Turkey, VII Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», 19–23 вересня 2011 р., м. Алушта, Першій конференції молодих вчених «Біологія рослин та біотехнологія», 5–7 жовтня 2011, Біла Церква, Україна, The 4th International IMBIG Conference for Young Scientists «Molecular Biology: Advances and Perspectives», Kyiv, 2011, IX з'їзді Товариства генетиків та селекціонерів, 24–28 вересня 2012 р., м. Алушта, International Scientific Conference «Breeding and Genetics of Agro-cultural Crops: Traditions and Prospects». October 17-19th, 2012, Odesa, Ukraine, 13th International Cereal Rust and Powdery Mildews Conference, Beijing, China, 28 Aug. – 1 Sep., 2012, VIII Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», 23–27 вересня 2013 р., м. Алушта, IX Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», 22–26 вересня 2014 р., м. Умань, X Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», 14–18 вересня 2015 р., м. Чернівці, XI Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», 12–16 вересня 2016 р., м. Одеса, 13th International Wheat Genetics Symposium, April 23-28, 2017, Tulln, Austria, XII Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», 2–6 жовтня 2017 р., м. Умань.

Публікації. Результати оприлюднено у 67 наукових працях, в тому числі: 12 статей у міжнародних журналах, що входять до наукометричних баз даних, 14 у виданнях з переліку фахових для спеціальності «генетика», 28 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Основний зміст дисертації представлений вступом, оглядом літератури, експериментальною частиною, до якої входить розділ «Матеріали та методи» та чотири розділи з експериментальними результатами, обговорення результатів дослідження, рекомендації до практичного застосування результатів дослідження, висновки. В дисертації у наявності анотації українською та англійською мовою, список

оприлюднених за темою дисертації робіт, список використаних джерел. Кількість джерел – 943, з них 40 українською, 33 російською мовою, 1 німецькою, решта англійською. Є 2 додатки. Основний обсяг дисертації 412 стор., загальний обсяг 547 стор.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

У огляді наведено сучасну інформацію про генетичні та епігенетичні зміни, що зареєстровані у геномах гібридного походження, та їхні наслідки на фенотипному рівні. Розглядається феномен геномного шоку, що викликається об'єднанням геномів, та механізми його подолання, такі як реорганізація геному, яка може носити запрограмований характер. Надаються загальні відомості про механізми генетичних та епігенетичних змін у геномах гібридного походження з наведенням прикладів для пшениці, її віддалених гібридів та амфідиплоїдів: генетична рекомбінація та мутагенез, метилування ДНК та модифікація гістонів, участь некодуючих РНК та транспозонів. Виконано аналітичний огляд напрямків та результатів інтрогресивної гібридизації за участю видів *Triticeae*, які використовуються як джерело інтрогресій для розширення генетичного пулу пшениці м'якої. Наведено характеристику та розмаїття існуючих інтрогресивних ліній пшениці м'якої, включаючи чужинно-додані, чужинно-заміщені лінії, синтетичні гексаплоїдні пшениці (амфідиплоїди) як проміжні форми, лінії з транслокаціями. Рекомбінантні лінії розглядаються як найбільш сучасна форма інтрогресивних генотипів, можливість створення яких однозначно пов'язана з наявністю сучасних цитологічних та молекулярно-генетичних методів вивчення структури геному ліній гібридного походження. Окремо аналізуються дослідження, результати яких можна розглядати як доказ індуктивної ролі інтрогресій у резидентному геномі щодо збудження в ньому (епі)генетичної мінливості.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Досліджуваний матеріал. Сорти озимої пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.): Аврора селекції Краснодарського НДІСГ (м. Краснодар, Росія), Одеська 267, Тіра, Ніконія, Селянка, селекції Селекційно-генетичного інституту НААН (м. Одеса, Україна). Сорти пшениці твердої (*T. durum* Desf.) Леукурум та Чорномор; 28-хромосомні лінії, що вважаються пшеницею твердою, Mutiko italicum 59h1432 (Краснодар, НДІСГ), Кандиканс, Рубрум (Інститут рослинництва НААН, Харків). Нулі-тетрасомні лінії сорту Чайніз Спрін: нулі-4D-тетра-4А та нулі-4D-тетра-4В. Зразки *Triticum boeoticum*, *Aegilops longissima*, *Ae. umbellulata*, *Ae. sharonensis*, *Ae. comosa*. Геномно-заміщені амфідиплоїди Авродес (AABBSS), у складі геному якого об'єднані тетраплоїдний компонент AABB сорту м'якої пшениці Аврора та геном SS диплоїдного виду *Ae. speltoides*, Авролата (AABB UU), геном UU від *Ae. umbellulata*, Аврозис (AABBS^{sh}S^{sh}), геном S^{sh}S^{sh} від *Ae. sharonensis*. Штучний

амфідиплоїд Міоза ($2n=6x=42$, AABVM^tM^t), який має геноми А та В від озимої твердої пшениці *T. durum* Mutiko italicum і геном М^t від *Ae. comosa*.

Методи дослідження.

Метод гібридизації полягав у ручній емаскуляції пінцетом квіток материнського компонента схрещування та нанесення на його дозрілу маточку пилку з пиляка батьківського компонента схрещування. Для ізолювання колосся використовували пергаментні ізолятори. Рослини вирощували в польових умовах та у світловій кімнаті.

Кількість хромосом у рослинах визначали на стадії паростка на чавлених препаратах, виготовлених з первинних корінців розміром 1–1,5 см за загальноприйнятою для пшениці методикою Waninge (1965). Мейоз вивчали на материнських клітинах пилку за стандартною методикою фіксації матеріалу та виготовлення чавлених препаратів, забарвлених 2 % карміном (Паушева, 1988).

Виділення білків, їхнє електрофоретичне розділення у ПААГ та візуалізацію компонентів спектрів виконували згідно загальноприйнятих для конкретних білкових систем методик з власними модифікаціями (Антонюк 1996).

ДНК виділяли з листків, паростків або окремих зернівок з використанням ЦТАБ буферу. Умови ПЛР залежали від типу використовуваної ДНК-полімерази, типу молекулярного маркера; для оптимізації ПЛР з новоствореними праймерами використовували tdПЛР (Korbie, Mattick, 2008). Послідовності праймерів розробляли з використанням програм Primer 3, PrimerBLAST на основі TSA (Transcriptome Shotgun Assembly) із бази даних NCBI. Продукти ампліфікації розділяли в 1,5 та 2% агарозі, або у 6-8 % ПААГ з додаванням 7 М сечовини як детергента. Порівняння сиквенсів проводилося з використанням програмного забезпечення Sequence Alignment Programs.

Для статистичної обробки даних використано метод χ^2 та точний критерій Фішера для маленьких вибірок, метод t-критерію Ст'юдента, для порівняння часток – z-критерій, непараметричний дисперсійний аналіз Кроскала-Уолліса, непараметричний коефіцієнт кореляції Спірмена. За необхідністю при роботі з частками робили ϕ -перетворення. Ефект множинних порівнянь (за наявності) враховували внесенням поправки Бонферроні.

В роботі було використано хімічні реактиви компаній “Sigma” (США), “Amersham Pharmacia Biotech” (Швеція/Великобританія), “Fermentas”/”Thermo Fisher Scientific” (Литва-США), Solis Biodine (Естонія), Amresco (США), вітчизняні та китайські реактиви кваліфікації “хч” і “осч”.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ ЦИТОЛОГІЧНА СТАБІЛЬНІСТЬ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ

Мінливість ліній за кількістю хромосом. Серед паростків інтрогресивних ліній є такі, що їхні хромосомні числа відхиляються від облігатних 42 хромосом на 1–2 хромосоми у бік як зменшення, так і збільшення кількості хромосом. Серед похідних Аврозису часто трапляються телоцентричні хромосоми або демінутивні хромосоми. Найбільш варіативними

за кількістю хромосом, виглядають лінії – похідні Аврозису, найбільш стабільними – лінії Авролати. Не було встановлено, що лінії, які характеризуються перманентною мінливістю за деякими морфологічними та біохімічними ознаками, відрізняються за цитологічними характеристиками від ліній, для яких таку мінливість не зафіксовано.

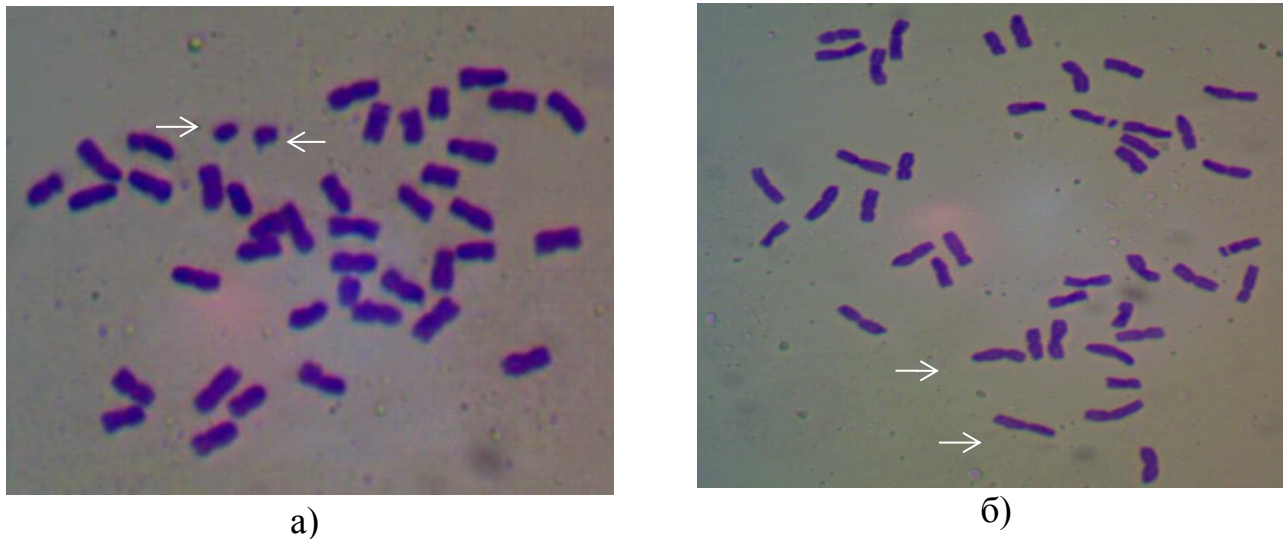


Рис. 1. Метафазні пластинки ліній – похідних Аврозису: а) 42 хромосоми, 2 пари дуже коротких; б) 42 хромосоми, 2 дицентрики. (об'єктив 40X)

Картина кон'югації хромосом у М1 МКП ліній. Не було виявлено якоїсь суттєвої різниці у картині М1 мейозу в лініях різного походження. Розмах варіювання показників М1 мейозу у материнських клітинах пилку (МКП) в інтрогресивних лініях різного походження однаковий. Всі вони у порівнянні з Авророю формували більшу кількість закритих бівалентів. Середня величина кросинговерного потенціалу (2μ) була 2,81, 2,78 та 2,69 для похідних Аврозису, Авродесу та Авролати, відповідно, а для Аврори 2,28. Це не суперечить даним про рецесивний характер десинаптичних генів, носієм яких є Аврора. Зміна геному інтрогресивних ліній у порівнянні з геномом Аврори, очевидно, компенсує вплив цих генів на кон'югацію хромосом. Приблизно половина ліній відрізнялась від Аврори збільшеною кількістю унівалентів. Мультиваленти в М1 мейозу інтрогресивних можуть формуватися в двох випадках. Або інтрогресія генетичного матеріалу торкнулася більш ніж однієї пшеничної хромосоми, або перебудови відбулися у межах лише пшеничних хромосом, так що ділянка однієї з пшеничних хромосом повторена ще в одній хромосомі. Вивчення М1 мейозу в МКП інтрогресивних ліній має значення в плані прогнозування цитологічної стабільності чи нестабільності.

СТРУКТУРА ГЕНОМУ ЛІНІЙ ВІДНОСНО РЕКУРЕНТНОГО ГЕНОМУ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ЩОДО ІНТРОГРЕСІЙ

Визначення геномної структури через вивчення хромосомних конфігурацій у М1 МКП гібридів. Надійним та доступним доказом наявності інтрогресії (хромосома, транслокація) у геномі досліджуваної лінії є вивчення

хромосомних конфігурацій при максимальній асоціації хромосом у М1 мейозу материнських клітин пилку гібридів F₁ від схрещування лінії з рекурентним генотипом, який став реципієнтом для прийняття інтрогресії. Всі лінії, що використовувались нами у дослідженнях різного напрямку, були перевірені щодо структури їхнього геному стосовно геному Аврори. У таблиці 1 наведено невеликий фрагмент з отриманих результатів. Наявність 21 закритого бівалента у М1 гібрида свідчить про відсутність таких розбіжностей між хромосомами Аврори та інтрогресивної лінії, які заважають кон'югації гомологів. Така лінія не має протяжних інтрогресій або пшенично-пшеничних транслокацій. Відкритий бівалент вказує на неповну гомологію хромосом, що кон'югують, і це може викликатися транслокацією, в тому числі за участю чужинного хроматину. Кількість облігатних унівалентів, поділена на два, вказує на кількість замінів пшеничної хромосоми на чужинну.

Таблиця 1

Найвища асоціація хромосом у М1 МКП гібридів F₁ від схрещування інтрогресивних ліній з рекурентним генотипом Аврора

Лінія ges, яку схрестили з Авророю	Кількість МКП	Модальна конфігурація асоціації хромосом у М1 ¹⁾	Лінія ges, яку схрестили з Авророю	Кількість МКП	Модальна конфігурація асоціації хромосом у М1
12	63	21 ^{Пз}	196	72	19 ^{Пз} + 2 ^{Пв}
17	54	21 ^{Пз}	221	68	19 ^{Пз} + 1 ^{Пв} + 2 ¹
115	95	19 ^{Пз} + 4 ¹	135	47	19 ^{Пз} + 4 ¹
117	78	19 ^{Пз} + 1 ^{Пв} + 4 ¹	136	72	17 ^{Пз} + 2 ^{Пв} + 4 ¹
118	55	18 ^{Пз} + 1 ^{Пв} + 4 ¹	137	37	17 ^{Пз} + 2 ^{Пв} + 4 ¹
121	50	19 ^{Пз} + 1 ^{Пв} + 2 ¹	138	55	18 ^{Пз} + 1 ^{Пв} + 4 ¹
177	83	20 ^{Пз} + 1 ^{Пв}	207	56	18 ^{Пв} + 1 ^{Пв} + 4 ¹
206	36	19 ^{Пз} + 1 ^{По} + 2 ¹	7	52	18 ^{Пз} + 1 ^{Пв} + 4 ¹
211	46	21 ^{Пз}	226	63	19 ^{Пз} + 1 ^{Пв} + 2 ¹

Примітка: ¹⁾ – в табл. 1 та 2 ^{Пз} — закритий бівалент, ^{Пв} — відкритий бівалент, ¹ — унівалент.

Якщо до вивчення залучається група ліній, які характеризуються певною ознакою фенотипу, яка відрізняє їх від фенотипу сорту Аврора, лінії мають бути охарактеризовано за геномною структурою одна стосовно одної. Це виконується таким саме чином, як це описано для визначення геномної структури лінії стосовно геному Аврори (фрагмент даних у таблиці 2). Таке дослідження було виконано для великої групи ліній – похідних Аврозису, та декількох ліній – похідних Авролати та Авродесу, залучених до генетичного аналізу за ознаками опушення краю листової піхви, стійкість до борошністої

роси, остистість, електрофоретичний спектр бета-амілази. Отримані результати щодо подібності/розбіжності структури геному стосовно кількісної характеристики інтрогресій стають основою для розрахунку теоретично очікуваних співвідношень між обсягами фенотипних класів, яке виконується в рамках генетичного аналізу.

Таблиця 2

Хромосомні конфігурації при найвищій асоціації хромосом у М1 МКП гібридів F₁ від схрещування інтрогресивних ліній одна з одною

Схрещування ліній res	Кількість МКП	Конфігурація у М1 при максимальній асоціації хромосом	Схрещування ліній res	Кількість МКП	Конфігурація у М1 при максимальній асоціації хромосом
115x117	28	19 ^{IIc} + 2 ^{IIo}	148x137	31	17 ^{IIc} + 3 ^{IIo} + 2 ^I
115x139	37	18 ^{IIc} + 3 ^{IIo}	135x117	56	20 ^{IIc} + 1 ^{IIo}
115x148	41	18 ^{IIc} + 1 ^{IIo} + 4 ^I	135x128	42	18 ^{IIc} + 3 ^{IIo}
117x118	18	19 ^{IIc} + 2 ^{IIo}	135x139	43	19 ^{IIc} + 2 ^{IIo}
117x128	54	21 ^{IIc}	136 x 129	38	19 ^{IIc} + 2 ^{IIo}
117x134	24	20 ^{IIc} + 1 ^{IIo}	136 x 143	29	20 ^{IIc} + 2 ^I
177x221	39	19 ^{IIc} + 1 ^{IIo} + 2 ^I	136 x 134	13	18 ^{IIc} + 2 ^{IIo} + 2 ^{I(1)}
211x215	46	19 ^{IIc} + 1 ^{IIo} 2 ^I	7 x 207	68	16 ^{IIc} + 2 ^{IIo} + 6 ^I
196x143	73	17 ^{IIc} + 2 ^{IIo} + 4 ^I	189 x 221	19	17 ^{IIc} + 2 ^{IIo} + 4 ^I
211x206	18	19 ^{IIc} + 1 ^{IIo} + 2 ^I	226 x 237	54	18 ^{IIc} + 2 ^{IIo} + 2 ^I
142 x 206	38	16 ^{IIc} + 3 ^{IIo} + 4 ^I	189 x 221/1	26	21 ^{IIc}
142 x 207	44	16 ^{IIc} + 2 ^{IIo} + 6 ^I	53 x 19	63	18 ^{IIc} + 1 ^{IIo} + 4 ^I

Визначення гомеологічної належності чужинного хроматину за допомогою генів морфологічних ознак. Перше припущення про наявність у геномі лінії гібридного походження чужинного хроматину виникає при їхній оцінці за морфологічним фенотипом. Поява у морфотипі лінії градацій ознак морфології, не властивих фенотипу реципієнтного партнера за схрещуванням (Аврора) наводить на думку про наявність у геномі лінії інтрогресій. Наявне розмаїття ліній та амфідиплоїдів порівнювали з сортом Аврора за ознаками морфології колосу та вегетативної частини рослин: остистість, форма колосу, наявність/відсутність воскової осуги, колір зрілого колосу, опушення луски та краю піхви, форма луски, розподіл пігменту на лусці, експресивність вдавленості у основі луски, жорсткість (ригідність) луски, колір пиляків, а також за стійкістю до борошнистої роси і трьох видів іржі. Серед оцінених за вказаними ознаками 40 ліній – похідних Авродесу, 29 ліній – похідних Аврозису та 16 ліній – похідних Авролати знайшлась лише одна, яка за градаціями морфологічних ознак характеризувалась як сорт Аврора та відрізнялась від нього лише стійкістю до борошнистої роси. Всі інші лінії крім

своєї стійкості до одного з чотирьох згаданих захворювань пшениці мали у своїй морфологічній оцінці такі градації, що могли сприйматися як доказ їхньої інтрогресивної природи. Найбільш виразними з них були ості, темна, жорстка чи опушена луска, відсутність воскової осуги. Форму та щільність колосу, форму луски застосовувати важче, адже це не стільки якісні, скільки кількісні ознаки з ускладненою класифікацією на фенотипні класи. Фенотипна характеристика ліній разом з результатами вивчення хромосомних конфігурацій у М1 мейозу дає підстави для визначення гомеологічної належності чужинних хромосом та транслокацій, наявності яких у геномі ліній виявляється при цитологічному вивченні їхніх гібридів F₁ від схрещування з рекурентним генотипом Аврора.

На дослідженому матеріалі доведено, що ознаки морфології рослин пшениці, як і стійкість до певних захворювань, можуть ефективно використовуватися не лише для добору рослин з інтрогресіями, а і для встановлення гомеологічної належності чужинного хроматину. За нашими даними, гени, що контролюють ознаки морфології, маркують хромосоми 1, 2, 3, 4, 6 та 7-ої гомеологічних груп хромосом. Ген *Hs-S^{sh}*, що контролює опушення краю листової піхви у ліній – похідних Аврозису, ідентифікований нами уперше і локалізований у хромосомі 4S^{sh}, гаметоцидній. Ознака може використовуватися як морфологічний маркер гаметоцидної хромосоми при створенні інтрогресивних ліній для вибраковування рослин з цією хромосомою.

Використання біохімічних маркерів хромосом для встановлення гомеологічної належності хроматину. Раніше нами було встановлено, що біохімічного маркування чужинних інтрогресій в геномі пшениці Аврора можна досягти через використання електрофоретичних спектрів запасних білків (хромосоми 1-ої гомеологічної групи), бета-амілази (хромосоми 4-ої групи), зернової естерази (хромосоми 3-ої групи), листової естерази, листової пероксидази (хромосоми 7-ої групи). В даному дослідженні з використанням геномно-заміщеного амфідиплоїда Аврозис та нулі-тетрасоміків Чайніз Спрін до біохімічних маркерів було додано ген кислоти фосфатази, локалізований на хромосомах 4-ої гомеологічної групи *Triticinae*.

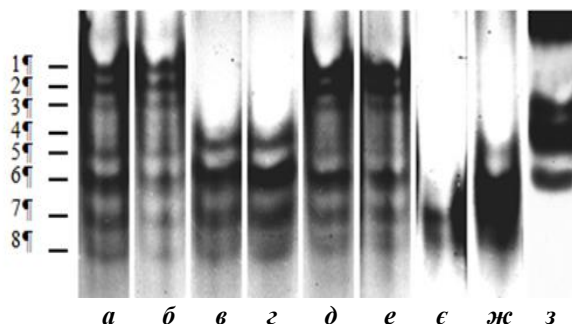


Рис.2. Електрофоретичні спектри зернової кислоти фосфатази: а – Аврора, б – Чайніз Спрін, в – нулі-4D-тетра-4А, г – нулі-4D-тетра-4В, д – нулі- 4А-тетра-4В, е – нулі-4В-тетра-4D, є – *T. boeoticum*, ж – *Ae. longissima*, з – Аврозис.

Відомо, що в геномах споріднених пшениці видів, зокрема, видів роду *Aegilops*, у наявності ортологічні (гомеологічні) гени, які кодують ізоферменти

та запасні білки. Тому, за умов поліморфізму ізоферментів пшениці м'якої та споріднених видів, такі гени можуть виступати маркерами наявності чужинного генетичного матеріалу в геномі пшениці. Ми використали маркерну компетентність низки ізоферментів та гліадинів пшениці для спроби встановити гомеологічну належність чужинного хроматину, наявність якого в геномі інтрогресивних ліній спричинює розвиток остей на колосі. Аврора, яка є донором субгеномів А та В у геномно-заміщених амфідиплоїдів, характеризується як безостий сорт. Її колос може нести слабкі остеподібні відростки на апікальній частині колосу. Види егілопсів *Ae. speltoides*, *Ae. umbellulata* та меншою мірою *Ae. sharonensis* мають чітко виражені ості вздовж всього колосу. Геномно-заміщені амфідиплоїди Авродес та Авролата напівостисті, Аврозис має виражені остеподібні відростки. Поява добре розвинених остей на колосі інтрогресивних ліній сприймається як доказ наявності в їхніх геномах чужинного хроматину з геном – промотором остей. Нами було вивчено велику вибірку інтрогресивних ліній різного походження та різних за остистістю за генами, що кодують запасні білки гліадини та ферменти (кисла фосфатаза, альфа- та бета-амілази, естерази, пероксидази) та були визнані нами як такі, що маркують хромосоми трьох видів егілопсу за гомеологічною належністю. Порівняння електрофоретичних спектрів вказаних білків, отриманих з ліній, які розрізняються за ступенем розвитку остей, дало наступні результати. Немає підстав вважати, що остистість колосу асоційована з геном β -амілази, локалізованим у хромосомах 4-ої гомеологічної групи, а також з геном *Gli-1* хромосом 1-ої групи. За даними вивчення пероксидази (*Per-3*) та естерази (*Est-1*) асоціації між чужинною хромосомою 3 та остистістю не прослідковується. Так само не виявлено зв'язку між хромосомою 7 (гени α -*Amy-2* та *Per-4* та остистістю. Для ліній – похідних Авролати компонент спектру, що маркує хромосому 6U (α -*AmyU1*) (рис. 3, компонент 13), спостерігали у спектрах шести остистих ($19 \pm 7,7\%$) та 21 ліній з остеподібними відростками ($47 \pm 7,4\%$). В спектрах безостих ліній такого компоненту не було. Серед ліній – похідних Авродесу була одна лінія серед остистих та дві лінії з остеподібними відростками, в спектрах яких не було компоненту, що маркує хромосому 6D Аврори (рис. 3, компонент 9). Не можна виключити, що в геномах цих ліній відбулося заміщення 6D/6S, проте і довести цього не вдається. Судячи з результатів, отриманих на лініях – похідних Авролати, здається, що ген – промотор остистості локалізований у хромосомі 6U. Можливо, що такою хромосомою для двох інших видів егілопсів є також хромосома 6-ої гомеологічної групи. При вивченні гліадинів за геном *Gli2* (6-та хромосома), маркерний компонент є лише для Авролати, і серед її похідних було знайдено одну лінію ($4 \pm 3,8\%$) з таким компонентом серед остистих ліній, і це була та сама лінія, для якої було показано заміщення α -*AmyD1*/ α -*AmyU1*. Серед безостих ліній жодна не мала у спектрі гліадинів маркерного компоненту. А серед ліній з остеподібними відростками ліній з таким компонентом було 15 ($33 \pm 7,0$), з котрих лише одна лінія не була у переліку тих 21 ліній, для яких показано заміщення α -*AmyD1*/ α -*AmyU1*. Отже, вивчення гліадинових спектрів ліній підтверджує наше припущення, що ген-промотор

остистості принаймні у *Ae. umbellulata* знаходиться у хромосомі 6-ої гомеологічної групи.

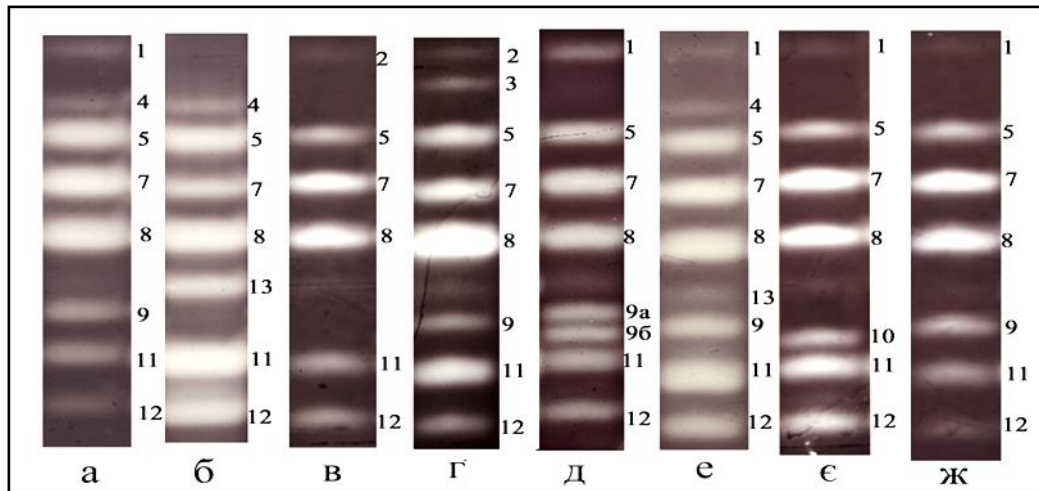


Рис. 3. Електрофоретичний спектр ізоферментів альфа-амілази сорту Аврора, геномно-заміщених амфідиплоїдів та інтрогресивних ліній м'якої пшениці: а – Аврора; б – Авролата; в – Авродес; г – Аврозис; д – лінія 50 (остеподібні відростки); е – лінія 34 (остеподібні відростки); є – лінія 76 (остиста); ж – лінія 104 (остеподібні відростки).

Біохімічні хромосома-специфічні маркери, які були визнані нами придатними для розрізнення спектрів Аврори та Авродесу, використали для скринування 88 ліній Авродесу, стійких до борошнистої роси, для ідентифікації чужинної хромосоми або її транслокації на пшеничну хромосому, що несе ген стійкості до борошнистої роси. Такими маркерними для порівняння Аврори та Авродесу генами виявились гени *Glu-1*, *Gli-1*, *Gli-2*, β -*Amy1*, α -*Amy-1*, α -*Amy-2*. Порівнюючи електрофоретичні спектри білків Аврори, Авродесу та цих ліній, планувалось з'ясувати два питання: яка чужинна хромосома чи її фрагмент з геном-маркером, є у геномі стійкої лінії та чи знаходиться чужинний хроматин у геномі замість гомеологічного чи негомеологічного хроматину пшениці. Порівняння вивчення спектрів вказаних білків показало, що в лініях – похідних Авродесу ген стійкості до борошнистої роси знаходиться у складі хромосоми 6S, яка або цілком замістила пшеничну хромосому 6D, або увійшла до складу транслокації за участю вказаних хромосом.

Спираючись на наведені результати, можна стверджувати, що біохімічні маркери залишаються ефективним інструментом скринування великих обсягів рослинного матеріалу інтрогресивного походження. Їх варто застосовувати для дослідження інтрогресивних ліній, відмічених наявністю такої градації певної ознаки, що не є властивою рекурентному фенотипу, в нашому випадку – остистість колосу та стійкість до борошнистої роси. За допомогою білкових хромосомно-специфічних маркерів швидко та ефективно встановлено, що промотор остистості у ліній – похідних Авролати, скоріше за все, локалізований у хромосомі 6U, а ген стійкості до борошнистої роси у ліній –

похідних Авродесу включений до геному ліній у різному обсязі хроматину хромосоми 6S, який замінив гомеологічний хроматин пшениці.

Використання мікросателітних маркерів хромосом для вивчення структури геному інтрогресивних ліній. Особливий інтерес до геномної структури ліній, стійких до борошнистої роси, викликали лінії – похідні Аврозису. До складу геному *Ae.sharonensis*, який є одним з субгеномів геномно-заміщеного амфідиплоїда Аврозис, входить хромосома $4S^{sh}$, гаметоцидна. Це хромосома, відсутність якої у складі гамет гетерозиготного гібрида робить їх нежиттєздатними, і її наявність у інтрогресивних лініях практично знищує потенціал їхнього подальшого застосування через наявність перманентного генетичного вантажу у вигляді цієї хромосоми. Саме тому стійкі до борошнистої роси лінії було обстежено на наявність гаметоцидної хромосоми $4S^{sh}$. Всі гени, що маркують хромосому $4S^{sh}$ (*Hs-S^{sh}*, *β -Amy-1*, *AcpH-1*), локалізовані на довгому її плечі. Для маркування короткого плеча виконали мікросателітний аналіз за локусами, специфічними для хромосоми 4D пшениці. Зіставляючи результати оцінки ДНК ліній за мікросателітними локусами та за морфологічними ознаками і спектрами білків, можна вважати, що лінія 115 не є хромосомно-заміщеною, а несе Робертсонівську транслокацію 4DS/4S^{sh}L. А лінії 132, 141, 146 та 148 замість інтактної хромосоми 4D несуть Робертсонівську транслокацію 4DL/4S^{sh}S. Лінії 121,122,126,130,142–145 не мають гаметоцидної хромосоми, а лінії 117,118,127–128,131,134,135,137–140 несуть цілу хромосому $4S^{sh}$.

Порівняння результатів оцінки стійких ліній за морфологічними, біохімічними та мікросателітними маркерами з даними щодо хромосомних конфігурацій у M1 мейозу МКП гібридів між лініями та лініями і Авророю показало, що за геномною структурою стійкі до борошнистої роси лінії можна розділити на шість груп (табл. 3). В геномах цих ліній змінені 1–4 хромосом пшениці. Транслокації могли виникнути або в межах лише пшеничного геному, або шляхом включення до пшеничних хромосом чужинних ділянок. Частіше за все чужинною хромосоною, що замістила пшеничну, була хромосома $2S^{sh}$, про гаметоцидну природу якої робилось припущення раніше (Endo, 1985). Гаметоцидну хромосому $4S^{sh}$ було знайдено у 13 лініях з 26.

Набір інтрогресивних ліній ges – похідних Аврозису, Авродесу та Авролати, стійких до борошнистої роси, було скринено за алелями мікросателітних локусів, локалізованих на хромосомах субгеному D пшениці кожної з семи гомеологічних груп з метою ідентифікації хромосом, що несуть гени стійкості. Кількість використаних локусів 3, 4, 11, 5, 8, 8 та 8 для хромосом пшениці 1D, 2D, 3D, 4D, 5D, 6D, 7D, відповідно.

Порівняльний мікросателітний аналіз ДНК інтрогресивних ліній показав поліморфізм електрофоретичних спектрів, який виходить за межі батьківських форм ініціальних гібридів. Спостерігалися спектри, частково ідентичні до спектру одного з батьків, проте із відсутнім одним або більше компонентами; окремі спектри із новими компонентами, відмінними від обох батьківських спектрів; нові гетерозиготні спектри, які включали компоненти, ідентичні одній із батьківських форм, та нові компоненти; нуль-алель або повна відсутність

компоненту у спектрі. Враховуючи, що жодна із досліджуваних ліній за своїм набором мікросателітних локусів за усіма досліджуваними хромосомами не відповідає ані Аврорі, ані амфідиплоїду, від якого пішла, можна зробити висновок, що у жодної з ліній не відбулося заміщення цілої хромосоми або окремих плечей хромосом на чужинні, а отже ті інтрогресії, що відбулися, мають вигляд транслокацій і хромосоми набувають мозаїчної структури щодо вмісту резидентного та чужинного хроматину.

Таблиця 3

Геномна структура інтрогресивних ліній, стійких до борошнистої роси

Одна хромосома не утворює бівалент з пшеничним гомологом					
Хромосома	Лінія	Додається одна транслокація		Додаються дві транслокації	
		Хромосома	лінія	хромосома	Лінія
7S ^{sh}	126	–	–	–	–
2S ^{sh}	–	не встановлено	121	3S ^{sh} , 7S ^{sh}	130
2S ^{sh}	–	не встановлено	122	4S ^{sh} , не встановлено	134
2S ^{sh}	–	не встановлено	132	–	142
2S ^{sh}	–	7S ^{sh}	144	–	–
2S ^{sh}	–	не встановлено	145,146	–	–
2S ^{sh}	–	не встановлено	148	–	–
не встановлено	–	–	–	3S ^{sh} , не встановлено	143
не встановлено	–	–	–	7S ^{sh} , не встановлено	142
Дві хромосоми не утворюють бівалент з пшеничним гомологом					
Хромосома	Лінія	Додається одна транслокація		Додаються дві транслокації	
		Хромосома	лінія	хромосома	Лінія
4S ^{sh} , не встановлено	115	не встановлено	138,140	–	–
2S ^{sh} , 4S ^{sh}	127 ^{1,2)} , 135	3S ^{sh}	117,118,128	3S ^{sh} , 7S ^{sh}	131, 136
2S ^{sh} , 4S ^{sh}	–	–	–	не встановлено	137 ^{1,2)}
2S ^{sh} , 4S ^{sh}	–	–	–	3S ^{sh} , не встановлено	139
3S ^{sh} , 4S ^{sh}	129	–	–	–	–
3S ^{sh} , 7S ^{sh}	141	–	–	–	–

Примітки: ¹⁾ Утворюють мультіваленти як три- так і квадрі.

²⁾ Збільшена кількість унівалентів на клітину.

На підставі отриманих результатів мікросателітного аналізу висунуто припущення щодо можливого зв'язку генів стійкості з хромосомами гомеологічних груп 3 та 6 у лінії – похідних Авродесу, 1, 2, 3, 6 — похідних Авролати та групи 2 у похідних Аврозису. Скринування стійких до борошністої роси ліній за мікросателітними локусами не дає можливості однозначно визначити хромосомну локалізацію гена стійкості через високий поліморфізм за мікросателітними локусами усередині геномів інтрогресивних ліній та неінформативність багатьох локусів.

Зіставлення результатів мікросателітного аналізу з морфологічною характеристикою вивчених ліній (воскова осуга для хромосом 1-ої та 2-ої гомеологічних груп, темне забарвлення зрілого колосу для хромосом 1-ої та 5-ої групи, жорстка луска та вдавленість основи луски для 2-ої групи, наявність остей для хромосом 6-ої групи), підтверджує зроблений висновок про мозаїчну будову хромосом у геномах досліджених ліній із залученням різних транслокацій (рекомбінацій) чужинних хромосом з різних гомеологічних груп, а також гомеологічну належність цих транслокацій, виявлену мікросателітним аналізом. У цілому, на нашу думку, мікросателітний аналіз не є надійним інструментом вивчення будови геному інтрогресивних похідних, перш за все через генетичну мінливість усередині геномів гібридного походження, яка знижує діагностичні компетентності алелів мікросателітних маркерів, властивих вихідним компонентам схрещування.

ГЕНЕТИЧНА НЕСТАБІЛЬНІСТЬ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ

Результати вивчення ліній за ознаками морфології колоса

У всіх випадках нестабільність у прояві морфологічної ознаки виявлялася в тому, що серед нащадків лінії поряд з рослинами, повністю схожими з батьківською за морфологічним фенотипом, з'являлися рослини, в яких чужинна градація певної ознаки замінювалась градацією ознаки, притаманної сорту Аврора, отже властивій пшениці м'якій. Змін у зворотному напрямку не спостерігали. Різні лінії виявляють нестабільність за різною кількістю ознак, від однієї до п'яти. Перманентна мінливість за ознаками морфології колоса у інтрогресивних ліній відбувається на тлі повної цитологічної стабільності. Частина вивчених ліній була стабільною щодо ознак морфології.

Мінливість інтрогресивних ліній за електрофоретичними спектрами деяких білків. При скринуванні інтрогресивних ліній за електрофоретичними спектрами білків, що маркують хромосоми пшениці 1, 3, 4, 5, 6 та 7 гомеологічних груп, було виявлено лінії, електрофоретичний спектр яких за певним білком відповідав такому або геномно-заміщеного амфідиплоїда або Аврори. Лінії, які не виявили повну подібність до одного з батьків, склали дві інші групи: 1) лінії, спектр яких відрізняється від спектру Аврори відсутністю певних компонентів, властивих останньому; 2) лінії, в спектрі яких було виявлено нові компоненти, не властиві спектрам жодному з прабатьківських генотипів.

Електрофоретичні спектри ізоферментів бета-амілази, естерази та пероксидази більшості досліджуваних ліній демонстрували ідентичність відповідному спектру сорту Аврора. Електрофоретичні спектри альфа-амілази відрізнялись від такого у Аврори для більшості ліній – похідних Авролати, остистих. Для запасних білків було виявлено змішані спектри, де частина компонентів спектру відповідає спектру Аврори, частина – Авродесу. Для генів запасних білків поява генотипів, що продукують новий, щодо батьківських, спектр (відсутність частини батьківських компонентів або поява нових) спостерігається частіше, ніж для генів альфа- та бета-амілази, естерази, пероксидази. У якості моделі, придатної для вивчення молекулярних основ мінливості на рівні електрофоретичного спектру, було обрано гліадинові гени *Gli*.

Вивчення мінливості гліадинових спектрів. Оскільки всі геномно-заміщені форми отримано шляхом об'єднання тетраплоїдного компоненту ААВВ геному Аврори з диплоїдним геномом одного з видів егілопсу, *Ae. speltoides*, *Ae. sharonensis* та *Ae. umbellulata*, електрофоретичні спектри Авродесу, Аролати та Аврозису мають складатися з компонентів, які контролюються генами хромосом 1А, 1В, 6А, 6В Аврори та хромосом 1-ї та 6-ї гомеологічних груп відповідного виду егілопса. За результатами наших попередніх досліджень, інтрогресивні лінії містять незначну кількість генетичного матеріалу геному егілопса, переважно на заміну хроматину субгенома D, що пояснюється їхнім походженням від ініціального схрещування ААВВDD x ААВВХХ, де Х – геном егілопса. Якщо у геномі інтрогресивної лінії залишилася хромосома 1-ої чи 6-ої гомеологічних груп чи її частина з генами *Gli* від егілопса, на електрофоретичному спектрі такої лінії з'являється блок компонентів чужинного походження, притаманний спектру відповідного егілопса (рис. 4). Нами встановлено, що електрофоретичні спектри запасних білків ліній, мінливих за морфологічними ознаками, не відповідають очікуваним характеристикам та відрізняються від результатів їхнього вивчення, виконаного 15 років тому. Окрім чужинних компонентів зрозумілого походження спостерігали появу нових компонентів, не властивих ні спектру Аврори, ані спектру егілопсу. Крім того, спостерігали втрату компонентів, властивих спектру Аврори без появи у спектрі нових компонентів.

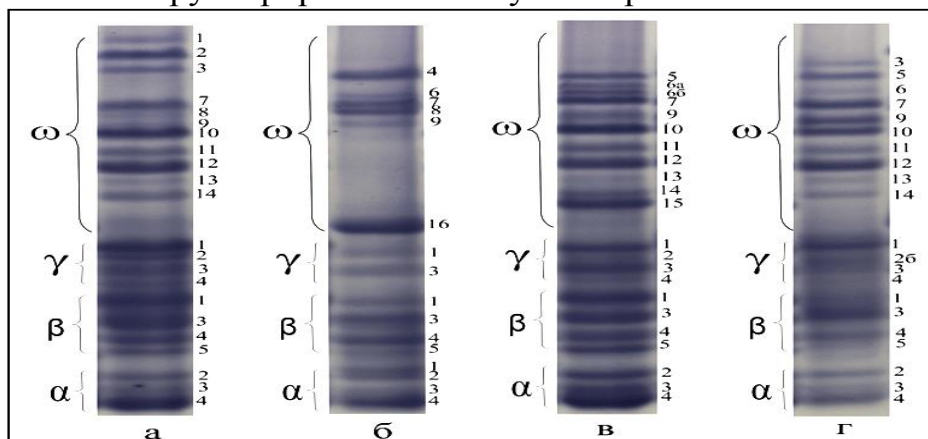


Рис. 4. Електрофоретичний спектр запасних білків гліадинів: а – сорт Аврора; б – Авролати; в - Авродес; г – Аврозис.

Для вивчення питання про можливі молекулярно-генетичні чинники змін, що спостерігаємо, обрали 19 ліній – похідних Авродесу, 12 ліній, похідних Аврозису та 18 ліній, похідних Авролати, які демонстрували вже описану нестабільність за ознаками морфології. Вивчали гліадинові спектри ліній, вирощених спеціально для цього в одному році, 2009, із насіння, отриманого у різні роки, 2002, 2007 та 2008. Це репрезентує різні генерації однієї і тієї самої лінії (табл. 4). Порівнюючи спектри інтрогресивних ліній, послідовно відповідали на такі питання: 1) чи характеризується лінія внутрішньогенераційною мінливістю (рис. 5); 2) чи характеризується лінія міжгенераційною мінливістю; 3) якщо мінливість не спостерігається, чи має лінія спектр, схожий на спектр Аврори; 4) якщо спектр лінії відрізняється від спектру Аврори, чи можна пояснити появу компонентів, не властивих спектру Аврори, походженням лінії від відповідного виду егілопса, чи у наявності нові компоненти незрозумілого походження.

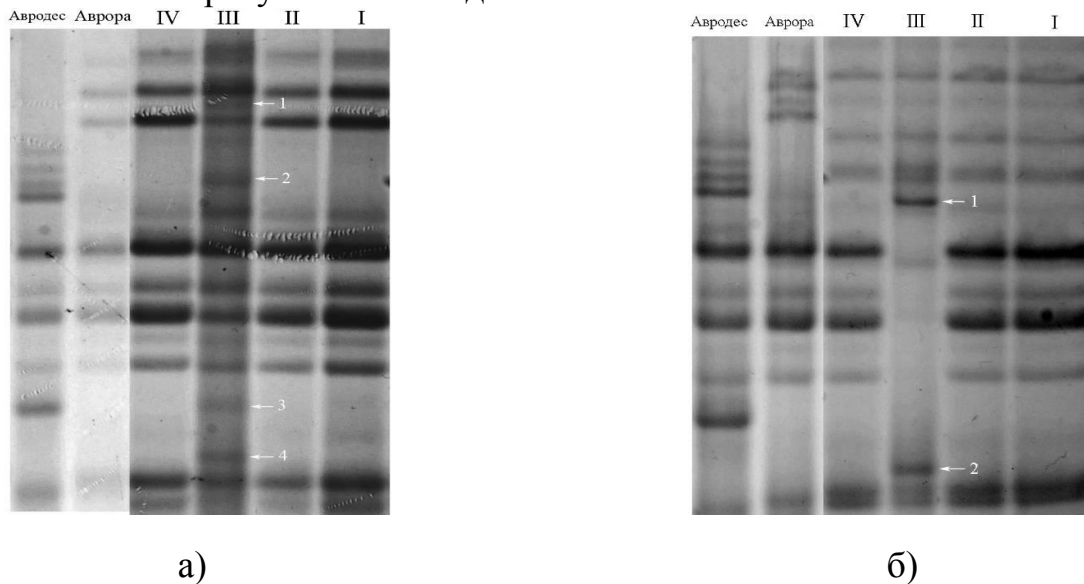


Рис. 5. Електрофоретичні спектри γ - та ω -зон гліадинів чотирьох зернівок (I–IV) лінії *res 2* (а) та лінії *res 13* (б). Стрілками вказано компоненти, за якими відрізняються спектри різних зернівок однієї і тієї ж самої генерації.

Зі 130 проаналізованих генерацій ліній таких, що повністю повторювали спектр Аврори, виявилось лише 8. 122 генерації мали у гліадиновому спектрі своїх зернівок компоненти, які відрізняються від компонентів спектру Аврори. Гексаплоїдні цитологічно сталі лінії було зареєстровано у 1990-91 роках, за гліадинами їх вивчали у 1993-94 роках. Вивчалася тільки одна генерація, вирощена у 1993 році, по чотири зернівки на лінію. Тоді не спостерігали жодного поліморфізму гліадинових компонентів усередині лінії. Якщо констатувалася поява компонентів спектру, не властивих реципієнтному генотипу (Аврорі), це був, як правило, блок компонентів ω -зони, властивий спектру геномно-заміщеної форми, або окремі компоненти у інших зонах, також властиві саме цій формі (рис. 4). На той період лінії можна було б характеризувати як новостворені, «молоді», які

ще не пройшли помітної кількості генерацій після свого виділення серед розмаїття рослин гібридного походження, кількість хромосом серед яких коливалась від 38 до 44. У період з 1990 по 2008 рік лінії пройшли як мінімум 15 генерацій у польових умовах під ізоляторами. За кілька років (генерацій) після завершення роботи з ідентифікації чужинного хроматину у інтрогресивних ліній стало очевидно, що частина з них характеризується перманентною мінливістю за деякими ознаками морфології. Крім того, скринуючи вибірки ліній, об'єднаних за певною ознакою (остистість колосу, стійкість до борошністої роси) за спектрами запасних білків, ми виявили, що внутрішньолінійна мінливість за цими спектрами є правилом при вивченні рослин, які ми вважали лініями через їхню цитологічну стабільність. Сукупність цих спостережень неминуче привела нас до висновку, що принаймні частина гексаплоїдних інтрогресивних ліній, цитологічно стабільних, є нестабільними генетично. А це означає, що в їхніх геномах інтрогресивного походження відбуваються якісь процеси, що є джерелом генетичної мінливості, хоча на цитологічному рівні вони не відбиваються. Гліадини, як надзвичайно поліморфна ознака, що контролюється генами відомої молекулярної структури, є ідеальною моделлю для кількісного вивчення хоча б тієї частини такої мінливості, яка відбувається з гліадиновими генами.

Таблиця 4

Стабільність інтрогресивних ліній за спектром гліадинів

Характеристика лінії	Лінії res, що походять від		
	Авродесу	Аврозису	Авролати
Лінія стабільна у всіх генераціях	15, 31, 34, 51, 67, 79	102, 113, 114, 121, 142, 143, 147, 148	177, 181, 189, 195-2, 202, 206, 207, 211, 218, 221, 222, 226, 237, 250
Лінія мінлива між генераціями	2, 7, 13, 16, 22, 33-1, 39, 45, 80	118, 122, 132, 139	164, 199, 217, 254
Лінія мінлива усередині окремих генерацій	12, 32-1, 53, 70		

Гліадини є спирторозчиненими мономерними білками. В залежності від своєї електрофоретичної рухливості у ПААГ компоненти гліадинового спектру прийнято відносити до однієї з чотирьох зон: α , β , γ та ω у порядку зменшення їхньої електрофоретичної рухливості (рис. 4). Кожен компонент гліадинового спектра, білок, кодується окремим геном. Таких генів у геномі багато і розташовані вони кластерами. Зони ω та γ (переважно) формуються компонентами, що кодуються генами локусу (кластера) *Gli-1*, хромосоми 1-ої групи. Компоненти зони β та α кодуються генами кластера *Gli-2*,

локалізованого у хромосомах 6-ої гомеологічної групи хромосом Сукупність електрофоретичних компонентів, що кодуються генами одного кластера, називається блоком. За отриманими результатами, найчастіше нові компоненти зустрічалися у ω -зоні, рідше у γ - та β -зонах. В α -зоні гліадинового спектру лише декілька генерацій демонстрували нові компоненти. Таке розділення по зонах можна частково пояснити розмірами та роздільною здатністю електрофоретичних спектрів цих зон, адже ω -зона містить близько половини компонентів усього спектру, а γ -, β - та α -зони займають решту.

До складу генів, що кодують гліадини, входить повторювальний мотив, консенсусна послідовність якого подібна у різних генів та містить велику кількість тринуклеотидів, що кодують глутамін, САА або САG, мікросателітні повтори. Довжина цього мотиву зумовлює різницю в молекулярній масі гліадинів, і саме наявність повторів може бути джерелом алельного поліморфізму: триплети САА та САG спричинюють утворення стоп-кодонів через транзицію С–Т, тринуклеотидні повтори схильні до ампліфікації. Проміжки між генами насичені ретротранспозонами. Інтрогресивна природа геному досліджуваних ліній може активувати транспозони до транскрипції та руху. Цей факт вже доведений на інших рослинних об'єктах. Ще більш суттєвим для генезису поліморфізму є утворення додаткових копій гліадинових генів усередині кластера за рахунок рекомбінації, що так властиво ділянкам хромосом з повторами (ретротранспозонами). Результатом є створення нових алелів гліадинових генів (компоненти спектру), яких не було у спектрах батьківських рослин.

Мікросателітний аналіз гліадинових генів із застосуванням дев'яти пар внутрішньогенних праймерів виконали на 19 інтрогресивних лініях, похідних Авродесу, представлених у 49-ти генераціях. Мали за мету перевірити, чи варіюють мікросателіти цих генів за довжиною серед різних рослин усередині досліджуваних ліній. Було виявлено поліморфізм у спектрі поліглутамінових мікросателітів. Зокрема, праймери wggm-P3-a1-L/R до гена α -гліадину номер AJ133604.1 та праймери wggm-N-o1-L/R до гена ω -гліадину номер DQ861428.1 продукували нові компоненти у спектрі ДНК окремих зернівок в певних генераціях деяких ліній (рис. 6 та 7). Розмір нових компонентів спектру була на 14–70 п.н. більше за масу очікуваних продуктів.

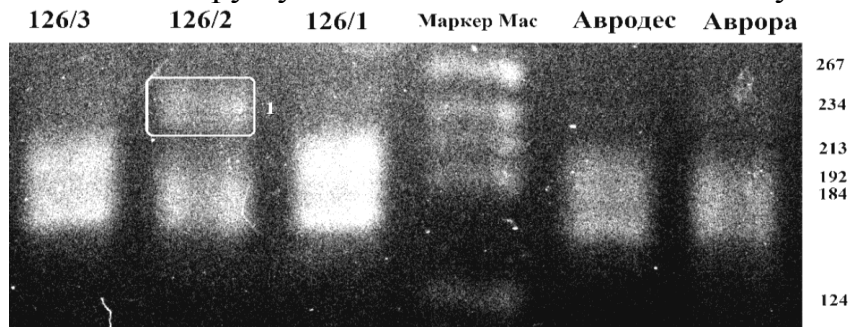


Рис. 6. Електрофоретичний спектр продуктів ампліфікації з праймерами wggm-P3-a1-L/R ДНК лінії 126. 1 –додатковий компонент; Маркер мас: M21: pBR 322+ BsuR1, (SibEnzyme) , агароза 2%

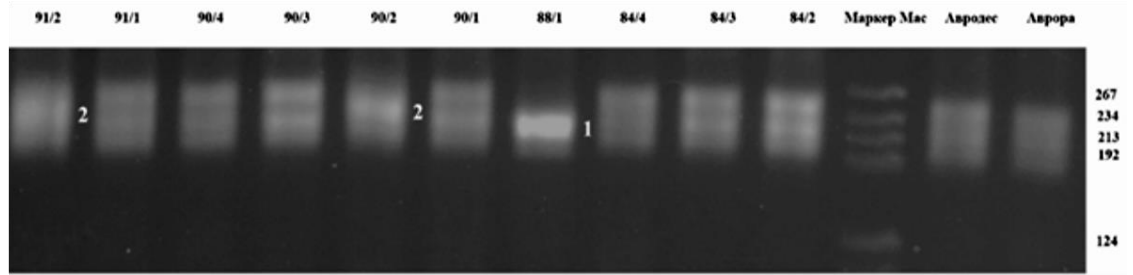


Рис. 7. Електрофоретичний спектр продуктів ампліфікації з парою праймерів wggm-N-o1-L/R ДНК кількох ліній. 1 та 2 — компоненти, що відрізнялися за масою від очікуваного продукту. Маркер мас: M21: pBR 322+ BsuR1, (SibEnzyme), агароза 2%

Молекулярну природу змін, які відбулися, було з'ясовано через сиквенс вирізаних з гелю фрагментів, що демонстрували поліморфізм. Сиквенси нетипових послідовностей, отриманих з використанням однієї і тієї самої пари праймерів та ДНК різних ліній, порівнювали за допомогою програмного забезпечення Clustal 2.1 (Cluster alignment). Для пари праймерів P3-a1-L/R це послідовності розміром 134 п.н. (Seq- α -1) та 155 п.н. (Seq- α -2) (рис. 8).

```

Seq- $\alpha$ -1  CCACCCAATTTCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCACACCACAACAAACAACAACAACAACAACAAC
Seq- $\alpha$ -2  GCATCAAATT-CCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAC-ACAACA-CAA-CAACAACAACAACAACAACA
*** *****

Seq- $\alpha$ -1  AACACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAAGCAAGAACAACAACAAGGGACGACGGCGG
Seq- $\alpha$ -2  AACAACTTCAACAACACTACTACTACATTTGCTGCAAGGG-AGTTGTATTGGA--A-GG-GA
*****

Seq- $\alpha$ -1  GGGGCCGGCGGGGAAGGAGACGGGGAGGGGGAGGA
Seq- $\alpha$ -2  AGAGCTATTCCA-ATGAAA--GGAAT-----
*** *****

```

Рис. 8. Порівняння послідовностей Seq- α -1 та Seq- α -2, отриманих з парою праймерів P3-a1-L/R. * – відповідність нуклеотидів

Вони були ідентичними на 63,3 %, та виявилися більш подібними одна до одної, ніж кожна з них до очікуваної послідовності для тієї самої пари праймерів. Послідовність 155 п.н. мала значно довшу мікросателітну ділянку у порівнянні з послідовністю 134 п.н. Отже, формування продукту більшої довжини можна пояснити збільшенням кількості повторів у мікросателітному локусі. Послідовності, отримані з використанням праймерів N-o1-L/R, Seq- ω -1, 165 н., Seq- ω -2 та Seq- ω -3 по 179 п.н. були ідентичні при попарному порівнянні на 73,7–93,3%. Проте, продукт з меншою масою (165 п.н.) мав більше САА-повторів (18), ніж довший продукт (10 САА-повторів). Отже, ампліфікація мікросателітних повторів не є єдиним механізмом утворення нового алеля. Встановлена при порівнянні послідовностей значна кількість однонуклеотидних замін та делецій також може слугувати чинником утворення нового алеля, тому що на рівні

трансляції може призвести до утворення більш легкого компонента білкового спектру через наявність утвореного стоп-кодона.

Метод REMAP (retrotransposon-microsatellite amplification polymorphism), який дає змогу виявляти поліморфізм за розміром ділянки між ретротранспозоном та мікросателітним локусом шляхом її ампліфікації. Метод було використано для вирішення питання, чи можуть механізмом утворення нових алелів бути внутрішньокластерні перебудови, що відбуваються внаслідок мобілізації ретротранспозонів.

Як донор консервативної ділянки ретротранспозону було використано послідовність ретротранспозону родини *Sukkula*, оскільки її відносять до родин з найвищою активністю до переміщень у геномі. Як праймер, що буде характеризувати мікросателіт, було взято послідовність (CT)₉G. З 19 проаналізованих ліній-похідних Авродесу, які були представлені у 49 генераціях, 34 генерації виявилися мономорфними за спектрами чотирьох зернівок. Звичайно, не можна стверджувати, що такої мінливості взагалі немає. На інших зернівках ми могли б отримати інші результати. Переважна більшість ліній, що досліджувалися, мала відмінності у спектрі REMAP або у цілому за лінією, або у окремих генераціях, або у окремих зернівках (рис. 9). Це можна трактувати як свідчення значної активності ретроелементів у геномі інтрогресивних ліній пшениці. Вочевидь, стресові умови, спричинені заміщеннями у геномі, призводять до суттєвої активації ретротранспозонів і, як наслідок, можуть призвести до підвищення частоти проходження нерівного кросинговеру, що проявляється у характерних для гліадинів дуплікаціях генів та варіабельності повторюваних регіонів, зокрема поліглутамінових трактів. Отже, одним з чинників поліморфізму у гліадинових спектрах інтрогресивних ліній, який було зареєстровано серед деяких ліній через деякий час після їхнього створення як цитологічно стабільних гексаплоїдних ліній, можна вважати рух ретротранспозонів.

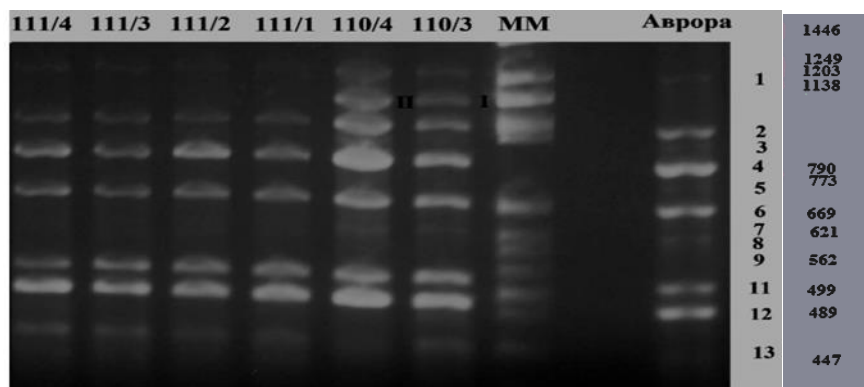


Рис. 9. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації за методом REMAP. Цифрами вказано робочі назви ліній, через косу лінію - номер зернівки. MM – маркер мас (M17, Lambda ДНК+ Bgl1, (SibEnzyme). Компоненти пронумеровані від 1 до 13 в залежності від розміру продукту. I та II – додаткові компоненти, агароза 1,5 %.

Потенціал гаметоцидної хромосоми 4S^{sh} як індуктора генетичної мінливості. Одним з дієвих засобів передачі чужинних генів до геному пшениці є стимуляція транслокацій генетичного матеріалу з чужинних хромосом на хромосоми пшениці за допомогою дії гаметоцидних генів (*Gc* гени), які викликають інтенсивні хромосомні аберації під час формування гамет. Однак ці гени викликають руйнування тих чоловічих і жіночих гамет, що їх не містять, чим значно обмежують перспективність їхнього використання для редукції чужинного хроматину у інтрогресивній гібридизації. Інтенсивність гаметоцидної дії різних гаметоцидних генів різна та ще і варіює у залежності від генетичного тла, у якому опиняється. Частина стійких до борошнистої роси та видів іржі ліній *T. aestivum/Ae. sharonensis* включають до складу свого геному гаметоцидну хромосому 4S^{sh} або її довге плече з геном *Gc*. Таким чином ці лінії є цікавими не лише як донори корисних генів, а і як лінії-індуктори генетичної мінливості при їхньому схрещуванні з потенційними донорами чужинних генів для зменшення обсягу чужинного хроматину. Для оцінки жорсткості дії гаметоцидного гена егілопса Шарона вивчали насінневу фертильність F₂ від F₁, де чоловічим компонентом схрещування були лінії *T. aestivum/Ae. sharonensis*, частина з яких мала, частина не мала гаметоцидної хромосоми. Жіночий компонент схрещування завжди був гібридом F₁, отриманими від схрещування: 1) інтрогресивних ліній *T. aestivum/Ae. speltoides* та *T. aestivum/Ae. umbellulata* з сортом Аврора, 3 комбінації; 2) інтрогресивних ліній *T. aestivum/Ae. speltoides* та *T. aestivum/Ae. umbellulata* одна з однією у будь-якому напрямку, 13 комбінацій; 3) інтрогресивних ліній *T. aestivum/Ae. speltoides* та *T. aestivum/Ae. sharonensis* у будь-якому напрямку, 6 комбінацій. Віддаленою перспективою таких схрещувань була надія отримати лінії, що матимуть окремі елементи геномів різних егілопсів, що контролюють стійкість до різних грибних захворювань пшениці через рекомбіногенез, запущений гаметоцидною хромосомою. Фертильними були рослини F₂ від 18 комбінацій схрещування з перевірених 22 комбінацій. Для оцінки фертильності рослин F₂ підраховували кількість колосків у кожній рослині і кількість зернівок у цих колосках, а також очікувану кількість зернин в такій кількості колосків. Виявилось, що фертильність рослин F₂ не залежала від батьківського компоненту схрещування – лінії *T. aestivum/Ae. sharonensis*, яка або мала або не мала гаметоцидну хромосому у складі геному. Не залежала фертильність також від того, які саме інтрогресивні лінії брали участь у формуванні гібридів F₁, які слугували материнським компонентом схрещування при гібридизації з лініями з/без гаметоцидної хромосоми (табл. 5. другий рядок). Статистично значущою різницею у фертильності рослин (табл. 5, третій рядок) характеризувались гібриди, материнський компонент яких походив від схрещування лише інтрогресивних ліній чи включав у родовід сорти м'якої пшениці. Гібриди, до родоводу яких увійшли сорти м'якої пшениці, характеризувались більш низькою фертильністю.

Результати однофакторних непараметричних дисперсійних аналізів

Джерело мінливості в кожному комплексі	D	H	df	P
Наявність гаметоцидної хромосоми	15158,5	3,35	1	>0,05
Походження інтрогресивних ліній	108735,1	10,85	3	<0,05,>0.01
Природа материнського компонента схрещування	106484	37,71	4	<0,01

За отриманими результатами виходить, що фертильність рослин не корелює з наявністю чи відсутністю гаметоцидної хромосоми саме у гібридній рослині. Проте участь інтрогресивної лінії з хромосомою 4S^{sh} у походженні гібрида на будь-якому етапі його родоводу впливає на формування геному протягом кількох послідовних поколінь. Наслідком цього впливу є зниження фертильності рослин, пов'язаних своїм походженням із інтрогресивною лінією з гаметоцидною хромосомою.

За результатами досліджень, які проводились раніше, хромосома 4S^{sh} відносилася до хромосом із сильною гаметоцидною дією (ген *Gc2*). Дані даного дослідження говорять про те, що гаметоцидний ген *Ae. sharonensis* 4S^{sh} не тільки може використовуватись як індуктор хромосомних аберацій для мінімізації обсягу чужинного хроматину, а і є ефективним саме при схрещуванні з лініями інтрогресивного походження.

При вивченні гібридів, що мають чи не мають гаметоцидну хромосому, компоненти схрещування та рослини гібридних популяцій вивчались за електрофоретичним спектром бета-амілази, ген якої локалізований у хромосомах 5A, 4A, 4D та 4S^{sh}, для контролю наявності/відсутності хромосоми 4S^{sh}. Скринування великої кількості ліній та гібридів показало дві характерні особливості у цих спектрах. По-перше, у спектрах деяких ліній з'явилися компоненти, яких не було у спектрах компонентів схрещування: 3, 5 та 7 (рис. 10). За результатами гібридологічного аналізу, вони були продуктами нових алелів генів *β-Amy-D1* (компонент 3) та *β-Amy-A1* (компоненти 5 та 7).

По-друге. Генотипи рослин F₂, встановлені за насінинами F₃, повністю пояснювались генотипами компонентів схрещування для тих комбінацій, що в них не брала участь лінія з гаметоцидною хромосомою, і розщеплення щодо обсягів фенотипних класів не відрізнялось від очікуваного 1 : 2 : 1 для двохалельного гена з кодомінуванням. В комбінаціях, отриманих за участю ліній з гаметоцидною хромосомою, спектр яких за β-амілазою характеризувався компонентом s (ген *β-Amy-S^{sh}*), найшвидшим (рис. 10), спостерігали нестачу гомозигот із пшеничним компонентом 1 та 2 (ген *β-Amy-D1*) та значний надлишок гетерозигот та гомозигот за компонентом s. Ця особливість, справді, була цілком очікувана, адже ексцес гамет з хромосомою 4S^{sh} отже і з геном *β-Amy-S^{sh}* пояснюється гаметоцидною природою цієї хромосоми, яка і проявляється в гетерозиготних гібридах F₁.

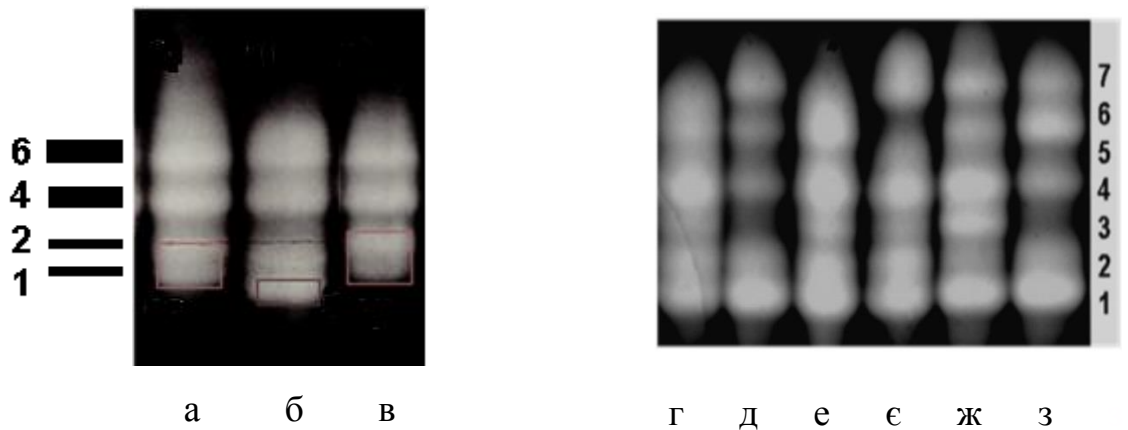


Рис. 10. Спектри ізозимів бета-амілази: а) Авродес, б) Аврозис, в) Аврора, г–з – лінії з новими компонентами спектру.

Третя особливість розщеплення в комбінаціях, утворених за участю ліній з гаметоцидною хромосомою, полягала у збільшенні кількості алелів, за якими відбувається розщеплення, у порівнянні з тими алелями, які були притаманні компонентам ініціального схрещування і мали брати участь в розщепленні. В той же час, ми жодного разу не спостерігали спектра, який одночасно містив би компоненти, які відповідають трьом алелям. Це змушує зробити припущення, що зміна алелю бета-амілази, яка призводить до появи на спектрі нового, неочікуваного компоненту, відбувається при формуванні гамет гібридом, гемізиготним за хромосомою $4S^{sh}$. Далі наводяться результати нашої спроби зрозуміти можливий молекулярний механізм, що може призводити до феномену, що спостерігається.

Природа мінливості гена бета-амілази в інтрогресивних лініях м'якої пшениці. Ген β -Amy-1 досліджували за допомогою ампліфікації його частин у ПЛР з 11 парами розроблених нами праймерів NAmu1–12 (сервіс PrimerBLAST на основі TSA сиквенсу мРНК гена бета-амілази *T. aestivum*). Досліджували ДНК Аврори, Аврозису, егілопса Шарона, інтрогресивних ліній, амфідиплоїда Міоза (AABVM^tM^t), Ae. comosa (M^tM^t). Два праймери не давали продукту ампліфікації, п'ять мали поодинокий та чотири – подвійні компоненти на спектрі ампліфікації. ДНК деяких ліній демонструвала внутрішньолінійний поліморфізм у спектрах продуктів ампліфікації (рис. 11)

Для встановлення джерела мінливості продуктів ампліфікації з парою праймерів NAmu3 секвенували важкий компонент AsisH та легкий AsisL Аврозису та низки інтрогресивної ліній. Виявлено, що важкі компоненти мають послідовність у 123 нуклеотиди, яка відсутня у легких компонентах (рис. 12). Ця послідовність на 100% ідентична послідовності мобільного генетичного елемента *Stowaway*-MITE, що входить до складу гена β -амілази з геному *Triticum urartu*, донора субгеному А м'якої пшениці. Цей неавтономний висококопійний транспозон має термінальні інвертовані повтори (TIR), завдяки яким часто утворює вторинні структури – шпильки та стає чинником перебудов у геномі. Для представників Triticeae вже було показано поліморфізм

за геном β -амілази, спричинений наявністю *Stowaway*-MITE у четвертому інтроні.

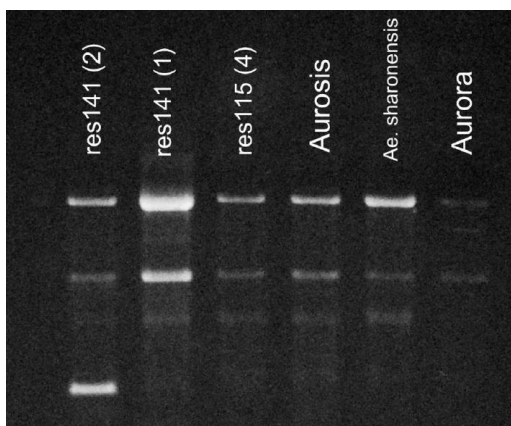


Рис. 11. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гена бета-амілази, що фланкується парю праймерів NAmu4, агароза 1,5%

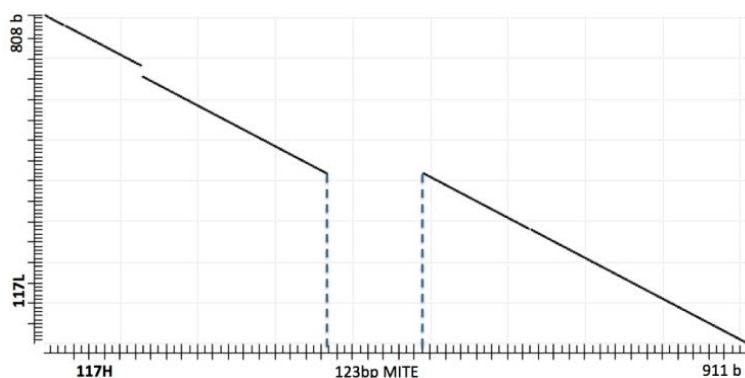


Рис. 12. Матриця вирівняних послідовностей важкого (вісь абсцис) та легкого (вісь ординат) ампліконів NAmu3 лінії res117. Пунктиром виділена послідовність мобільного генетичного елемента MITE у сиквенсі 117H, яка відсутня у 117L.

Для встановлення причин мінливості продуктів ампліфікації NAmu5 (рис. 13), вирівнювали послідовності ампліконів у батьківських форм Аврора, *Ae. sharonensis*, Аврозис та деяких інтрогресивних ліній. З усіх рослин лише Аврора мала два компоненти спектру – важкий та легкий. Наявність двох компонентів у Аврори пояснюється тим, що важкий компонент, на відміну від легкого, має ділянку у 21 н., у якій було знайдено характерний слід від транспозону MITE – послідовність TAGTA.

Дикорослий представник *Triticinae* *Ae. comosa* (M^tM^t), за нашими даними, має відмінний, важчий, ніж у Аврори компонент ампліфікації праймерами NAmu5. У штучного амфідиплоїда Міоза ($AABVM^tM^t$) розмір компоненту співпадає з такою у Аврори, хоча згідно складу геному Міоза має мати важкий компонент, як у егілопса. Імовірно, що зникнення послідовності транспозону MITE у Міозі пов'язане або з елімінацією послідовностей, або із активацією і переміщенням цього елемента в інший сайт, оскільки ці явища часто пов'язують із геномним шоком, спричиненим алополіплоїдизацією. Це – ще один встановлений нами факт поліморфізму за геном β -амілази, спричинений рухом транспозона MITE.

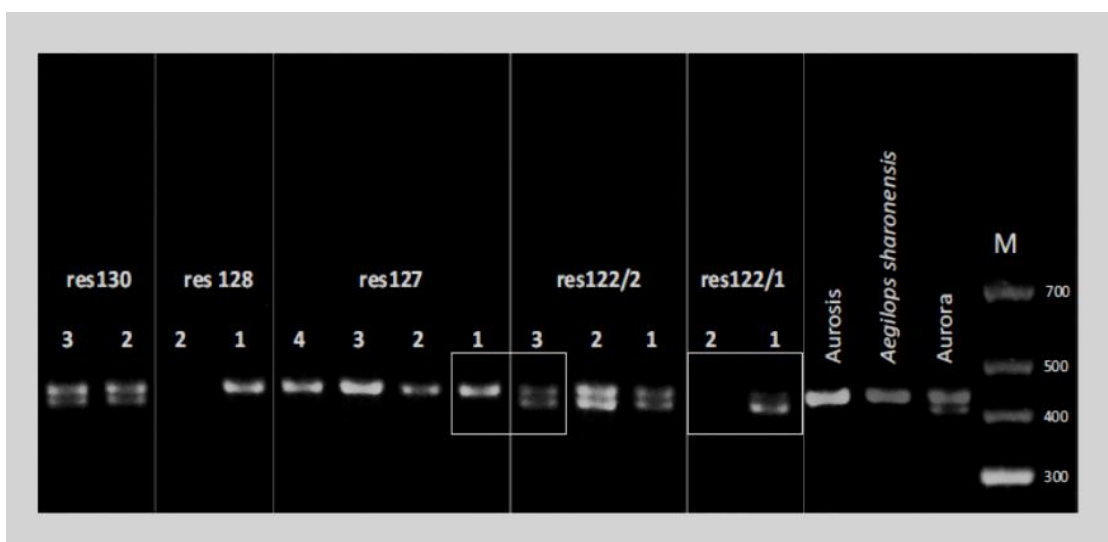


Рис. 13. Відсутність одного або обох батьківських компонентів у спектрах, що продукуються праймерами NAmu5. Верхній компонент – важчий, позначається як 1; нижній – легший, позначається як 2. Прямокутниками відмічені типи мінливості 1,2/1 та 1,2/0. Цифри під назвами ліній – номери зернівок, з яких брали ДНК, агароза 1,5%. Gene Ruler Low Range, Fermentas

Оскільки нами було встановлено, що елементи МІТЕ у пшениці м'якої та в егілопса Шарона відсутні у локусі, характерному для *Ae. comosa*, було зроблено припущення про різну локалізацію елемента у генах бета-амілази вказаних видів. Для доведення локалізації транспозону МІТЕ у генах β -амілази пшениці м'якої розробили серії праймерів stowc, специфічних до ТІР елемента, та stown, специфічних до послідовностей гена, що фланкують елемент. Вирівнювання послідовності *T. urartu* (GQ847677.1) та *Ae. comosa* (AY821690.1) показало, що дійсно елемент локалізований у різних сайтах гена: у сайті 545-668 н. *T. urartu* (третій інтрон), та у сайті 1224-1308 н. *Ae. comosa* (четвертий інтрон). Враховуючи те, що *T. urartu* є донором геному А м'якої пшениці, можна очікувати локалізацію МІТЕ елемента у тому ж сайті гена β -Amy-1А м'якої пшениці.

Порівняння спектрів ампліконів, отриманих із праймерами до різних частин гена β -амілази для ДНК Аврори, Аврозису, егілопса Шарона та інтрогресивних ліній, показало, що нуклеотидні послідовності гена у деяких ліній відрізняються одна від одної у гені β -Amy-D1 та, можливо, β -Amy-A1, що може бути причиною наявного поліморфізму у електрофоретичних спектрах ізозимів бета-амілази. Одним з доведених у нашій роботі механізмів зміни у нуклеотидній послідовності гена визнано рух транспозона Stowaway-МІТЕ, і наслідки цього руху відстежуються при аналізі геномної ДНК зразків. Проте, зважаючи на те, що цей транспозон локалізований в інтроні, безпосередньо його рух начебто не має впливати на рухливість ізозимів спектрів бета-амілази, якщо тільки такі зміни у синтезі білку не є наслідком участі зазначеного транспозону у регуляції експресії гена.

ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ ЗА МАРКЕРНИМИ ОЗНАКАМИ

Ознака опушення краю листової піхви. Ця ознака притаманна деяким інтрогресивним лініям *T. aestivum/Ae.sharonensis*, які разом з носіями контрастного фенотипу було залучено до гібридологічного аналізу з використанням F_1 , F_2 та F_3 . Локалізацію критичного гена виконано за допомогою хромосомно-специфічних маркерних ознак. Довести, що ознака контролюється одним доміантним геном вдалось лише з урахуванням того, що ген локалізований у хромосомі $4S^{sh}$, гаметоцидній. Для моделювання теоретичного розщеплення було враховано ексцес гамет з хромосомою $4S^{sh}$ та, відповідно, доміантним ідентифікованим нами геном $Hs-S^{sh}$. Ексцес залежить від величини p , імовірності гамети без хромосоми $4S^{sh}$ взяти участь у формуванні життєздатної зиготи. Для отримання оцінки величини p використовували метод максимальної правдоподібності, у якості джерела різноманітності – результати розщеплення у восьми різних комбінаціях схрещування для двох років. Використання p для розрахунку теоретичних співвідношень розщеплення призвело до статистичної відповідності між ними та співвідношеннями, що спостерігались. Так було розроблено модель врахування локалізації критичного гена в гаметоцидній хромосомі з її преферентною передачею до гамет для отримання адекватного результату генетичного аналізу.

За отриманими результатами, величина p є різною у два роки дослідження, $p = 0,236 \pm 0,030$ (2000 р.) та $p = 0,167 \pm 0,016$ (2001 р.). Це показало, що оцінювання популяції F_2 з метою встановлення частоти p може включати післядію ще одного фактору, що спотворює розщеплення: життєздатність зигот без гаметоцидної хромосоми. Для цього фактору була врахована при оцінці популяцій F_2 одночасно за двома ознаками: опушення краю листової піхви та електрофоретичний спектр бета-амілази, що контролюється геном β -*Amy-1*, розташованим в тій самій хромосомі. Розщеплення в поколінні F_2 за маркерним для хромосом $4D$ та $4S^{sh}$ компонентом β -*Amy-1* було вивчено на двох етапах онтогенезу: на рослинах F_2 за зернівками F_3 (по 4 зернини на рослину F_2) та безпосередньо на зернівках F_2 . Зерна F_3 можна отримати лише з тих насінин F_2 , які проросли, досягли зрілості та виявились фертильними. Це все аспекти життєздатності зиготи. А другу оцінку можна отримати з будь-якої зернівки F_2 незалежно від її подальшої долі. Фактор зниження життєздатності зиготи, V , можна оцінити як відношення фактичної кількості гомозигот за алелем β -*Amy-D1* до теоретичної, розрахованої з урахуванням величини p , отриманої з оцінки на стадії кушіння, коли рослину можна оцінити за другою ознакою, опушення краю листової піхви. Якщо протягом онтогенезу від стадії кушіння до стадії отримання насіння зникає певна частина зигот, частоти трьох різних генотипів будуть відрізнятися від тих, що розраховані з урахування тільки величини p , фактичні дані для розрахунку якої було отримано на більш ранньому етапі онтогенезу. Було встановлено, що теоретичний розподіл частот різних генотипних класів за геном β -*Amy-1*, побудований на основі величин p , розрахованих за даними оцінювання рослин на стадії кушіння (0,24 у 2000 р. та

0,17 у 2001 р.), відрізняється від фактичного розподілу для популяції обох років. Ця різниця особливо помітна, коли генотипи F_2 встановлювали за зернами не F_3 , а F_2 . Введення розрахованої величини $V=0,1$ дає змогу отримати теоретичні величини класів, що відповідають фактичним для обох років дослідження. Таким чином було доведено що інтерпретація результатів генетичного аналізу за участю інтрогресивних ліній має враховувати можливий вплив хромосоми, в якій локалізований критичний ген, на формування життєздатних гамет та зигот та їхню участь у формуванні нащадків популяції, що розщеплюється.

Ознака остистість колосу. На сьогодні на хромосомах пшениці м'якої локалізовано три гени – домінантні інгібітори розвитку остей на колосі пшениці: *Hd* (4AS), *B1* (5AL), *B2* (6BL). Наявність остей – ознака рецесивна і досі немає жодної певної інформації про гени, які б могли виконувати у пшениці роль промоторів розвитку остей. Першу спробу локалізувати ген-промотор остистості було зроблено нами з використанням контрастних за ознакою сортів та ліній пшениці твердої, яка є тетраплоїдом AABB, та мікросателітного аналізу популяцій, що розщеплюються, F_2 та F_3 . Було виконано циклічне схрещування за участю двох остистих сортів, одної безостої лінії та двох ліній з остеподібними відростками. Встановлено, що у розщепленні у залежності від комбінації бере участь або один ген – промотор остистості *Bn* чи інгібітор остистості *B1*, або обидва разом. Мікросателітний аналіз з використанням локусів, специфічних до хромосом 4A, 5A та 6B виявив зчеплення локусу *Xbarc178* з геном – промотором остистості на хромосомі 6B, який може бути певним алелем картованого на цій хромосомі гена *B2*.

До гібридологічного аналізу щодо контролю розвитку остей було залучено низку ліній *T. aestivum/Ae. sharonensis* з різними фенотипами: остисті, з остеподібними відростками, безості. За даними попереднього вивчення, залучені до схрещування лінії в деяких комбінаціях характеризувались різною структурою геномів щодо гомеологічної належності та кількості наявних в них інтрогресій. Це має наслідком появу у M1 мейозу унівалентів, їхню часткову втрату в анафазі, формування анеуплоїдних гамет та зигот зі зниженою функціональністю та життєздатністю. Отже, моделювати очікувані співвідношення розщеплення у популяціях F_2 було потрібно з урахуванням особливостей взаємних геномної структури компонентів схрещування. В результаті аналізу встановлено, що промотор остистості, *Awn1* чужинного походження розташований у хромосомі 6S^{sh} або її транслокації на пшеничну хромосому. Ості утворюються лише за відсутністю пшеничного гена *B1* (5A) у випадку делеції відповідної ділянки хромосоми або через мутацію самого гена з втратою функції. За наявністю цього гена у геномі промотор остистості *Awn1* продукує фенотип з остеподібними відростками. На хромосомі 6D локалізується ще один промотор остистості *b_n*, більш слабкий у порівнянні з *Awn1*.

Генетичний аналіз двох ліній – похідних Аврлати з контрастними фенотипами було виконано з застосуванням мікросателітного аналізу для хромосом 5A, 6B та 6D на популяції F_2 . Було припущено, що безоста лінія

ідентична Аврорі за генами *B1* та *b_n*, остиста має чужинний промотор остистості *Awn1* від егілопса зонтичного та має відрізнятися від Авролати за геном *B1* через делецію термінального регіону довгого плеча хромосоми 5A, де локалізований ген *B1*, або мутацію у цьому гені. Очікуване розщеплення за остистістю у F₂ моделювали з урахуванням геномної структури компонентів схрещування щодо наявності та якості інтрогресій та поведінки хромосом у мейозі. Мікросателітні локуси *Xwmc705-5A* *Xcfd45-6D* виявились ефективними, що дало можливість підтвердити запропоновану гіпотезу про генетичний контроль ознаки. Остиста інтрогресивна лінія *res206*, яка походить від схрещування між безостим сортом Аврора та Авролатою 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* у складі хромосоми 6U, яка замістила хромосому 6D м'якої пшениці. Лінія *res211*, подібно до реципієнтного генотипу Аврора, має інший алель цього гена, *awn1*, позначений раніше нами як *b_n*, на хромосомі 6D, який спричинює розвиток остеподібних відростків за відсутності домінантного інгібітора остистості *B1*, локалізованого на 5A хромосомі 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 *B1/b1*, або до початку регіону на хромосомі 5A, який через перебудови обмежений щодо рекомбінації з гомологічною ділянкою неперестроєваної хромосоми 5A.

Генетичний аналіз ліній за ознакою забарвлення зрілої луски. Серед досліджуваних інтрогресивних ліній різного походження були такі, що відрізнялись за забарвленням колоскової луски від рекурентного батька (Аврора, червона луска) та характеризувались або темно-коричневою (похідні Аврозису, Авролати та Авродесу), або чорною лускою (похідні тільки Авролати). Для гібридологічного аналізу було відібрано 42-хромосомні лінії, цитологічно стабільні. Було отримано та оцінено за кольором зрілої луски гібриди F₁ та F₂ 13-ти комбінацій схрещування. Встановлено, що ген, який відповідає за темно-коричнєве забарвлення луски, є напівдомінантним відомим геном *Rg*, локалізованим у пшеницевих на хромосомах 1-ої гомеологічної групи. Розщеплення у F₂ відрізняється від очікуваного 1:2:1 у тих випадках, коли ген входить до складу цілої чужинної хромосоми або значно транслокованої хромосоми, яка не утворює з гомологом бівалент у мейозі. В таких комбінаціях схрещування теоретичне розщеплення моделювали з урахуванням формування анеуплоїдних гамет за наявністю двох або чотирьох унівалентів. Чорне забарвлення луски у похідних Авролати контролюється геном *Bg2* (black glume), локалізованим, за даними про асоціацію морфологічних ознак, у хромосомі 5U. Ген ідентифіковано вперше. У всіх комбінаціях поза залежності від геномної структури компонентів схрещування спостерігали нестачу фенотипів з чужинною ознакою, хоча статистична значущість визначалась не завжди. З цього факту виникло припущення про генетичний драйв у мейозі гібридів F₁, об'єктом якого є альтернатива

наявність/відсутність чужинного хроматину у продукті мейозу, так що клітини з таким хроматином усуваються від подальшого гаметогенезу.

Ознака стійкість до борошнистої роси. Лінії, стійкі до борошнистої роси, були серед похідних всіх трьох геномно-заміщених амфідиплоїдів. Їх було залучено у стандартний генетичний аналіз з використанням гібридних поколінь, що розщеплюються. Отримані результати переконливо засвідчують лише одне: ми не можемо побудувати модель успадкування стійкості до борошнистої роси, коли стійким компонентом у комбінаціях схрещування виступає лінія інтрогресивного походження. Можна припустити, що інтрогресивні ділянки хроматину втрачаються, не передаються через гамети у поколіннях. Але вони стабільно передаються у самих лініях, адже до схрещувань були залучені лише ті лінії, які протягом 10-річного спостереження залишались стабільно стійкими. Насіння F_1 отримуються з одного колоса одної рослини лінії. Насіння F_2 отримуються від кожної рослини F_1 , попередньо оціненої на стійкість, окремо. Виходить, що стійкість зникає катастрофічно, якщо взяти до уваги кількість стійких рослин у F_2 , саме на стадії формування популяції, що розщеплюється, тобто в популяції, яка складається з генетично різноманітних рослин. На сьогодні відомо багато молекулярних механізмів, які призводять до зміни експресії генів без втручання до його нуклеотидної основи аж до його замовчування. На фенотипному рівні це призводить до зменшення частки стійких рослин проти очікуваної та залишає враження про втрату інтрогресивного матеріалу у рослинах, які мають гібридне походження. Знову не можна виключити можливості мейотичного драйву. Отримані результати показують, що завдання перенесення чужинного гена стійкості на генетичне тло комерційного сорту м'якої пшениці, яке є результатом тривалої консолідації через добір найбільш оптимальних генотипів, без використання внутрішньогенних молекулярних маркерів є не дуже простим. Підтвердження факту передачі такого гена на молекулярному рівні має передувати спробам з'ясувати, чому рослина не демонструє стійкість – чи вона не має чужинного гена стійкості, чи ген наявний у складі геному, проте не функціонує.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Феномен перманентної мінливості пшеничних амфідиплоїдів та ліній інтрогресивного походження став для нас очевидним через багаторічне спостереження за зразками рослинного матеріалу, в родоводі якого був у наявності етап віддаленого схрещування. Дві особливості цієї мінливості є спільними для всіх рослинних зразків. Її напрям завжди один: від градації ознаки, властивої амфідиплоїду чи його дикорослому компоненту вихідного схрещування, до градації, яка властива пшениці, що культивується. Мінливість є процесом перманентним. Якщо у зразку з'явилася заміна однієї градації на іншу, процес не зупиняється аж до повного зникнення ініціальної градації ознаки. Однак мінливістю характеризуються не всі лінії інтрогресивного походження. Серед деяких ми не спостерігали змін за тими самими морфологічними ознаками, що за ними частина ліній була перманентно

нестабільною. Виявлена мінливість ніяк не пов'язана з цитологічною нестабільністю ліній та амфідиплоїдів, всі вони залишаються гексаплоїдними. Вивчення ліній за електрофоретичними спектрами білків та продуктів ампліфікації ДНК за допомогою ПЛР показало, що зміни стосуються молекулярного фенотипу також. Поліморфізм виходив за межі батьківських форм ініціальних гібридів и не може бути поясненим лише включенням до геному ліній чужинних генів. Звичайно, такі результати можна трактувати на користь припущення про мозаїчну структуру хромосоми, до яких підібрані хромосомно-специфічні маркери. Проте у низці випадків було зареєстровано поліморфізм за мікросателітними локусами між окремими рослинами однієї і тієї самої інтрогресивної лінії. І це прямо вказує на наявність якихось процесів у геномі таких ліній, які роблять їх генетично нестабільними. Встановлення молекулярних механізмів, які призводять до змін, що реєструються, є дуже важливим питанням. Якщо місце інтрогресії стає гарячою точкою змін, що відбуваються у геномах гібридного походження, не можна не думати про те, що інтрогресія супроводжується інактивацією інтрогресованого генетичного матеріалу і втратою ознак інтересу через функціональну загибель критичного гена. З іншого боку, інтрогресія може запускати процес молекулярних змін, які можуть зачіпати нуклеотидні послідовності резидентного геному. На моделях гліадинових генів та генів бета-амілази показано, що зміни у геномі можуть виникати завдяки мутагенній властивості мікросателітних повторів, які входять до складу гліадинових генів, та руху ретротранспозонів.

Інтрогресивні лінії є привабливим матеріалом для їхнього залучення до генетичного аналізу щодо ознак, градації яких відрізняються від таких, які властиві зразкам пшениці м'якої. Під час такого аналізу було встановлено, що використання інтрогресивних ліній у якості компонентів схрещування вимагає їхнього попереднього ретельного вивчення за структурою геному щодо наявності та якості інтрогресій, результати якого мають бути покладені в основу моделювання очікуваного співвідношення обсягів фенотипних класів. Мікросателітний аналіз, що широко використовувався нами для скринування ліній щодо гомеологічної належності інтрогресій та для встановлення зчеплення між окремими елементами хромосом, виявився не зовсім надійним інструментом для вивчення геномної структури інтрогресивних похідних, перш за все через генетичну мінливість усередині таких геномів. Така мінливість знижує діагностичні компетентності алелів мікросателітних маркерів, які констатуються за вивченням ініціальних компонентів схрещування. Наш багаторічний досвід роботи з лініями пшениці, що мають інтрогресивне походження, сформував тверду впевненість, що такий матеріал незважаючи на всю свою привабливість наявність поліморфізмів, не властивих сортам пшениці м'якої, є невичерпним джерелом артефактів, якщо використовувати його у генетичному аналізі без урахування особливості геномів таких ліній, спричинених їхнім походженням.

Головне питання, яке поставило перед нами виконане дослідження і ті результати, які було отримано, – що саме насправді є причиною вибуху мінливості, яку спостерігаємо серед нащадків гібридних геномів: наявність у

цих геномах чужинного хроматину, який безпосередньо залучений у контролі ознак, які ми вважаємо інтрогресованими, тому що такі градації ознак не були притаманні реципієнтному організму, а характеризували вид – джерело інтрогресії. Чи зміни виникають у хроматині резидентного геному також, стабільність якого порушується молекулярними процесами, які, запускаються при зведенні різних сталих, консолідованих геномів у спільний гібридний геном. На нашу думку, цей останній механізм збільшення мінливості у інтрогресивних нащадків не можна відкинути хоча б через те, що мінливість рослин інтрогресивного походження і за результатами наших досліджень, і в роботах інших авторів часто виходить за межі варіювання, які окреслюються вихідними геномами. Мінливість, яку спостерігали на генах гліадинів та бета-амілази, не була пов'язана з перенесенням чужинних алелів. Нові алелі виникали через мутації в пшеничних генах, спричинені рухом транспозонів. Проте це лише частина мінливості. На нашу думку, порушення консолідованості геному, яке викликається внесенням до нього чужинного хроматину навіть якщо він і не зберігається, може спричинювати епігенетичні події, які зумовлюють зміну градацій ознак морфології, фізіології, молекулярного фенотипу.

ВИСНОВКИ

На спеціально створеному рослинному експериментальному матеріалі пшенично-чужинних амфідиплоїдів та інтрогресивних ліній з залученням різних чужинних видів та різних ознак показано, що віддалена гібридизація сприяє розширенню генетичного пулу пшениці м'якої не лише через інтрогресію генів, а і через запуск молекулярних механізмів забезпечення генетичної мінливості з залученням власного пшеничного генетичного матеріалу.

1. Штучно створені амфідиплоїди, в яких геноми диплоїдних егілопсів різних видів додані до тетраплоїдного компоненту AABB пшениці м'якої чи до геному AABB пшениці твердої, виявляють перманентну, односпрямовану та незворотну мінливість, яка візуалізується на ознаках морфологічного фенотипу. Частина ліній інтрогресивного походження, цитологічно стабільних гексаплоїдних, виявляє перманентну, односпрямовану та незворотну мінливість за ознаками морфології. Лінії, стабільні за ознаками морфології, можуть бути нестабільними за біохімічними ознаками та ознаками молекулярного фенотипу.
2. Напрямок змін за ознаками морфології односпрямований та певний – заміна градації, притаманної дикорослому виду, джерелу інтрогресивного хроматину, на градацію, притаманну реципієнтному фенотипу пшениці м'якої. Схоже, що спостерігається повторення еволюції геному пшениці при її одомашнюванні.
3. У електрофоретичних спектрах білків та SSR-ампліконів зникають компоненти спектрів, притаманні спектрам компонентів ініціального

- схрещування, і з'являються нові, не властиві спектрам вихідних для схрещування генотипів.
4. Поліморфізм за компонентами електрофоретичного спектра гліадинів в лініях, нестабільних за цією ознакою, спричинюється рухом транспозонів *Sukkula*, локалізованих у міжгенних ділянках гліадинових кластерів, та динамікою мікросателітних повторів, що входять до складу гліадинових генів у якості глутамінкодуєчих кодонів.
 5. У гібридах F_1 , отриманих за участю ліній з гаметоцидною хромосомою $4S^{sh}$, в процесі споро- чи гаметогенезу виникають мутації, які візуалізуються у нащадків як нові компоненти електрофоретичного спектру пшеничних генів бета-амілази.
 6. У гені бета-амілази в амфідиплоїді Міоза та інтрогресивних лініях – похідних Аврозису зареєстровано поліморфізм за наявністю/відсутністю послідовності транспозона МІТЕ (рух транспозона), що може бути потенційною причиною появи нових компонентів у електрофоретичному спектрі бета-амілази, не пов'язаною з чужинним хроматином.
 7. Для вивчення структури геному інтрогресивних ліній щодо обсягу та гомеологічної належності інтрогресій ефективними є гени, що кодують запасні білки та ферменти, і ознаки морфології рослин у сполученні з результатами вивчення хромосомних конфігурацій у М1 МКП мейозу гібриду між інтрогресивною лінією та носієм реципієнтного геному (Аврора).
 8. Роздільна здатність мікросателітного аналізу для ідентифікації та хромосомної локалізації інтрогресій обмежена їхнім віднесенням до певної гомеологічної групи хромосом через феномен *transferability*, який часто не дає змоги визначити субгеном пшениці м'якої, А, В чи D, який прийняв інтрогресію.
 9. Мікросателітні локуси, в тому числі у сполученні з транспозонами, є ефективною маркерною системою для виявлення внутрішньохромосомних перебудов у геномах інтрогресивних ліній, яка однак не дає відповіді на питання, яка саме ДНК бере участь у перебудові – інтрогресивні ділянки чи послідовності реципієнтного геному.
 10. Знайдено нові гени, що мають маркерні функції для ідентифікації інтрогресій від залучених до роботи видів егілопсів: ген опушення краю листової піхви *Hs-S^{sh}* у геномі Аврозису, ген зернової кислої фосфатази *Asph-1*, специфічних до хромосом 4-ої гомеологічної групи.
 11. Ідентифіковано ген – промотор остистості колосу *awn1* у хромосомах 6-ої гомеологічної групи Аврозису та Авролати, гіпостатичний до домінантного інгібітора розвитку остей *B1* у хромосомі 5А пшениці м'якої. Епістаз не відбувається за умов гемізиготності гена *B1*.
 12. Темне забарвлення зрілої колоскової луски у інтрогресивних ліній контролюється генами ортологічної серії *Rg*, що потрапляють до їхнього геному у складі хромосом 1S, 1U, $1S^{sh}$ або їхніх транслокацій. Висунуте припущення про існування в хромосомі 5U Авролати гена *Bg2* чорного забарвлення луски, негомеологічного пшеничному гену *Bg1* (1А).

13. Гаметоцидна дія гена Gc хромосоми $4S^{sh}$ не є повною. Деякі нащадки гібридів F_1 за участю інтрогресивної лінії з гаметоцидною хромосомою не мають цієї хромосоми і, таким чином, можуть схрещуватися зі зразками пшениці м'якої як джерело генів корисних ознак без внесення у гібриди гаметоцидної хромосоми.
14. Розташування досліджуваного гена у гаметоцидній хромосомі ($Hs-S^{sh}$, β - $Amy S^{sh}1$) спотворює співвідношення розщеплення у F_2 стосовно 1:2:1 через ексцес фенотипів, що визначається цим геном. Поява рослин з фенотипом, який визначається пшеничними алелями таких генів, характеризує частоту виникнення гамет без гаметоцидної хромосоми.
15. Результати генетичного аналізу, виконаного на гібридному матеріалі за участю інтрогресивних ліній, можуть залежати від стадії онтогенезу, на якій оцінюється фенотип популяції, що розщеплюється, позаяк незбалансований генетичний склад зигот, які утворюються гібридами F_1 , може впливати на їхню життєздатність протягом онтогенезу.
16. На формування картини розщеплення у F_2 від схрещувань за участю інтрогресивних ліній впливає факт утворення анеуплоїдних гамет зі зниженою конкурентоспроможністю та слабка життєздатність анеуплоїдних зигот перш за все у випадку локалізації критичного гена у хромосомі, що не утворює бівалент з гомологом у гібриді F_1 . У випадку повного усунення анеуплоїдних гамет від запліднення картина розщеплення не порушується.
17. За наявності у $M1$ МКП рослин F_1 чотирьох унівалентів та мультивалентів може порушуватися трансмісія чужинного гена навіть якщо він знаходиться у хромосомі, яка кон'югує з гомологом, через формування зигот із значними відхиленнями у геномній структурі та їхнє усунення від подальшого розвитку.
18. Один з генів стійкості до борошнистої роси Аврозису локалізований у хромосомі $2S^{sh}$, гаметоцидній, чим пояснюється непридатність відповідних ліній – похідних Аврозису для генетичного аналізу за цією ознакою методом створення та оцінки популяцій, що розщеплюються.
19. Генетичний аналіз інтрогресивних ліній – похідних геномно-заміщених амфідиплоїдів Авродесу, Авролати, Аврозису за ознакою стійкості до борошнистої роси з використанням гібридних популяцій, що розщеплюються, виявився неконструктивним через неможливість відділити трансмісію гена, що забезпечує стійкість у стійкій лінії, від збереження/втрати його функціональності у рослин популяції, що розщеплюється.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Терновская ТК, Антонюк МЗ. Гены биохимических признаков как маркеры чужеродного генетического материала в геноме пшеницы. Цитология и генетика. 1996;30(3):71-85. (Здобувачем разом зі співавтором

- проведено пошук джерел, виконано їхнє опрацювання та аналіз інформації)
2. **Антонюк МЗ**, Терновская ТК. Признаки морфологии растений как маркеры гомеологических групп хромосом *Triticeae*. Цитология и генетика; 1997, 31(4): 95–101. (Здобувачем разом зі співавтором створено відповідний рослинний матеріал, виконано його аналіз та опрацьовано результати)
 3. Злацкая АВ, **Антонюк МЗ**, Вдовиченко ЖВ, Терновская ТК. Зерновая кислая фосфатаза как генетический маркер хромосом четвертой гомеологической группы хромосом у эгилопсов и пшеницы. Цитология и генетика; 1999, 33(5): 42–46. (Здобувачем особисто опрацьовано метод електрофоретичного аналізу, брав участь у створенні рослинного матеріалу, разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).
 4. **Антонюк МЗ**, Терновская ТК. Использование геномной *in situ* гибридизации для цитогенетического изучения мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. и ее сородичей. Цитология и генетика; 2001, 35(2): 67–76. (Здобувачем разом зі співавтором проведено аналіз літературних джерел, написано статтю).
 5. Вдовиченко ЖВ, **Антонюк МЗ**, Терновская Т.К. Воздействие гаметоцидной хромосомы 4S¹ на соотношение фенотипического расщепления при генетическом анализе мягкой пшеницы. Цитология и генетика; 2003, 37(5): 49–56. (Здобувачем разом зі співавторами створювався рослинний матеріал та аналізувалися одержані результати)
 6. Vdovychenko ZhV, **Antonyuk MZ**, Ternovskaya TK. Genetic analysis of the *T. aestivum/Ae. sharonensis* introgressive lines of common wheat for resistance to powdery mildew. Cytology and Genetics; 2005, 39(3): 67–74. (Здобувачем разом із співавторами створювався рослинний матеріал та аналізувалися одержані результати)
 7. **Antonyuk MZ**, Bodylyova MV, Ternovskaya TK. Genome structure of introgressive lines *Triticum aestivum/Aegilops sharonensis*. Cytology and Genetics; 2009, 43(6): 58-67. (Здобувач планував експеримент, його дизайн, брав участь у створенні експериментального матеріалу, аналізі даних та написанні статті)
 8. Prokopyk D, **Antonyuk M**, Ternovskaya T. The genetic control of the α - amylase isozymes of the durum wheat (*Triticum durum* Desf.). Cytology and Genetics; 2009, 43(3): 151-156. (Здобувач планував експеримент, брав участь у експерименті, аналізі даних та написанні статті)
 9. **Антонюк МЗ**, Прокопик ДО, Мартиненко ВС, Терновська ТК. Ідентифікація генів-промоторів остистості в інтрогресивній лінії *Triticum aestivum/Aegilops umbellulata*. Цитология и генетика; 2012, 46(3): 10–19. (Здобувач планував експеримент, його дизайн, брав участь у створенні експериментального матеріалу, аналізі даних та написанні статті)
 10. **Antonyuk MZ**, Shpylchyn VV, Ternovska TK. Permanent Genetic Variability in the Introgressive Lines and Amphidiploids of *Triticeae*. Cytology and

- Genetics; 2013, 47(4): 242–251. (Здобувач брав участь у формуванні експерименту, брав участь у створенні рослинного матеріалу, оцінюванні за морфологічною ознакою, аналізі даних та написанні статті)
11. **Antonyuk M**, Navalikhina A, Ternovska T. Beta-amylase gene variability in introgressive wheat lines. J Appl Genetics; 2016. – DOI 10.1007/s13353-016-0364-3 (Здобувач планував експеримент, опрацьовував методи, брав участь у створенні рослинного матеріалу, аналізі даних та написанні статті)
 12. Iefimenko TS, **Antonyuk MZ**, Martynenko VS, Navalihina AG, Ternovska TK. Introgression of *Aegilops mutica* genes into common wheat genome. Cytol Genet. 2018; 52(1):21-30. (Здобувач планував експеримент, брав участь у створенні експериментального матеріалу, аналізі даних та написанні статті)
 13. **Антонюк МЗ**, Терновская ТК, Созинов АА Идентификация хромосом пырея в чужеродно-замещенных линиях пшеницы с использованием признаков морфологии растений и биохимических маркеров. Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук; 1997, (1): 4–6. (Здобувач виконував роботу з експериментального аналізу білкових маркерів, брав участь у створенні рослинного матеріалу, аналізі даних та написанні статті)
 14. Терновська ТК, **Антонюк МЗ**. Інтродукція генів дикорослих родичів пшениці для позитивного впливу на ознаку вміст білка в зерні. Наукові записки НаУКМА. Випуск Біологія та екологія; 2006, 54: 3–8. (Здобувач виконував експериментальну частину роботи, розробляв дизайн експерименту, брав участь у створенні матеріалу, аналізі даних)
 15. Прокопик ДО, Ющук АІ, **Антонюк МЗ**, Терновська ТК. Гомеологічні належність генів, що контролюють остистість в інтрогресивних ліній м'якої пшениці. Наукові записки НаУКМА. Випуск Біологія та екологія; 2009, 93: 10–16. (Здобувач брав участь в експериментальній частині роботи, розробляв дизайн експерименту, створював рослинний матеріал, брав участь в аналізі даних)
 16. Маньковська ОС, Терновська ТК, **Антонюк МЗ**. Цитологічна стабільність та життєздатність інтрогресивних ліній з гаметоцидною хромосомою 4S¹ та їх гібридів. Наукові записки НаУКМА. Випуск Біологія та екологія; 2009, 93: 23–26. (Здобувач планував експеримент, розробляв його дизайн, брав участь у створенні експериментального матеріалу, виконання цитологічних процедур, аналізі даних та написанні статті)
 17. Єфіменко ТС, **Антонюк МЗ**. Хромосомна локалізація інтрогресій у геномі ліній *Triticum aestivum* / *Aegilops speltoides*, стійких до борошнистої роси. Наукові записки НаУКМА. Випуск Біологія та екологія; 2010, 106: 9–14. (Здобувач планував експеримент, брав участь у створенні експериментального матеріалу, польовому оцінюванні рослин на стійкість та електрофоретичному аналізі, аналізі одержаних результатів та написанні статті)

18. **Антонюк МЗ**, Бодильова МВ, Єфіменко ТС. Поліморфізм за SSR-локусами 3D хромосоми серед генотипів пшениці — реципієнтів чужинного гена стійкості до борошнистої роси (*Pm*). Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів; 2010, 8(1): 10–17. *(Здобувач планував експеримент, виконував польове оцінювання рослин, брав участь у створенні рослинного матеріалу, електрофоретичному аналізі, аналізі результатів)*
19. Маньковська ОС, **Антонюк МЗ**. Гаметоцидні гени представників *Aegilops* L. Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів; 2010, 8(1): 140–153. *(Здобувач формулював структуру статті, брав участь в аналізі даних та написанні статті)*
20. Михайлик СЮ, **Антонюк МЗ**, Терновська ТК. Генетична варіабільність інтрогресивних ліній м'якої пшениці за генами *Gli*. Наукові записки НаУКМА. Випуск Біологія та екологія; 2011, 119: 8–14. *(Здобувач формулював структуру дослідження, розробляв методики, розробляв дизайн експерименту, брав участь у створенні експериментального матеріалу, аналізі даних та написанні статті)*
21. Штефюк ТВ, **Антонюк МЗ**, Терновська ТК. Мікросателітний аналіз інтрогресивних ліній м'якої пшениці, стійких до борошнистої роси. Наукові записки НаУКМА. Випуск Біологія та екологія; 2012, 132: 3–8. *(Здобувач формулював структуру дослідження, розробляв методики, розробляв дизайн експерименту, брав участь у створенні експериментального матеріалу, аналізі даних та написанні статті)*
22. **Антонюк МЗ**, Штефюк ТВ., Терновська ТК. Мікросателітний аналіз стійких до борошнистої роси інтрогресивних ліній м'якої пшениці різного походження. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. Київ, Логос, 2015, 16: 21–25. *(Здобувач формулював структуру дослідження, розробляв методики, розробляв дизайн експерименту, брав участь у створенні експериментального матеріалу, аналізі даних та написанні статті)*
23. Михайлик СЮ, Мартиненко ВС, **Антонюк МЗ**. Варіабельність внутрішньогенних мікросателітних повторів генів α -, β та ω -гліадинів в інтрогресивних лініях пшениці. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць; Київ, Логос, 2016, 19: 33-37. *(Здобувач виконував частину експерименту, розробляв його дизайн, брав участь у створенні рослинного матеріалу, аналізі даних та написанні статті)*
24. Штефюк ТВ, Михайлик СЮ, **Антонюк МЗ**, Терновська ТК. Характеристика генетичної різноманітності інтрогресивних ліній пшениці за консервативними регіонами генів стійкості. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць; Київ, Логос, 2016: 55–60. *(Здобувач виконував частину експерименту, розробляв його структуру, брав участь у створенні рослинного матеріалу, аналізі даних та написанні статті)*

25. Терновська ТК, **Антонюк МЗ**, Штефюк ТВ, Мартиненко ВС Неканонічне успадкування стійкості до борошнистої роси у інтрогресивних лініях м'якої пшениці. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць, т.21. – Київ: Логос, 2017. – С. 41-46 *(Здобувач виконував експериментальну частину роботи, брав участь у створенні рослинного матеріалу, польовому оцінюванні, аналізі даних та написанні статті)*
26. **Антонюк МЗ**, Єфіменко ТС, Наваліхіна АГ, Терновська ТК Моделювання співвідношень фенотипних класів для ознаки колір стиглої луски у гібридах пшениці інтрогресивного походження. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць, т.21. – Київ: Логос, 2017. – С. 17-22 *(Здобувач виконував частину експерименту, розробляв його дизайн, брав участь у створенні рослинного матеріалу, аналізі даних та написанні статті)*
27. Вдовиченко ЖВ, Терновская ТК, **Антонюк М.З.** 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 *(Здобувачем спільно зі співавторами створювався рослинний матеріал, цитогенетично проаналізовано наявний матеріал та написано статтю)*
28. **Антонюк МЗ**, Терновська ТК. 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: 368–375. *(Здобувачем спільно зі співавтором проаналізовано наявний матеріал та написано статтю)*
29. Терновська ТК, **Антонюк МЗ**, Вдовиченко ЖВ. Генетичний аналіз інтрогресивних ліній м'якої пшениці за остистістю колоса. Наукові записки Тернопільського педуніверситету. Серія біологія; 2007, 4 (34): 80–83. *(Здобувачем створено та проаналізовано рослинний матеріал щодо досліджуваної ознаки, статтю написано спільно зі співавторами)*
30. **Антонюк МЗ**, Маньковська ОС, Бодильова МВ, Терновська ТК. Геномний стрес в інтрогресивних лініях як наслідок дії гаметоцидної хромосоми 4S¹. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць; Київ, Логос, 2009, 6: 28–32. *(Здобувачем створено та проаналізовано рослинний матеріал щодо досліджуваної ознаки, статтю написано спільно зі співавторами)*
31. **Антонюк МЗ**, Бодильова МВ, Терновська ТК. Умови використання мікросателітних локусів як маркерів при інтрогресії генів *Pm* до м'якої пшениці. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць; Київ, Логос, 2010, 9: 3–7. *(Здобувач виконував частину експерименту, розробляв його дизайн, брав участь у створенні рослинного матеріалу, аналізі даних та написанні статті)*
32. Терновська ТК, Єфіменко ТС, **Антонюк МЗ**, Мартиненко ВС. Генетичний контроль морфологічних ознак колосу в інтрогресивних лініях м'якої пшениці. Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. Зб. наукових праць IX з'їзду УТГіС; Київ, Логос, 2012, 3: 175–180.

- (Здобувачем створювався та аналізувався рослинний матеріал щодо досліджуваної ознаки, аналізувалися одержані результати, статтю написано спільно зі співавторами)*
33. **Антонюк МЗ**, Михайлик СЮ, Терновська ТК. Мінливість інтрогресивних ліній м'якої пшениці за електрофоретичними спектрами гліадинів. Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. Зб. наукових праць ІХ з'їзду УТГіС; Київ, Логос, 2012, 4: 13–18. *(Здобувачем було проаналізовано рослинний матеріал щодо досліджуваної ознаки, статтю написано спільно зі співавторами)*
34. Шпильчин ВВ, Рьодер М, Бьорнер А, **Антонюк МЗ**, Терновська ТК. Генетична нестабільність похідних *Triticinae* із штучним геномом. Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. Зб. наукових праць ІХ з'їзду УТГіС; Київ, Логос, 2012,3: 201-205. *(Здобувач працював з рослинним матеріалом, ним було проаналізовано рослинний матеріал щодо досліджуваної ознаки)*
35. **Антонюк МЗ**, Штефюк ТВ, Терновська ТК. Поліморфізм інтрогресивних ліній м'якої пшениці за алелями мікросателітних локусів. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць; Київ, Логос, 2013,12: 97–101. *(Здобувачем створено та проаналізовано рослинний матеріал щодо досліджуваної ознаки, статтю написано спільно зі співавторами)*
36. Терновська ТК, **Антонюк МЗ**, Мартиненко ВС. Гени — промотори остистості у геномах *Triticinae*. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць; Київ, Логос, 2013, 12: 164–168. *(Здобувачем спільно зі співавторами створено та проаналізовано рослинний матеріал щодо досліджуваної ознаки)*
37. Михайлик СЮ, **Антонюк МЗ**, Терновська ТК. Можливі молекулярні механізми мінливості гліадинових генів в інтрогресивних лініях пшениці. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць; Київ, Логос, 2014, 14:62–66. *(Здобувачем створено та проаналізовано рослинний матеріал щодо досліджуваної ознаки, опрацьовано методичні особливості роботи, статтю написано спільно зі співавторами)*
38. Наваліхіна АГ, **Антонюк МЗ**, Терновська ТК. Генетична мінливість інтрогресивних ліній м'якої пшениці за геном бета-амілази. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць; Київ, Логос, 2014. 14: 67–71. *(Здобувачем створювався та аналізувався рослинний матеріал щодо досліджуваної ознаки, сформована структура експерименту, статтю написано спільно зі співавторами)*
39. Штефюк ТВ, **Антонюк МЗ**. Мікросателітний аналіз хромосом 6D та 7D інтрогресивних ліній пшениці, стійких до борошнистої роси. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць; Київ, Логос, 2014, 14: 86–91. *(Здобувачем створювався та було проаналізовано рослинний матеріал щодо стійкості до борошнистої роси, статтю написано зі співавтором)*

40. **Антонюк МЗ**, Терновская ТК. Создание чужеродно-замещенных по хромосомам субгенома D линий мягкой пшеницы. // Матеріали між. конф. "Наукові основи стабілізації виробництва продукції рослинництва" 5–8 липня 1999; Харків, 1999: 126–127.
41. **Antonuyk MZ**, Ternovskaya TK. Development of alien substitution lines of common wheat by "mixing" chromosomes within a subgenome. Abstracts of Mendel Centenary Congress, March 7-10, 2000, Brno, Czech Republic; Votr. Pflanzenzuchtung, 2000, 47: 86.
42. **Антонюк МЗ**, Вдовиченко ЖВ, Терновская ТК. Цитогенетическое изучение линий мягкой пшеницы, устойчивых к мучнистой росе за счет генов *Aegilops sharonensis*. Тез. докл. 11-й Конференции Европейского общества по анеуплоидии пшеницы, 24-28 июля, 2000, Новосибирск, Россия; Новосибирск, 2000: 194–195.
43. Marusik I, **Antonyuk M**, Ternovskaya T. Minimization of volume of alien chromatin in the introgressive common wheat lines. Abstracts of International Symposium "Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources", Yalta, 26-31 May 2002: 12–13.
44. **Antonyuk M**, Bodylyova M, Vdovychenko Zh, Ternovskaya T. SSR-markers of gene for resistance to powdery mildew in the common wheat introgressive lines. Abstracts of Conference for Young Scientists, PhD Students and Students on Molecular Biology and Genetics, September 25–27, 2003, Kiev, Ukraine; Abstract Book, 2003: 3.
45. Vdovychenko Zh, **Antonyuk M**, Ternovskaya T. Influence of gametocidal chromosome 4S¹ on the segregation ratio in genetic analysis of the common wheat lines. Proceedings of the Tenth International Wheat Genetic Symposium, Paestum, Italy, 2003, September, 1–6; 2003: 649–651.
46. **Antonyuk M**, Ternovskaya T, Vdovychenko Zh. Minimization of alien chromatin volume in the introgressive common wheat lines. Proceedings of the Tenth International Wheat Genetic Symposium, Paestum, Italy, 2003, September, 1–6; 2003: 869–871.
47. Ternovskaya T, **Antonyuk M**. Transfer of alien resistance to diseases into common wheat lines by "mixing" alien chromosomes and D wheat chromosomes in one subgenome. Proceedings of the Tenth International Wheat Genetic Symposium, Paestum, Italy, 2003, September, 1–6; 2003: 1272–1274.
48. **Antonyuk M**, Bodylyova M, Ternovska T. Cytogenetical characteristics of the introgressive common wheat lines including and lacking the 4S¹ chromosome. International *Triticeae* Mapping Initiative – COST Action Tritigen Joint Workshop 2009. Clermont-Ferrand, FRANCE August 31th – September 4th 2009. Abstract reference: ITMI2009_006.
49. Prokopyk D, **Antonyuk M**, Ternovska T. Genetic analysis of introgressive common wheat lines for the character awned spike. International *Triticeae* Mapping Initiative – COST Action Tritigen Joint Workshop 2009. Clermont-Ferrand, FRANCE August 31th – September 4th 2009. Abstract reference: ITMI2009_005.

50. **Антонюк М**, Мельниченко Ю, Прокопик Д. Ідентифікація мікросателітного маркера гена промотора остистості у твердої пшениці *Triticum durum* Desf. VI Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів "Молодь і поступ біології": Львів, 21–24 вересня, 2010: 17.
51. Єфіменко ТС, **Антонюк МЗ**. Хромосомна локалізація інтрогресій з геном *Pm* в лініях *Triticum aestivum/Aegilops sharonensis*. VI Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів "Молодь і поступ біології"; Львів, 21–24 вересня, 2010: 54.
52. Prokoryuk D, Melnychenko J, **Ternovska T**, Antonyuk M. SSR-marking of genes that control awnedness in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). Abstracts of 2nd International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources. Bologna, Italy, 24-27 April 2010: 89
53. **Antonyuk M.**, Bodylyova M., Ternovska T. Polymorphism of 3D chromosome SSR-locs among genotypes that are potential recipients of alien resistance gene to powdery mildew (*Pm*) from *Aegilops* species //2nd International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources. Bologna, Italy, 24-27 April 2010: 23.
54. **Antonyuk M**, Iefimenko T, Martynenko V. Genetic control of glume hairiness in common wheat introgressive lines. The 9th Plant Genomics European Meeting, May 4–7, 2011, Istanbul, Turkey, Europe; Abstract book, 2011: 33.
55. **Antonyuk M**, Mankovska O, Ternovska T. Genomic stress in introgression lines of common wheat as a consequence of the action of gametocidal chromosome 4S¹. The 9th Plant Genomics European Meeting, May 4–7, 2011, Istanbul. Turkey, Europe; Abstract book: 37.
56. **Antonyuk M**. Segregation distortion problem in genetic analysis of plant material with alien chromatin introgressions. 9 Plant Genomics European Meetings, 04.05.-07.05, 2011, Istanbul, Turkey; Abstract book, 2011: 34.
57. Єфіменко Т, **Антонюк М**, Терновська Т. Успадкування морфологічних ознак луски у інтрогресивних ліній м'якої пшениці. Перша конференція молодих вчених «Біологія рослини та біотехнологія», 5–7 жовтня 2011; Біла Церква, Україна, 2011: 52.
58. Маньковська О, Терновська Т, **Антонюк М**. Цитогенетична характеристика стійких до борошністої роси ліній пшениці з хромосомою 4S^{sh} та без неї і гібридів за їхньою участю. Перша конференція молодих вчених «Біологія рослини та біотехнологія», 5–7 жовтня 2011; Біла Церква, Україна, 2011: 53.
59. Михайлик С, **Антонюк М**, Терновська Т. Внутрішньолінійна мінливість гліадинових спектрів в інтрогресивних лініях м'якої пшениці як наслідок нестабільності генома. Перша конференція молодих вчених «Біологія рослини та біотехнологія», 5–7 жовтня 2011; Біла Церква, Україна, 2011: 55.
60. Iefimenko T, **Antonyuk M**, Ternovska T. Inheritance of morphological traits of glume in the introgressive common wheat lines. The 4th International IMBIG Conference for Young Scientists "Molecular Biology: Advances and Perspectives"; Abstract book, Kyiv, 2011: 88.

61. Mankovska O., Ternovska T., **Antonyuk M.** Cytogenetic characteristic of powdery mildew resistance wheat lines, carrying chromosome 4S^{sh} or not. The 4th International IMBIG Conference for Young Scientists “Molecular Biology: Advances and Perspectives”; Abstract book, Kyiv, 2011: 89.
62. Терновська ТК, Шпильчин В, **Антонюк МЗ.** Феномен генетичної нестабільності інтрогресивних ліній та амфідиплоїдів пшениці. Abstracts of the International Scientific Conference “Breeding and Genetics of Agrocltural Crops: Traditions and Prospects”, October 17-19th, 2012, Odesa, Ukraine; Одеса: 197–198.
63. **Antonyuk M.**, Ternovska T. Common wheat genomic and chromosomal engineering for usage of genetic resistance potential of its wild relatives. Disease Risk and Food Security. Proceedings of the 13th International Cereal Rust and Powdery Mildews Conference. 28 Aug. – 1 Sep. — 2012; Beijing; China: 151–152.
64. **Антонюк МЗ**, Єфіменко ТС, Мартиненко ВС, Терновська ТК. Створення ліній м'якої пшениці з генетичним матеріалом від *Aegilops mutica*. Abstracts of the International Scientific Conference “Breeding and Genetics of Agrocltural Crops: Traditions and Prospects”. October 17-19th, 2012, Odesa, Ukraine; Одеса: 123–124.
65. Iefimenko T, **Antonyuk M.**, Ternovska T Development of introgressive lines *Triticum aestivum* / *Aegilops mutica* resistant to powdery mildew by the method of chromosome mixing. Disease Risk and Food Security. Proceedings of the 13th International Cereal Rust and Powdery Mildews Conference 28 Aug. – 1 Sep., 2012; Beijing; China: 154–155.
66. Tetiana Shtefiuk, Serhii Mykhailyk, **Maksym Antonyuk**, Tamara Ternovska. Applplication of RGAP technique for genotype screening of introgressive wheat lines resistant to powdery mildew. Proceedings 13th International Wheat Genetics Symposium April 23-28, 2017. Tulln, Austria. Poster Presentation. P. 244.
67. Serhii Mykhailyk, **Maksym Antonyuk**, Tetiana Shtefiuk / Identification and analysis of wheat TaMSH7 gene promoter region. Proceedings 13th International Wheat Genetics Symposium April 23-28, 2017. Tulln, Austria. Oral Presentation p. 84.

АНОТАЦІЯ

Антонюк М.З. Інтрогресія як індуктор мінливості геному пшениці *Triticum aestivum* L. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеню доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ, 2019.

Роботу присвячено вирішенню питання, чи можуть включення чужинного хроматину (інтрогресії) до стабільного консолідованого геному викликати (епі)генетичні зміни у резидентному геномі. Дослідження виконано на лініях пшениці м'якої з інтрогресіями від трьох видів егілопсу. Показано, що

перманентна фенотипна нестабільність деяких з них за ознаками морфології та молекулярного фенотипу (електрофоретичні спектри білків та ПЛР-апліконів) пов'язана з (епі)генетичною нестабільністю цитологічно стабільних гексаплоїдних ліній. На експериментальних моделях, гліадинових спектрах інтрогресивних ліній та спектрах бета-амілази, доведено, що фенотипні зміни викликаються змінами у нуклеотидних послідовностях генів через рух ретротранспозонів та експансію мікросателітних повторів. Генетичний аналіз інтрогресивних ліній за деякими ознаками привів до ідентифікації нових генів чужинного походження. Головним його результатом стало доведення необхідності характеризувати компоненти схрещування та гібриди F_1 за картиною поведінки хромосом в мейозі. Без цієї інформації не можна побудувати адекватну модель успадкування ознаки.

Ключові слова: пшеничні амфідиплоїди, інтрогресивні лінії, пшениця м'яка, егілопси, нестабільність генома, епігенетичні механізми мінливості.

АННОТАЦІЯ

Антонюк М.З. Интрогрессия как индуктор изменчивости генома пшеницы *Triticum aestivum* L. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.15 – генетика. – Государственное учреждение «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев, 2019.

Работа посвящена решению вопроса, могут ли включения чужеродного хроматина (интрогрессии) в стабильный консолидированный геном вызвать (эпи)генетические изменения в резидентном геноме. Исследование выполнено на линиях пшеницы мягкой с интрогрессиями от трех видов эгилопса. Показано, что перманентная фенотипическая нестабильность некоторых из них по признакам морфологии и молекулярного фенотипа (электрофоретические спектры белков и ПЦР-апликонов) связана с (эпи)генетической нестабильностью цитологически стабильных гексаплоидных линий. На экспериментальных моделях: гліадинові спектри інтрогресивних ліній і спектри бета-амілази, доведено, що фенотипічні зміни викликаються змінами в нуклеотидних послідовностях генів из-за движения ретротранспозонов и экспансии микросателлитных повторов. Генетичний аналіз інтрогресивних ліній по некоторым признакам привел к идентификации новых генів чужеродного происхождения. Главным его результатом стало доказательство необходимости характеризовать компоненты скрещивания и гибриды F_1 по картине поведения хромосом в мейозе. Без такой информации нельзя построить адекватную модель наследования признака.

Ключевые слова: пшеничные амфидиплоиды, интрогрессивные линии, пшеница мягкая, эгилопсы, нестабильность генома, эпигенетические механизмы изменчивости.

SUMMARY

Antonyuk M.Z. Introgression as inductor of wheat *Triticum aestivum* L. genome variability – Manuscript.

Thesis for Doctor of science degree by speciality 03.00.15 – Genetics. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

The work is dedicated to solving the question if alien chromatin inclusions (introgressions) to a stable consolidated genome can cause (epi)genetic changes in the resident genome. The research was performed on common wheat introgressive lines, derived from the cross of common wheat cultivar Aurora *Triticum aestivum* (AABBDD) (♂) with wheat-Aegilops artificially developed genome substituted amphidiploids with genome structure AABBXX. In amphidiploids AABB is tetraploid component of Aurora genome, and XX subgenome is a genome of species *Aegilops speltoides* (SS) in Auroides, *Ae. sharonensis* (S^{sh}S^{sh}) in Auroides, and *Ae. umbellulata* (UU) in Aurolata. The lines were developed and characterized for homeological identity of their introgressions of different amount and quality in the 90's. During some time of observation, it became obvious that beside stable lines, that demonstrated the same characteristics from generation to generation, there were also lines that were permanently changing for one or several traits, while remaining 42-chromosome. The assumption was made that their phenotypic instability was correlated with processes occurring in their genomes, and which were triggered by the hybrid nature of the genomes. Introgressive lines, both stable and variable, were studied for their karyotypes, and no difference among two groups of lines was identified. The lines were studied using biochemical (genes of storage proteins and enzymes), morphological (presence/absence of awns, mature glume color, spike shape, glume rigidity, pit on the glume base, glume hairiness) traits, and spectra of PCR products obtained with primers to transposons and SSR loci, specific to chromosomes of particular homeological group or chromosome specific. Comparative study of electrophoretic spectra of proteins and PCR products has shown that variability observed in generations of amphidiploids and introgressive lines is an integral feature of wheat plants with genomes of hybrid origin, and (epi)genetic changes occurring in hybrid genomes are the basis of this variability. This was demonstrated on two models: changes in gliadin spectra of introgressive lines and beta-amylase spectra are accompanied by changes in nucleotide sequences of genes. These changes can be caused by transposon activity, which can be localized directly in the gene (β -Amy), or in the intergenic region (*Gli*); and also by expansion of microsatellite repeats coding Glutamine (*Gli*). The main question of this research is: what is the real cause of this burst of variability observed in progenies of hybrid genomes: the presence of alien chromatin in their genomes, which is directly involved in the control of traits that we consider introgressed, or whether the changes arise in the chromatin of the resident genome. This question should be answered in favor of the latter assumption. Stability of the resident genome is disturbed by the molecular processes, which are triggered by the bringing together of different constant consolidated genomes in one hybrid genome. This mechanism of variability

increase in introgressive progeny has great potential, as variability of plants of introgressive origin goes beyond the limits defined by the output genomes.

Genetic analysis of introgressive lines for the trait of leaf sheath edge hairiness, presence awns, mature glume color, and powdery mildew resistance, led to the determination of genetic control of these traits in introgressive lines with alien genes, and identification of new genes: *Hs-S^{sh}*, *Awn1*, *Bg2*, introduced to the genomes of wheat lines from *Aegilops* species. The main result of this part of the research is the opinion that genetic analysis of introgressive lines does not give adequate results without careful study of cross components as to their genome structures, and hybrids of different populations – regarding features of transmission of the studied traits to their progeny in connection with this structure. For modeling of patterns of inheritance in terms of ratios of volumes of phenotypic classes, it is very important to have information about possibilities of formation of aneuploid gametes with reduced functionality and zygotes with limited viability, variability of progeny viability in segregating populations on different stages of ontogenesis. This information can be obtained through interpretation of chromosome configurations in M1 PMC of F₁ hybrid. Development of an adequate model of inheritance requires performance of diallel crossings, and their results will serve to cross-check the model's accuracy.

Keywords: wheat amphidiploids, introgressive lines, common wheat, goat-grasses, genome instability, epigenetic mechanisms of variability