

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ «КИЄВО-МОГИЛЯНСЬКА АКАДЕМІЯ»
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ
НАН УКРАЇНИ»

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

АНТОНЮК МАКСИМ ЗИНОВІЙОВИЧ

УДК 631.523:581.13

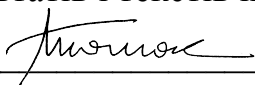
ДИСЕРТАЦІЯ
ІНТРОГРЕСІЯ ЯК ІНДУКТОР МІНЛИВОСТІ ГЕНОМУ ПШЕНИЦІ
TRITICUM AESTIVUM L.

03.00.15. «Генетика»

біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 _____ Антонюк М.З.

Науковий консультант Терновська Тамара Костянтинівна, доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри біології Національного університету «Києво-Могилянська академія» МОН України

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика – Національний університет «Києво-Могилянська академія» МОН України. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ, 2019.

В дисертаційному дослідженні на великому експериментальному матеріалі з залученням пшенично-егілопсних геномно-заміщених амфідиплоїдів та отриманих з їхнім використанням інтрогресивних ліній пшениці м'якої доведено, що отримання гібридного геному, яке передуює створенню інтрогресивних ліній, запускає процес дестабілізації знову створеного геному, який не є функцією обсягу чужинного хроматину, а забезпечується конкретними, специфічними молекулярними процесами, що ініціюються у незбалансованому геномі. Отримані результати покладені в основу концепції, сформульованої нами в результаті узагальнення отриманих експериментальних даних: 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 хроматину.

Дослідження виконано на інтрогресивних лініях пшениці м'якої, отриманих від схрещування сорту пшениці м'якої Аврора *Triticum aestivum* (AABBDD) (♂) з пшенично-егілопсними штучно створеними геномно-заміщеними амфідиплоїдами з геномною структурою AABBXX (♀). В амфідиплоїдах AABB є однойменним тетраплоїдним компонентом геному Аврори, а субгеном XX є геномом виду *Aegilops speltoides* (SS) у Авродеса, *Ae. sharonensis* (S^{sh}S^{sh}) у Аврозиса та *Ae. umbellulata* (UU) у Авролати. Лінії було створено та охарактеризовано щодо гомеологічної належності інтрогресій різного обсягу та якості у 90-роках. Протягом певного часу стало очевидним,

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, залишаючись 42-хромосомними. Було висловлено припущення, що їхня фенотипна нестабільність пов'язана з процесами, які відбуваються в їхньому геномі та були запуснені свого часу гібридною природою геномів. Лінії, фенотипно як стабільні, так і мінливі, було вивчено щодо каріотипу, і різниці між двома множинами ліній знайдено не було. Лінії вивчено з використанням ознак біохімічних (гени запасних білків та ферментів), морфологічних (остистість, колір зрілої колоскової луски, форма колосу, жорсткість колоскової луски, вдавненість на основі луски, опушення луски) та спектрів компонентів ПЛР з праймерами до транспозонів та мікросателітних локусів, специфічних до певних гомеологічних груп хромосом чи специфічних хромосом. Порівняльне вивчення електрофоретичних спектрів білків та ПЛР-ампліконів показало, що та мінливість, яку спостерігаємо у генераціях амфідиплоїдів та інтрогресивних ліній, є невід'ємною особливістю пшеничних рослин з геномом гібридного походження, та має своїм підґрунтям (епі)генетичні зміни, що відбуваються у такому геномі. Це доведено на двох досліджених моделях: зміни у гліадинових спектрах інтрогресивних ліній та спектрах бета-амілази супроводжуються змінами у нуклеотидних послідовностях генів. Ці зміни можуть викликатися рухом транспозонів, локалізованих як у гені безпосередньо (β -*Amy*), так і у міжгенному просторі (*Gli*), та експансією мікросателітних повторів, що кодують глютамін (*Gli*).

Головне питання, яке виникло за результатами виконаного дослідження, – що саме насправді є причиною вибуху мінливості, яка спостерігається серед нащадків гібридних геномів: наявність в них чужинного хроматину, що забезпечує прояв у гібридних нащадків таких градацій ознак, які були характерними для виду-джерелу інтрогресії, чи зміни виникають у хроматині резидентного геному також, оскільки його стабільність порушується молекулярними процесами, які запускаються при зведенні різних сталих, консолідованих геномів у спільний гібридний геном. За результатами

виконаного дослідження, цей останній механізм збільшення мінливості у інтрогресивних нащадків не можна відкинути хоча б через те, що мінливість рослин інтрогресивного походження і за результатами виконаного досліджень, і за літературними даними, 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. Звідси випливає, що порушення консолідованості геному, яке викликається внесенням до нього чужинного хроматину навіть якщо він і не зберігається, може спричинювати (епі)генетичні події, які зумовлюють зміну градацій ознак морфології, фізіології, молекулярного фенотипу.

Інтрогресивні лінії широко використовуються у генетичному аналізі пшениці м'якої тому, що дають змогу збільшити поліморфізм у виразі ознак та отримати його там, де його немає при застосуванням нативних генотипів пшениці м'якої. В даному дослідженні інтрогресивні лінії було залучено для встановлення генетичного контролю ознак опушення краю листкової піхви, остистість колосу, забарвлення зрілої колоскової луски, стійкість до борошнистої роси. Використовували метод гібридологічного аналізу з отриманням та фенотипною оцінкою гібридних популяцій F_1 , F_2 та F_3 . За обсягами фенотипних класів у популяціях, що розщеплюються, встановлювали кількість генів, що беруть участь у контролі цільової ознаки. Для визначення хромосомної локалізації таких генів використовували мікросателітний аналіз, вивчення нащадків за біохімічними та деякими морфологічними генами, що маркують специфічні хромосоми пшениці м'якої. Для жодної з чотирьох ознак, що їхній генетичний контроль вивчався з залученням інтрогресивних ліній – носіїв контрастних (у порівнянні з рекурентним сортом пшениці м'якої Аврора) градацій ознак кількість критичних генів не вдалось встановити тільки на підставі співвідношень розщеплення у популяціях F_2 та F_3 без урахування інформації про структуру геному інтрогресивної лінії. Доведено, що для адекватного аналізу отриманих результатів за фенотипним розщепленням

потрібно знати, чи утворює хромосома, в якій локалізований цільовий ген, бівалент з гом(е)ологом у мейозі гібрида F_1 . Критичність цієї інформації було доведено при вивченні генетичного контролю ознак остистість колосу, забарвлення зрілої луски, стійкість до борошнистої роси. При вивченні успадкування стійкості до борошнистої роси доведено, що відсутність кон'югації хромосом у $M1$ мейозу гібрида F_1 між зразками – носіями контрастних фенотипів впливає на картину розщеплення навіть в тому випадку, коли ген стійкості розташований не в тих хромосомах, які не утворюють бівалент у мейозі. Це пов'язано з формуванням нефункціональних гамет та зигот зі зниженою життєздатністю, що не може не впливати на картину розщеплення у популяціях, що оцінюються. При вивченні успадкування ознаки опушення краю листової піхви встановлено, що обсяги класів з контрастними фенотипами, на підставі співвідношення між якими визначається кількість генів, що беруть участь у розщепленні, залежать від стадії онтогенетичного розвитку, на якій виконується оцінка рослин. На тій самій ознаці було показано, що локалізація критичного гена у гаметоцидній хромосомі принципово змінює всю картину розщеплення та унеможливорює отримання адекватного результату щодо кількості генів, що контролюють досліджувану ознаку, без врахування особливостей поведінки гаметоцидних хромосом у нащадках гемізиготних за такою хромосомою гібридів. можуть Результати дослідження генетичного контролю забарвлення зрілої луски дали змогу висунути припущення про можливу втрату чужинного хроматину, до складу якого входить критичний ген при формуванні популяцій, що розщеплюються. Одним з механізмів такої втрати може бути мейотичний драйв, якщо у якості пари альтернативних станів генотипу розглядати наявність/відсутність чужинного хроматину. Втрату чужинної ознаки у популяціях, які розщеплюються, показано при вивченні ознаки стійкості до борошнистої роси. Механізмом такої втрати може бути як звичайна втрата чужинного хроматину, так і більш складні молекулярно-генетичні події на рівні регуляції експресії генів та взаємодії їхніх білкових продуктів.

За результатами виконаного генетичного аналізу знайдено нові гени інтрогресивного походження, які увійшли до складу геному інтрогресивних ліній: ген опушення краю листкової піхви *Hs-S^{sh}* з геному Аврозису, алелі гена зернової кислої фосфатази *Acph-1*, специфічні до видів егілопсів, що увійшли до складу геному геномно-заміщених амфідиплоїдів, ген – промотор остистості колосу *awn1* у хромосомах 6-ої гомеологічної групи Аврозису та Авролати, гени ортологічної серії *Rg* у складі хромосом 1S, 1U, 1S^{sh} або їхніх транслокацій на пшеничні хромосоми, ген *Bg2* чорного забарвлення луски в хромосомі 5U Авролати.

Наукова новизна. 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, притаманній 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. Структура геному інтрогресивних ліній відрізняється від такої реципієнтного геному Аврори не лише включенням різного обсягу чужинного хроматину. Зміни (мутації у самому широкому сенсі) торкаються пшеничного хроматину і це вперше доведено на генах гліадинового кластера, гені бета-амілази, гені *B1* – інгібіторі остистості пшениці м'якої. 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. Показано вперше, що певні, односпрямовані мутації у пшеничному геномі ліній інтрогресивного походження викликаються рухом транспозонів Sukkula

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

Практична значущість. 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. Для збільшення мінливості пшеничного геному не має значення, чи визначається це збільшення привнесенням чужинного хроматину, чи власний пшеничний хроматин 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. 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. 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.

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

Список публікацій 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 борошністої 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 борошністої 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 *Rt* 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 ІХ 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; Vortr. 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. Prokopyk 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 борошнистої 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 Agroicultural 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 Agroicultural 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. Application 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.

SUMMARY

Antonyuk M.Z. Introgression as inductor of wheat *Triticum aestivum* L. genome variability – Qualification study with the rights of manuscript.

A thesis submitted to acquire the degree of Doctor of Science in Biology by speciality 03.00.15 – genetics – National University “Kyiv-Mohyla Academy” MES of Ukraine – «Institute of food biotechnology and genomics of National Academy of Sciences of Ukraine», Kyiv, 2019.

The thesis is aimed at investigation of a number of wheat-Aegilops genome-substituted amphidiploids as well as introgression common wheat lines obtained on their basis. It was proven that formation of a hybrid genome, which is necessary for development of the introgression wheat lines, initiates destabilization process of a newly formed genome. The destabilization process is not a function of the amount of alien chromatin. It is provided by the specific molecular processes, that are initiated in an unbalanced genome. The obtained experimental data and results allowed the author to formulate the following concept: wide-cross hybridization facilitates gene pool expansion of common wheat not only through gene introgression, but also through initiation of molecular mechanisms, which provide genetic variability using own wheat chromatin.

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 Aurodes, *Ae. sharonensis* (S^{sh}S^{sh}) in Aurosis, 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 movement, 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, aroused as a result of the present study is what was the reason of variability explosion observed among descents of the hybrid genomes, i.e. it might be the presence of alien chromatin providing manifestation of trait gradations typical for the species, which was a source of the introgression, in hybrid descents. Alternatively, the changes can be started in chromatin of the residence genome as well since its stability is altered by molecular processes, initiated during integration of different stable consolidated genomes in a common hybrid genome. According to results of the present study, the latter mechanism of the increasing variability in hybrid descents cannot be excluded since variability of introgression plants according to both literature data and the obtained experimental results is often wider than variation of the initial parental genomes. Variability, which was observed in

gliadin and β -amylase genes, was not associated with transfer of alien alleles. New alleles appeared due to mutations in wheat genes caused by transposon mobilization. Therefore, destruction of the genome consolidation associated with alien chromatin introgression even in the case when it is not maintained, can cause (epi)genetic events, which result in changes of morphological and physiological traits as well as traits of a molecular phenotype.

Introgression lines are widely used in genetic analysis of common wheat due to a possibility to increase polymorphism in trait manifestation and to get it in the case of its absence in common wheat. The present research uses introgression lines for revealing genetic control of the following traits: leaf sheath hearing, ear awn manifestation, mature ear glume color, and powdery mildew resistance. The method of crossing analysis with getting and phenotype estimation of hybrid populations F_1 , F_2 , and F_3 was used. The number of genes, taking part in the control of a target trait, were revealed as for number of phenotypic classes in segregation populations. To reveal chromosome localization of these genes the following methods were used: microsatellite analysis, investigation of descents as for biochemical and morphological trait genes, which are markers of specific chromosomes of common wheat. It was shown that for four traits, where genetic control was studied using introgressive lines carrying contrast trait gradations (as compared to recurrent variety of common wheat Aurora), the number of critical genes could not be revealed taking into account just segregation ratios in F_2 and F_3 populations. In this case, information about structure of the introgressive line genome must be taken into consideration. It was shown that for the adequate analysis of the obtained results according to phenotype segregation, information whether the chromosome carrying the target gene forms bivalent with homo(e)ologue in meiosis of F_1 hybrids is necessary. This information is crucial. That was proven during investigation of genetic control of the following traits: presence/absence of awns, mature ear glume color, and powdery mildew resistance.

Investigation of inheritance of powdery mildew resistance revealed that absence of chromosome pairing in M1 meiosis of hybrid F_1 between the plants with

contrast genotypes influences segregation even in the case when the gene of resistance is located in the other chromosomes than those which don't form a bivalent in meiosis. This is associated with abnormal gametes and zygotes with the decreased fertility formation, which cannot but influences segregation in the estimated populations. Investigation of inheritance of leaf sheath hearing trait revealed that size of contrast phenotype classes ratio, which determines the number of genes taking part in the control of the trait, depends on ontogenesis stage when the plant estimation takes place. Investigation of the same trait revealed that critical gene localization in a gametocidal chromosome influences segregation crucially and makes it impossible getting an adequate results as for the number of genes, which control the trait under investigation. Special features of the gametocidal chromosomes behavior in descents of hybrids that are hemizygote for this chromosome must be taken into consideration. Investigation of genetic control of mature glume color allowed us to predict possible loss of alien chromatin containing critical gene under formation of segregant populations. One of the mechanisms of this loss can be meiotic drive as for presence/absence of alien chromatin as an alternative stage. Loss of the alien trait in the segregant populations was demonstrated under investigation of powdery mildew resistance. The mechanism of this loss can be associated with either ordinary loss of the alien chromatin or with more complicated molecular-genetic events at the stage of regulation of gene expression and interaction of their protein products. The results of the genetic analysis revealed new introgressive genes in the genome of introgressive lines, i.e. leaf sheath hearing gene *Hs-S^{sh}* from Aurosis genome; alleles of the seed acid phosphatase *Acph-1* gene, that were specific for *Aegilops* species, which were parts of the genome-substituted amphidiploids genome; gene-promotor of presence of awns - *awn1* in chromosomes of 6th homoeological group of Aurosis and Aurolata; genes of orthological *Rg* gene series in either 1S, 1U, 1S^{sh} chromosomes or their translocations to wheat chromosomes; gene *Bg2* of black glume color in 5U chromosome of Aurolata.

Novelty statement. Investigation of wheat-*Aegilops* alien-substitution and alien-added amphidiploid and a number of introgression lines from these

amphidiploids for the first time revealed permanent, one-directional, and non-reciprocal variation between generations. Permanence means that change in one trait gradation for the other is not stopped until disappearance of the initial morphotype. Unidirectionality means that gradation of the trait, which is typical for *Aegilops* (amphidiploid), is changed by gradation, which is typical for wheat cultivars. Variation in the reverse direction was not observed. Permanence and unidirectionality of changes indicate nonrandom and invariant molecular mechanisms action, which initiate the changes. The structure of the introgression lines genome differs from those of the recipient Aurora genome not only with respect to segments of alien chromatin. Changes (mutations in a wide sense) are associated with wheat chromatin. That was shown for the first time for gliadin cluster genes, β -amylase gene, *BI*-gene – inhibitor of awn presence of common wheat. Disappearance of the spectrum components that are typical for the components of the initial crossing during getting introgression lines, as well as appearance of the new ones, which is not typical for any of them, is a crucial special feature of variation of electrophoretic spectra of all the investigated proteins and amplicon spectra obtained with SSR-primers as well. It was demonstrated for the first time that unidirectional mutations in wheat genome of the introgression lines have been caused by Sukkula transposon mobilization (gliadin genes), MITE (β -amylase gene) and expansion of three-nucleotide repeats CAA and CAG (Glutamine codons) in gliadin genes. Wheat *BI* gene loses its functionality due to certain re-arrangements in the corresponding region 5AL arm, which are registered using microsatellite analysis, and take place in Aurodes and Aurolata introgression lines derivatives. Several new Triticinae genes were identified, i.e. *Hs-S^{sh}* gene on 4S^{sh} chromosome, *Awn1*promotor genes on 1U and 1S^{sh} chromosomes, *Bg2* gene on 5U chromosome.

Practical relevance. Any analysis of introgression lines assumes their precise investigation as for structure of the genome as or presence and homoeological belonging of alien chromatin. A priori without relevant proves, we cannot be sure that the introgression line has alien chromatin within its genome just because of difference in phenotype between the line and the recipient crossing component.

Introgressive hybridization itself is not a mutagenic factor. It facilitates expansion of (epi)genetic variation, which can be wider than the parental genotypes before hybrid stress influence. Models of inheritance, which are developed for transmission and gene functioning explanation in introgression wheat line genomes controlling traits under investigation, should take into consideration some characteristics of these lines: fertility, phenotype and cytological stability, size and homoeological belonging of introgressions. Quality of the model is significantly increased in the case of cycling crossing schemes, investigation of individual plants and their individual descent, thorough analysis of plant survival during ontogenesis as well as estimation of their fertility. Introgression wheat lines as well as the traits, which differ from the recipient wheat cultivar, make an attractive model for investigation of genetic and epigenetic variability mechanisms and formation of trait gradations in cultivated wheat that differ from those of its wild relatives.

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

ЗМІСТ

	Стор.
ВСТУП_____	29
РОЗДІЛ 1. ІНТРОГРЕСИВНА ГІБРИДИЗАЦІЯ ЯК ФАКТОР ШТУЧНОГО РОЗШИРЕННЯ ГЕНЕТИЧНОГО ПУЛУ ПШЕНИЦІ ТА РОЛЬ (ЕПІ)ГЕНЕТИЧНИХ МЕХАНІЗМІВ У ЗБІЛЬШЕННІ МІНЛИВОСТІ ЇЇ ГЕНОМУ (огляд літератури)_____	40
1.1. Геномний шок, що викликається об'єднанням геномів, та феномен його подолання_____	41
1.1.1. Зміни у нуклеотидних послідовностях, що супроводжують об'єднання геномів_____	41
1.1.2. Експресія генів у геномі гібридного походження_____	43
1.1.3. Механізми генетичних та епігенетичних змін у геномі гібридного походження_____	48
1.1.3.1. Генетична рекомбінація та мутагенез_____	49
1.1.3.2. Участь некодуючих РНК у епігенетичних змінах_____	54
1.1.3.3. Метилування ДНК та модифікація гістонів_____	57
1.1.3.4. Роль транспозонів у організації мінливості геному_____	61
1.2. Інтрогресивна гібридизація як чинник штучного розширення генетичного пулу пшениці_____	65
1.2.1. Види <i>Triticeae</i> , що використовуються як джерело інтрогресій_____	66
1.2.2. Розмаїття інтрогресивних ліній пшениці м'якої_____	68
1.2.2.1. Чужинно-додані та чужинно-заміщенні лінії_____	68
1.2.2.2. Синтетичні гексаплоїдні пшениці як проміжні форми_____	79
1.2.2.3. Лінії з транслокаціями_____	81
1.2.2.4. Рекомбінантні лінії_____	88
1.2.3. Дослідження структури геному ліній інтрогресивного походження_____	95
1.2.4. Інтрогресивна гібридизація як індуктор мінливості_____	102

	25
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	118
2.1. Рослинний матеріал	118
2.2. Методи дослідження	121
2.2.1. Методика гібридизації	121
2.2.2. Методика оцінки ознак	121
2.2.3. Методи цитологічних досліджень	123
2.2.4. Методи роботи з білками	125
2.2.5. Методи роботи з ДНК	129
2.2.6. Методи статистичної обробки даних	133
РОЗДІЛ 3. ЦИТОЛОГІЧНА СТАБІЛЬНІСТЬ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ	135
3.1. Мінливість ліній за кількістю хромосом	135
3.2. Картина кон'югації хромосом у М1 МКП ліній	145
РОЗДІЛ 4. СТРУКТУРА ГЕНОМУ ЛІНІЙ ВІДНОСНО РЕКУРРЕНТНОГО ГЕНОМУ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЩОДО ІНТРОГРЕСІЙ	151
4.1. Визначення геномної структури через вивчення хромосомних конфігурацій у М1 МКП гібридів	151
4.1.1. Вивчення гібридів інтрогресивних ліній – похідних Аврозису	153
4.1.2. Особливості перебігу мейозу у гібридах F ₁ від схрещування інтрогресивних ліній – похідних Аврозису	158
4.1.3. Особливості перебігу мейозу у гібридах F ₁ від схрещування інтрогресивних ліній – похідних Авродесу та Авролати	160
4.2. Визначення гомеологічної належності чужинного хроматину за допомогою генів морфологічних ознак	162
4.2.1. Характеристика інтрогресивних ліній за морфологічними ознаками	162
4.2.2. Хромосомна локалізація гена, що контролює опушення краю листкової піхви	167
4.3. Використання біохімічних маркерів хромосом для встановлення гомеологічної належності хроматину	171

	26
4.3.1. Перевірка хромосоמו-специфічної компетентності гена <i>Asph-1</i>	171
4.3.2. Скринування остистих інтрогресивних ліній на гомеологічну належність інтрогресій	173
4.3.3. Скринування ліній Авродесу, стійких до борошнистої роси, з застосуванням хромосомно-специфічних маркерів	185
4.4. Використання мікросателітних маркерів хромосом для вивчення структури геному інтрогресивних ліній	189
4.4.1. Структура геному інтрогресивних ліній <i>Triticum aestivum</i> / <i>Aegilops sharonensis</i>	189
4.4.2. Мікросателітний аналіз інтрогресивних ліній, стійких до борошнистої роси	197
РОЗДІЛ 5. ГЕНЕТИЧНА НЕСТАБІЛЬНІСТЬ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ	225
5.1. Результати вивчення ліній за ознаками морфології колоса	225
5.2. Мінливість інтрогресивних ліній за електрофоретичними спектрами деяких білків	228
5.3. Вивчення мінливості гліадинових спектрів	236
5.3.1. Результати вивчення гліадинових спектрів інтрогресивних ліній різних генерацій	236
5.3.2. Молекулярна структура гліадинових генів за даними літератури	242
5.3.3. Порівняння спектрів ампліфікації мікросателітних компонентів гліадинових генів інтрогресивних ліній	248
5.3.4. Порівняння сиквенсів фрагментів ДНК, отриманих з поліморфних ампліконів	251
5.3.5. Аналіз інтрогресивних ліній з використанням методу REMAP	258
5.4. Потенціал гаметоцидної хромосоми 4S ^{sh} як індуктора генетичної мінливості	265
5.4.1. Оцінка жорсткості дії гаметоцидної хромосоми 4S ^{sh}	266
5.4.2. Мінливість за спектром бета-амілази у середині інтрогресивних ліній	274
5.4.3. Генетичний аналіз ліній за генами β -Amy	278

5.4.3.1. Аналіз групи гібридів, отриманих без участі ліній з гаметоцидною хромосомою за геном β -Amy-D1_____	279
5.4.3.2. Аналіз групи гібридів, отриманих без участі ліній з гаметоцидною хромосомою за геном β -Amy-A1_____	281
5.4.3.3. Аналіз групи гібридів, у походженні яких брала участь лінія з 4S ^{sh} за геном β -Amy-D1_____	282
5.4.3.4. Аналіз групи гібридів, у походженні яких брала участь лінія з 4S ^{sh} за геном β -Amy-A1_____	286
5.5. Природа мінливості гена бета-амілази в інтрогресивних лініях м'якої пшениці_____	290
РОЗДІЛ 6. ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ ЗА	
МАРКЕРНИМИ ОЗНАКАМИ_____	
6.1. Ознака опушення краю листової піхви_____	309
6.1.1. Гаметоцидна хромосома як фактор спотворення співвідношень фенотипних класів при розщепленні_____	311
6.1.2. Життєздатність зигот як фактор, що впливає на картину фенотипного розщеплення у популяціях F ₂ _____	323
6.2. Ознака остистість колосу_____	333
6.2.1. Генетичний контроль утворення остей у <i>T. durum</i> _____	334
6.2.2. Генетичний аналіз інтрогресивних ліній за остистістю колосу. Лінії – похідні Аврозису_____	349
6.2.3. Генетичний аналіз інтрогресивних ліній за остистістю колосу. Лінії – похідні Авролати_____	356
6.3. Генетичний аналіз ліній за ознакою забарвлення зрілої луски_____	369
6.4. Ознака стійкість до борошністої роси_____	383
6.4.1. Сучасний стан проблеми щодо генетики стійкості до борошністої роси пшениці_____	383
6.4.2. Оцінка інтрогресивних ліній за стійкістю до борошністої роси_____	385
6.4.3. Гібридологічний аналіз ліній – похідних Аврозису_____	388

6.4.4. Успадкування гібридами стійкості до борошнистої роси у комбінаціях схрещування за участю інтрогресивних ліній різного походження _____	395
РОЗДІЛ 7. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ _____	410
РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО РОБОТИ З ІНТРОГРЕСИВНИМ МАТЕРІАЛОМ	
ПШЕНИЦІ _____	434
ВИСНОВКИ _____	436
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ _____	440
ДОДАТОК 1. ПЕРЕЛІК І ПОСЛІДОВНОСТІ ПРАЙМЕРІВ, ЩО ФЛАНКУЮТЬ МІКРОСАТЕЛІТНІ ПОВТОРИ У ГЛІАДИНОВИХ ГЕНАХ _____	538
ДОДАТОК 2. СПИСОК ОПРИЛЮДНЕНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ _____	540

ВСТУП

Актуальність теми. Інтрогресія – це внесення чужинного генетичного матеріалу у геном реципієнтного організму. Обсяг інтрогресії може бути будь-який – від цілого геному, і тоді мова йде про створення штучного амфідиплоїда. До окремого гена з утворенням організму, який на сучасній мові називається трансгеним. 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 пшеницю 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 [741]. У наступні 60 років можна було спостерігати як хвиля робіт з інтрогресивної гібридизації зростала [253,264,390,311,524,608,743,912], досягла свого піку десь у 80-тих роках, помітно впала наприкінці сторіччя і знов пішла до гори в останні 15 років [156,159,160,167,198,200,310,523,605,612,637,696]. 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» [156,198,579]. Що стосується підвищення стійкості до абіотичних стресів [311,610,696] та покращення якості продукції [682,886] 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 [610,696]. 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.

Виникнення та розвиток концепції регуляторних генних мереж та їхнього значення для експресії ознак, які визнані комплексними щодо їхнього генетичного контролю, допомогло зрозуміти, в чому полягає обмеженість у залученні чужинних генів до консолідованого геному пшениці саме для таких ознак [275,281,732]. Левова частка ознак, які бажаємо покращити, є результатом експресії великої кількості генів. Взаємодія між цими генами, яка відбувається на білок-білковому та білок-ДНКовому рівнях, формувалася протягом тривалого еволюційного розвитку. І будь-яке втручання у загальну картину молекулярних взаємодій, а це відбувається обов'язково при спробах замінити резидентний ген на інтрогресивний, є потенційною полумкою, яка, як правило, призводить до погіршення кінцевого результату, яким є вираз ознаки. Крім того, пшениця м'яка є аллогексаплоїдом, у її віддалених гібридів можуть відбуватися зміни у експресії дуплікованих генів [348,407]. 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 тягарю, яким є великий обсяг привнесеного чужинного хроматину, чи то хромосома чи її плече [167]. У світовій цитогенетиці пшениці ретельно відпрацьовано всі етапи зменшення обсягу інтрогресивного матеріалу для досягнення бажаної мети – передачі одного гена, який покликаний покращити ознаку [160,523]. І накопичено переконливий досвід, який свідчить, що відсутнього 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 [448,691]. І нема жодних гарантій досягнення успіху.

Виникає питання, чому так необхідно тягнути чужинні гени у геном рослин, що культивуються? Відповідь на нього проста: встановлено, що генофонд пшениці, що вирощується як монокультура в певних сортах, сильно збіднений у порівнянні з генофондом дикорослих родичів і не в останню чергу – через багаторічну діяльність селекціонерів [409,610]. Сполучення генів, які не задовольняють селекціонера сьогодні, безжально відкидаються, і генетичний поліморфізм рослинного виду втрачається. А саме поліморфізм, як відомо, є основою генетичної пластичності популяцій, яка забезпечує здатність виду пристосовуватися до факторів довкілля. Тому цей поліморфізм зберігається у популяціях дикорослих видів і може бути, як ми сподіваємось, використаним для підвищення генетичного поліморфізму видів пшениці, що культивуються [608]. Однак, як ми тепер ясно бачимо, внесення окремих чужинних генів до еволюційно збалансованого геному не гарантує, що після селекційної проробки інтрогресивного матеріалу, без якої не буває сорту, бажана ознака збережеться у привабливому для нас вигляді.

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 [135,191,295,393,502,509,514,659,842,858]. 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 [8,17,18,19,41,69,70,71,373,374]. Перевірка таких ліній на цитологічну стабільність показало, 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 запуснені свого часу інтрогресивною природою штучно створених геномів [44,45,46,48,105,110]. Дослідження побудовано з використанням ознак біохімічних (гени запасних білків та ферментів), морфологічних (остистість, колос зрілої колоскової луски, форма колосу, жорсткість колоскової луски, вдавненість на основі луски, опушення луски) та спектрів компонентів 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 з 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 амплікованих, 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 в інтрогресивних лініях генів, що кодують гліадини те бета-амілазу.

Об'єкт дослідження – мінливість геномів 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 агарозі та ПААГ), біоінформатичні (пошук в базах послідовностей, вирівнювання

експериментальних послідовностей, порівняння послідовностей), оцінка рослин за ознаками морфології, методи статистичної обробки даних.

Наукова новизна. 1. На пшенично-егілопсних 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, притаманній 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 пшеничного хроматину і це вперше доведено на генах гліадинового кластера, гені бета-амілази, гені *Bl* – інгібітора 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 рухом транспозонів *Sukkula* (гліадинові гени), *MITE* (ген бета-амілази) та експансією тринуклеотидних повторів *CAA* і *CAG*, кодонів глутаміну у гліадинових генах. Пшеничний ген *Bl* втрачає функціональність через певні перебудови у відповідній ділянці плеча *5AL*, які реєструються мікросателітним аналізом і відбуваються в інтрогресивних лініях – похідних Авродеса 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 хроматин 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, Paestivum, Italy, September, 1–6 2003, International Durum Wheat Symposium "From Seed to Pasta", Italy, 2008, Bologna, 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., 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, VII Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», 19–23 вересня 2011 р., м. Алушта, Istanbul, Turkey, Europe, Першій конференції молодих вчених «Біологія рослин та біотехнологія», 5–7 жовтня 2011, Біла Церква, Україна, 9 Plant Genomics European Meetings, 04.05–07.05,

2011, Istanbul, Turkey, 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 Agrocultural Crops: Traditions and Prospects”. October 17-19th, 2012, Odesa, Ukraine, 13th International Cereal Rust and Powdery Mildews Conference, 28 Aug. – 1 Sep., Beijing, China, 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 конференціях, міжнародних та вітчизняних.

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 мовою, 33 – російською, 1 – німецькою, решта англійською. Є два додатки: зі списком власних праць та з

послідовностями розроблених праймерів. Основний обсяг дисертації 412 стор., загальний обсяг 547 стор. Дисертація містить 90 таблиць та 65 рисунків.

РОЗДІЛ 1

ІНТРОГРЕСИВНА ГІБРИДИЗАЦІЯ ЯК ФАКТОР ШТУЧНОГО РОЗШИРЕННЯ ГЕНЕТИЧНОГО ПУЛУ ПШЕНИЦІ ТА РОЛЬ (ЕПІ)ГЕНЕТИЧНИХ МЕХАНІЗМІВ У ЗБІЛЬШЕННІ МІНЛИВОСТІ ЇЇ ГЕНОМУ (огляд літератури)

За результатами сучасних генетичних, популяційно-генетичних, еволюційних досліджень, походження більшості покритонасінних рослин (ангіосперми) пов'язано з принаймні одним актом поліплоїдизації геному з його наступною реструктуризацією, яка призвела до диплоїдизації виду [87,113,828]. Диплоїдизованими палеополіплоїдами є модельні рослини арабідопсис [139], кукурудза [306], рис [105]. Через міжвидову гібридизацію з наступною аллополіплоїдизацією утворилось багато рослинних таксонів, які є неприхованими поліплоїдами: *Triticum* [270,748], *Brassica* [781], *Gossypium* [862], *Tragopogon* (козельці, Asteraceae) [807].

Дослідження наслідків такої реструктуризації геномів на рівні генотипної, епігенетичної та фенотипної мінливості, а також молекулярних механізмів, які забезпечують цю реконструкцію геному, дає змогу стверджувати, що головнішу, революційну роль у формуванні геному відіграє саме процес поліплоїдизації [77,89,121,193,463,540]. Поліплоїдизацію вважають важливим джерелом підвищення генетичної пластичності нового виду, в основі якої лежать різні молекулярно-генетичні механізми [183,193]. Дуплікація генів та можливості, які при цьому відкриваються та реалізуються у геномі — набуття нових функцій, мовчання генів, довготривале співіснування дуплікованих генів, взаємодія між дуплікованими генами — розглядаються як елементи швидкої еволюції геномів на штучних аллополіплоїдах [134]. Толерантність поліплоїду до умов існування набагато перевищує можливості прабатьківських диплоїдних видів [136]. Не можна не розуміти важливість такої властивості для злаків, які, виходячи з високої колінеарності їхніх

геномів, мають монофілетичне походження [214,728], отже, первісно невеликий запас генетичної мінливості.

Серед видів рослин, які культивуються, поліплоїдів багато, і всі вони характеризуються нормальною фертильністю, доброю адаптацією та є генетично стабільними [466]. Поліплоїди більш сучасного походження демонструють геномну та фенотипну нестабільність [192,225,672]. Барбара МакКлінток [572] описала феномен генетичної нестабільності геномів гібридного походження як «геномний шок», який вона визначила як запрограмовану реструктуризацію геному, припустивши при цьому, що головну роль у цьому відіграють транспозони.

1.1. Геномний шок, що викликається об'єднанням геномів, та феномен його подолання

1.1.1. Зміни у нуклеотидних послідовностях, що супроводжують об'єднання геномів. Природно очікувати, що гібридний геном, чи то амфігаплоїд чи амфідиплоїд, має бути сумою геномів, які об'єдналися у межах одного ядра. Крім того, можна думати, що картина його експресії буде чимось середнім у порівнянні з батьківськими видами [649]. Численними роботами показано, що ця адитивна гіпотеза [649] не є справедливою ні для природних, ні для штучних аллополіплоїдів [127,464]. Більшість таких геномів характеризується зменшенням обсягу хроматину у порівнянні з очікуваним, і таке зменшення розглядається як наслідок геномного шоку [249,656]. Отже, об'єднання двох різних геномів та їхня наявність у дуплікованому вигляді у ядрі створює умови для динамічних змін геному, які потім відіб'ються на рівні транскриптому та фенотипу [76,351,486,778,873]. Зменшення геному відбувається за рахунок елімінації фрагментів хромосом [122,307], цілих хромосом [122,378,803] та загалом цілого геному, як правило, батьківського [377], хромосомно- та геномно-специфічних послідовностей, генів [182,804]. Елімінацію специфічних послідовностей було показано на молодих

аллополіплоїдних видах родів *Tragopogon* [150,432,807] та *Spartina* [80,725], на тритікале [802,804]. У роботах [652] та [248] було наведено дані про зменшення розміру геномів у гібридах між видами *Aegilops* та *Triticum* проти очікуваної сумарної кількості ДНК батьківських геномів. У цілому, до генетичних змін геному відносяться транслокації, транспозиції, делеції та інсерції нуклеотидних послідовностей [136]. Цитогенетичні та молекулярно-генетичні дослідження рослин *Brassicaceae*, отриманих при ресинтезі *Brassica napus* (ААСС) та схрещуванні цього виду з видом *B. rapa* (АА), свідчать про наявність широкомасштабних хромосомних перебудов за рахунок гомеологічної рекомбінації хромосом з наступною появою алельного та генотипного розмаїття серед нащадків [300,631]. Значна варіабельність за кількістю хромосом, поява міжгеномних транслокацій спостерігається у природних популяціях «молодих» аллополіплоїдів роду *Tragopogon* [185]. У аналогічному дослідженні на арабідопсисі підкреслюється, що каріотипна нестабільність має мозаїчний характер, тобто реєструється не лише на міжорганізменному, а і на внутрішньоорганізменному рівнях. Для пшенично-житніх амфідиплоїдів показано наявність невеликих транслокацій під час аллополіплоїдизації як в межах одного геному, так і міжгеномних [296], а також варіювання за тандемними повторами [802] та регуляторними елементами [802]. Міжгеномне транслокування хромосомних сегментів показано також для природного аллогексаплоїдного злаку *Kengyilia thoroldiana* (Keng) J.L. Yang et al. (StStPPYY) [296], для подвійних моносомних ліній 6D6V (*D. villosum*) [683]. Порівняння пшениць (*Triticum*) трьох рівнів плоїдності виявило наявність делецій у дистальних частинах хромосом при збільшенні плоїдності геному [240].

Висловлюється припущення, що елімінація певних елементів геномної ДНК в аллополіплоїдах необхідна для перебудови хромосом та збереження диплоїдної кон'югації хромосом у мейозі [863,248] і тому більш характерна для алло- ніж для автополіплоїдів [249,656]. До диплоїдизації мейозу призводять також злиття та розділення хромосом, і ці події у геномі мають відбуватися

швидко протягом кількох генерацій для утворення стабільного геному [706]. Елімінація хроматину має відігравати роль у організації експресії та функції дуплікованих генів, її описано для різних видів рослин [182]. У цілому відкриття двох останніх десятирічч переконливо свідчать, що ранні стадії поліплоїдизації часто супроводжуються швидкою та екстенсивною геномною нестабільністю, яку розглядають як необхідний етап стабілізації знову створеного аллополіплоїда [142,182,191,193,209,382,465,545,777,778,943]. Було виконано чимало робіт з вивчення геномів природних та штучних поліплоїдів родів *Triticum* та *Aegilops*. Отримані результати вказують на, по-перше, спрямований характер змін, які відбуваються при об'єднанні геномів, та, по-друге, ці зміни повторюються при нових спробах об'єднання геномів [80,407,503,504,651,652,748].

На сьогодні значно спростився процес повнорозмірного секвенування геному через створення нового покоління методів сиквенсу (NGS, Next generation sequencing), швидких та недорогих [704] та розробці ефективного методу сортування хромосом, що виявилось таким важливим для великого геному пшениці [220,533]. Це відкрило перспективу об'єднання результатів порівняння електрофоретичних спектрів з результатами фізичного картування геномів, що внесе остаточну ясність в розв'язання питання: що саме та як само відбувається з геномом у знову створених гібридах та аллополіплоїдах [152,859].

1.1.2. Експресія генів у геномі гібридного походження.

Аллополіплоїдні організми мають гомеологічні гени ортологічного походження. Дослідження експресії таких генів за допомогою різних сучасних молекулярно-генетичних методів [616,824] показало наявність двох типів змін у експресії ортологічних генів у складі поліплоїда у порівнянні з такою у батьківських видів: мовчання одного з гомеологів або значна асиметрія у ступені експресії двох гомеологів, отриманих від різних батьків. Це було встановлено при вивченні природних аллополіплоїдних видів бавовнику [74,144,277,824], пшениці [269], *Spartina* [168], *Tragopogon* [151,807]. Це

означає, що внесок кожного з гомеологічних генів у транскрипційний пул аллополіплоїда не є однаковим і можна думати, що ця різниця сформувалась поступово протягом тривалого еволюційного становлення такого виду. Проте вивчення штучних аллополіплоїдів показало, що зміни у експресії відбуваються надзвичайно швидко протягом невеликої кількості генерацій знову створеного аллополіплоїда. Це було встановлено на аллополіплоїдах бавовнику, пшениці, арабідопсиса [75,192,348,407,681].

Слід одразу підкреслити, що вивчення експресії генів у сучасних дослідженнях відбувається переважно на рівні транскриптома. Робіт, де у поліплоїдів досліджувалась експресія генів до утворення білків, мало [85,363,433,558,628]. За результатами декотрих з них, характеристика особливостей утворення транскриптому та протеому у поліплоїдів переважно не збігаються. Можливо, ще не створено придатну методичну базу для аналізу протеому, і ми зосереджуємося тільки на даних, отриманих для транскрипції генів.

Транскриптоми аналізуються з використанням мікроаррей-технологій на основі cDNA-AFLP [276,300,350,432,844], cDNA-SSCP [201,679] та mRNA-seq [908]. Вивчення транскриптомів із залученням методу мікроарреїв для порівняння рівня транскрипції у гібридів (поліплоїдів) та батьківських видів довело переконливо, що транскрипція у таких геномах часто відхиляється від адитивності, і утворення гібридного геному супроводжується специфічною регуляцією експресії генів [355,670,681]. Мікроаррей-технологія, хоча є інформативною та швидкою, вимагає даних сиквенсу геному, що вивчається, і слабо розрізняє продукти гомеологічних генів, що погано для аллополіплоїдів. Модифікацією мікроаррей-технології є вивчення транскрипції із залученням mRNA-seq [557,648,855], реалізація якої стала можливою після розробки методів сиквенсу ДНК нового покоління, NGS. Ця модифікація відкрила можливість порівнювати рівень експресії конкретних цільових генів. Стало можливим вимірювати внесок до транскриптому гомеологічних генів аллополіплоїдного геному [355,616]. Вона долає недоліки попередніх методів,

тому що може розрізняти розбіжності на рівні SNP, що є принципово важливим для ідентифікації продуктів транскрипції алелів гомеологічних генів для будь-якої дуплікованої пари генів.

Теоретично можливі кілька варіантів експресії гомеологічних генів: адитивна експресія всіх батьківських копій (коекспресія); дозова компенсація, так що рівень експресії у поліплоїда не відрізняється від диплоїда; мовчання однієї батьківської копії та збереження експресії іншої (nonfunctionalization); набуття нової функції однією копією та збереження оригінальної функції іншої копії (neofunctionalization); розділення оригінальної функції між дуплікованими копіями (subfunctionalization) [78,530,531]. Модифікуватися можуть не лише окремі гени, а і генні мережі [281,732]. При дослідженні експресії гомеологічних генів відправною точкою було припущення про адитивну експресію генів. Тобто рівень експресії двох генів у аллотетраплоїда має бути середнім значенням між рівнями експресії цих генів у батьківських видів. Було зафіксовано приклади однакових змін у експресії гомеологів для природних та знову створених (ресинтезованих) аллополіплоїдів з однаковими вихідними батьківськими видами [74,144,348,350,597,671,845], хоча це і не стосується всіх досліджених генів [50,53,845].

Якщо здається, що всю експресію детермінує один з гомеологів аллополіплоїда, констатується домінантний рівень експресії (expression level dominance, ELD) [324,908] і мова йде про неадитивну експресію гомеологів. Перші дослідження з застосуванням кДНК мікроаррей на аллополіплоїдах *Senecio* та арабідопсиса виявили факти неадитивності у експресії гомеологічних генів [350,351,844]. Неадитивну експресію частини генів було показано на всіх досліджених штучних аллополіплоїдах: арабідопсиса [192,542,844,845], *Brassica* [300,301,558], тютюну [771], бавовни [74,75,276,277], *Spartina* [168], *Senecio* [352], *Tragopogon* [152,153,432,807], пшениці [348,407,503,504], пшенично-егілопсних амфідиплоїдів [348,680,681]. Частка генів з неадитивною експресією у дослідженнях з різними рослинними об'єктами була різною та, на наш погляд, ці дані поки що мають суто інформаційну цінність [166,680,844]. У

сучасній роботі [341] вивчали експресію генів у гібриді *Triticum turgidum* × *Aegilops tauschii* та його амфідиплоїді. Декларується різниця у експресії генів різного субгеномного походження. А саме, для гомеологічних генів з неадитивною експресією (ELD) зареєстровано зниження регуляції експресії гомеологів у гібриді ABD та повернення до вихідного рівня експресії для аллогексаплоїда AABBDD, причому кількість генів субгеному D, для яких показано таку зміну експресії, більша, ніж субгеномів АВ (у статті гени для цих двох субгеномів розглядаються окремо). Для сінглтонів (singletons, гени, що не мають гомеологів у різних субгеномах, термін у статті застосований уперше) зниження рівня експресії генів субгеному D було властиво як амфігаплоїду, так і амфідиплоїду [341]. На наш погляд, такі результати можна пояснити тим, що у створених амфіплоїдах субгеном D є зовсім новим для субгеномів А та В, а самі ці субгеноми у складі геному *Triticum turgidum* давно адаптувались один до одного, тому для них ефекту віддаленої гібридизації стосовно один одного немає.

Сучасні молекулярно-генетичні дослідження показують, що в різних поліплоїдах можливі всі теоретично передбачені варіанти експресії дуплікованих генів. Так, замовкання одного з батьківських генів було показано для аллотетраплоїдів *Tragopogon* [151,153,382,806,807], арабідопсиса [192], пшениці [348,407]. Широко відомим феноменом стала однобатьківська експресія рРНК у багатьох міжвидових гібридах та аллополіплоїдах, яка отримала назву ядерцеве домінування [180,672], хоча це не є обов'язковим феноменом для всіх аллополіплоїдів [80]. Показано навіть ієрархію в замовканні цих генів, отриманих від різних видів *Brassica* у трьох аллотетраплоїдів: *B. nigra* [181]. Асиметрію у експресії показано і для багатьох білоккодуєчих генів [844,845]. Субфункціоналізацію батьківських копій було показано на кукурудзі [585], ячмені [265]. Тканиноспецифічну субфункціоналізацію – на бавовні [74,75] та гексаплоїдній пшениці [144]. Органоспецифічну залежність у змінах експресії генів при аллополіплоїдизації було показано для *Gossypium hirsutum* [74], гексаплоїдної пшениці [144]. Ця

залежність виявляється одразу після аллополіплоїдизації [75]. У цілому ж для аллополіплоїдних рослин показано диплоїд-подібну експресію генів [138].

За допомогою мікроаррей-аналізу вивчали транскриптоми не лише аллополіплоїдів, а і гібридів F_1 , як міжвидових, так і внутрішньовидових. Встановлено, що гібриди F_1 також показують неадитивну експресію генів стосовно своїх батьків. Неадитивну експресію було виявлено на внутрішньовидових гібридах кукурудзи [330,788,791], рису [347] та арабідопсиса [322]. Отримані результати негайно стали використовуватися для пояснення молекулярних основ гетерозису [138]. Стає очевидним, що причина «гібридної сили» полягає у зміні експресії структурних та регуляторних генів при гібридизації [138,841]. Під час вивчення експресії генів саме у внутрішньовидових диплоїдних гібридів було показано наступне. По-перше, для деяких генів існує преференція у експресії в гібриді в залежності від материнсько-батьківського походження. Це було продемонстровано на кукурудзі [330,791] та арабідопсисі [841]. По-друге, уперше було чітко показано моноалельну експресію для деяких генів [330]. По-третє, було встановлено орган специфічне мовчання алелів різного походження [76]. Навіть коли констатувалась експресія алелів обох батьків, для деяких генів відмічався нерівний внесок у експресію алелів різного походження [454].

Вивчення міжвидових гібридів підтвердило картину експресії генів, отриману на внутрішньовидових гібридах [276,350]. Було показано нерівний внесок батьків у транскриптом і гібрида, і аллополіплоїда, на його основі отриманого. Проте ступінь нерівності для різних видів сильно відрізнявся [276,844]. У цілому на сьогодні прийнято припущення, що вплив гібридизації на неадитивну генну експресію більший, ніж наступної аллополіплоїдизації. Більшість, якщо не всі, зміни у експресії генів, які спостерігаються у знову створених аллополіплоїдів, були спричинені саме гібридизацією [78]. Порівнюючи диференційну експресію генів у знову синтезованих та природних поліплоїдів *B. napus*, було показано, що зміни у експресії генів відбуваються як

безпосередньо після аллополіплоїдизації, так і протягом наступної еволюції геному [355].

Зміни у експресії генів проти очікуваної адитивності спостерігали також на трансляційному рівні на неополіплоїдах *Brassica napus* [85]. Деякі з перевірених білків не синтезувались взагалі. За даними [433], 14% перевірених білків у *T. mirus* транслювались не адитивно стосовно трансляції у батьківських видах. Порівнюючи отримані дані з результатами характеристики транскриптомів на тому самому матеріалі, отриманими раніше [432], автори стверджують, що лише небагато генів показують однакові зміни у експресії на рівні транскрипції та трансляції. Зміни на трансляційному рівні, як і на транскрипційному можуть носити органзалежний характер [85,844].

Розглядаються різні причини зміни експресії генів у поліплоїдах у порівнянні з їхньою експресією у прабатьківських геномах. Перш за все, це може бути наслідком структурних хромосомних перебудов як це було показано на дріжджах [825]. Тобто дупліковані (гомеологічні, ортологічні) гени можуть втрачатися, мутувати та дивергувати [410,837]. Зміна експресії може пояснюватися утворенням нових білкових продуктів через зміни у сплайсингу транскриптів. Підтвердження цьому припущенню були отримані на автотетраплоїді *Capsella bursapastoris* [775], аллополіплоїдах арабідопсиса [544], *Brassica* [940]. Проте головним предметом розгляду як чинників таких змін у сучасних роботах є дослідження епігенетичних процесів, метилювання ДНК, модифікація гістонів, дія маленьких некодуючих РНК та транспозонів з наступним ремоделюванням хроматину та зміною експресивної активності гена на рівні як транскрипції так і посттранскрипційному [182,276,579,457,892], тобто всі ті механізми, які будуть розглянуті у пункті 1.1.3.

1.1.3. Механізми генетичних та епігенетичних змін у геномі гібридного походження. Висловлюється припущення [179], що нова мінливість, яка з'являється в аллополіплоїдах у порівнянні з батьківськими видами, пов'язана не лише з генетичними, а і з епігенетичними змінами також. Генетичними змінами вважаються такі, що пов'язані з обов'язковою зміною

нуклеотидних послідовностей. Епігенетичними – такі, що спричинюються метилюванням нуклеотидів, модифікацією гістонів, діяльністю маленьких некодуєчих РНК та транспозонів, що в сукупності дає ефект ремоделювання хроматину і впливає на експресію генів та рух транспозонів у геномі.

1.1.3.1. Генетична рекомбінація та мутагенез. Однакові гени гомеологічних геномів аллополіплоїдів у сучасній літературі називають гомеологами. У підпункті 1.1.1 наведено дані про встановлені факти втрати дуплікованих генів (гомеологів) в аллополіплоїдних геномах. Молекулярні механізми такої втрати охоче обговорюються авторами багатьох статей, проте робіт з фактичним доказом щодо цих механізмів не так багато. Вивчення таких робіт показує, що в гібридному геномі відбуваються зміни нуклеотидних послідовностей ДНК у порівнянні з батьківськими геномами (те, що ми називаємо мутаціями) внаслідок прихованої анеуплоїдії та хромосомних аберацій, які супроводжують кон'югацію гомеологів, нерівний кросинговер та нелегітимну рекомбінацію.

Вивчення експериментально отриманих поліплоїдів різних таксонів рослин показує, що процес їхнього становлення пов'язаний з мінливістю за кількістю хромосом як у гаметах, так і в нащадків [185]. На тритікале це було показано давно [764]. Анеуплоїдію виявляли як на рівні цілого геному (відхилення від набору $2n$), так і на рівні субгеномів: один з батьківських субгеномів представлений у поліплоїді кількістю хромосом $>2x$, інший — $<2x$, де $2x$ є геномом джерела субгеному [492,883]. Аналіз даних за кількістю хромосом показав мейотичну нестабільність синтетичних поліплоїдів пшениці та поступову втрату цілих хромосом, і це розглядається як один з механізмів втрати дуплікованих генів [586].

Сучасні методичні можливості молекулярно-генетичного аналізу дали можливість групі дослідників, що працюють з аллополіплоїдами *Trogopogon miscellus*, встановити факти анеуплоїдії аллополіплоїда стосовно субгеномів при збереженні кількості хромосом без змін. Було застосовано методи секвенування ДНК наступного покоління для створення зондів для GISH та

FISH та ідентифіковано значну хромосомну мінливість в декількох популяціях вказаного виду [185]. Третина всіх досліджених індивідуумів характеризувалась міжгеномними транслокаціями, більше двох третин рослин були анеуплоїдами. У більшості випадків анеуплоїдія призводила до заміщення гомеологічних хромосом через реципрокную моносомію-трисомію або нулісомію-тетрасомію, так що загальна кількість хромосом зберігалась на належному рівні $2n = 24$, хоча 12 хромосом було отримано не від кожного з батьків [152]. Ці результати практично повністю збігаються з результатами більш раннього дослідження на аллотетраплоїдах *T. mirus* та *T. miscellus* іншою групою дослідників, коли було зафіксовано численні хромосомні перебудови та інші хромосомні зміни, хромосомний поліморфізм між окремими індивідуумами та популяціями, включаючи моносомію, трисомію, внутрішньогеномні транслокації. Спостерігалися мейотичні порушення, в тому числі формування квадрівалентів [492].

На пшенично-житніх моносомно-доданих-1R лініях було показано відхилення від нормальної поведінки хромосом у мітозі, внаслідок чого в соматичних тканинах утворювались анеуплоїдні клітини (цит. за [295]). Соматичну тканиноспецифічну нестабільність за кількістю хромосом (втрата) спостерігали у гексаплоїдного міжродового гібрида злаків. У якості механізмів такої нестабільності розглядають інактивацію центромери та фрагментацію хромосом через відсутність репарації дволанцюгових розривів [223].

В нормі у рекомбінації беруть участь алельні послідовності гомологічних хромосом. Якщо у знову створеного аллополіплоїда не працює механізм диплоїдизації кон'югації хромосом, рекомбінація може відбуватися ектопічним чином, між гомеологічними (паралогічними) послідовностями [299,725]. Гомеологічна рекомбінація чи є реципрокною, чи відбувається через конверсію, може призвести до появи нової генетичної мінливості [299]. З самого початку досліджень в цьому напрямку було зроблено припущення, що фрагменти ДНК у геномах аллополіплоїдної природи втрачаються саме через кон'югацію гомеологічних хромосом [300,407,503,651,653,748]. Докази наявності такого

механізму отримано на синтетичних аллополіплоїдах *Brassica* [189,299,300,631]. На ресинтезованих поліплоїдах *B. napus* з використанням ПДРФ-маркерів було доведено втрату та дуплікацію гомеологічних локусів [300,660,755], і цей феномен отримав назву гомеологічні не реципрокні транспозиції (homoeologous nonreciprocal transpositions, HNRTs), не зовсім коректну, оскільки за суттю це є наслідком реципрокної міжгеномної рекомбінації [632].

Роль гомеологічної кон'югації у продукуванні генетичних змін було доведено на сучасно сформованих аллополіплоїдах *Tragopogon* [152,185,492,808]. Автори цих досліджень припускають, що мультивалентна кон'югація, гомеологічна рекомбінація, розщеплення гетерозигот за транслокаціями є подіями, що цілком здатні пояснити зміни у геномі аллополіплоїдів, включаючи втрату послідовностей.

Феномен ядерцевого домінування, відкритий при дослідженні ресинтезованих аллополіплоїдів *Nicotiana* та *Arabidopsis*, був пояснений тим, що локуси рДНК можуть втрачатися або гомогенізуватися, або транслокуватися після поліплоїдизації [440,444,674]. Втрата рДНК може бути наслідком гомеологічної рекомбінації або конверсії, випадкового розщеплення, хромосомних розривів та гомеологічної не реципрокної транспозиції. В деяких випадках спостерігали ампліфікацію послідовностей [440,674].

Той факт, що для ресинтезованих аллополіплоїдів *Brassica* [521,781] та *Nicotiana* [771] було продемонстровано переважну втрату ДНК-послідовностей батьківського походження, пояснюють внутрішньохромосомними обмінами, інсерцією транспозонів, проте чому саме батьківський геном підлягає таким змінам, незрозуміло.

На синтетичних аллополіплоїдах *Triticum* [724] та *Nicotiana* [491,537] міжгеномної рекомбінації хромосом виявлено не було. Щодо пшениці, це пояснюється, скоріш за все, генетичним контролем диплоїдизації мейозу у аллогексаплоїдів (ген *Ph1* [314]). Справді, подібний ген є також у *Brassica* (*PrBn*) [631]. Проте хромосоми аллогамплоїда АС при ресинтезі *Brassica napus*

кон'югують, а аллогамної пшениці ABD – ні [189], тобто «суворість» вказаних генів щодо заборони гомеологічної кон'югації різна. Можливо, саме через це спостерігається гомеологічна рекомбінація на знову синтезованих аллотетраплоїдах *Brassica*, але не *Triticum*. У геномі знову синтезованої пшениці має місце хромосомно-специфічна втрата низькокопійних кодуєчих та не кодуєчих послідовностей [270,407,464,651], можливо, через внутрішньохромосомну рекомбінацію та вирізання транспозонів [299]. У роботі [537] показано, що різні хромосоми двох геномів *Nicotiana* мають однакові гетерохроматинові блоки послідовностей. Автори припускають, що це може сприяти їхній втраті при кон'югації хромосом.

Те, що знову синтезовані аллополіплоїди *Gossypium* на відміну від інших вивчених амфідиплоїдів характеризуються слабкими генетичними змінами, а для природних аллотетраплоїдів не є характерними міжгеномні транслокації, поки не знайшло жодного пояснення [501,717].

Нерівний кросинговер, тобто не зовсім точний обмін послідовностями при спарюванні гомологічних хромосом або при внутрішньохромосомній наявності гомологічних ділянок, може спричинювати втрату ДНК-послідовностей, як і їхню дуплікацію. На рослинах задокументовано факти нерівного кросинговеру [619,714], в тому числі на аллополіплоїдах: ампліфікація рДНК у аллополіплоїдів *Nicotiana* може бути результатом нерівного кросинговеру [440]. Тандемні повтори, наприклад рДНК, можуть втрачатися через нерівний кросинговер, хоча точний механізм цього процесу ще невідомий [247,303].

За даними [132,133,274], геноми деяких злаків представлені LTR-ретротранспозонами на 90%. Отже, ці послідовності розглядаються як придатний субстрат для нелегітимної рекомбінації та нерівного кросинговеру [442,658], які можуть призвести до всіх типів мутацій, які спостерігаються при перебудові геному – делеції, інсерції, транслокації. У дослідженнях [131,212] припускається, що процес зміни розміру геному у покритонасінних пов'язаний з нелегітимною рекомбінацією та, у меншому ступені, з нерівним

кросинговером гомологів і саме вони є тим механізмом, який протистоїть експансії (ампліфікації) ретротранспозонів після аллополіплоїдизації. Аналіз ВАС-послідовностей у аллополіплоїдної бавовни та її диплоїдних прабатьків виявив невелику кількість делецій та нелегітимних рекомбінацій, що супроводжували аллоплоїдизацію [325]. Порівняння геномних послідовностей у диплоїдних та тетраплоїдних видів пшениці показало наявність перебудов ДНК у регіонах, збагачених на повтори, і це може бути пояснено нелегітимною рекомбінацією [869]. У роботі [162] проаналізували пшеничний локус *Hardness*, який зазнав делеції під час аллополіплоїдизації, та показали, що зміни, що відбулися, можуть бути пояснені нелегітимною рекомбінацією.

Загальна (легітимна) генетична рекомбінація відбувається реципрокно між однаковими ділянками гомологічних хромосом. Нелегітимна рекомбінація призводить до обміну між різними частинами хромосом, в тому числі мітотична рекомбінація в межах одної хромосоми. У статті [910] повідомляється про появу нових компонентів у спектрі високомолекулярних глютенінів (ген *Glu-1Ax*) у F_1 від схрещування пшениці та жита з частотою 0,05% та серед нащадків F_2 від рослин F_1 , які нових компонентів не мали. У гені *Glu-1Ax* було знайдено 42 типи повторів, які брали участь у делеціях, тобто всі знайдені делеції були фланковані прямими повторами. Кожна делеція видаляла певний фрагмент разом з фланкуючими прямими повторами. За результатами попередніх досліджень [212,534] очевидно, що наявність фланкуючих прямих повторів є типовим доказом такої події як нелегітимна рекомбінація [870]. Автори [910] вважають, що поява нових алелів гена *Glu-1Ax* є наслідком нелегітимної рекомбінації, оскільки ті делеції, що вони спостерігали, оточені прямими повторами. Нелегітимна рекомбінація в багатьох генетичних процесах виступає як джерело нової генетичної мінливості, тобто змінених (наприклад, шуффлінг екзонів), або нових (сексдукція у бактеріофагів) алелів.

Роль транспозонів у організації процесу нелегітимної рекомбінації розглянуто у підпункті 1.1.3.4.

1.1.3.2. Участь некодуєчих РНК у епігенетичних змінах. В рослинних клітинах маленькі РНК (small RNAs) представлені двома головними класами: міРНК (мікроРНК, miRNAs) та малі (короткі) інтерферуєчі РНК (кіРНК, small (short) interfering RNAs, siRNAs). В останньому класі розрізняють кілька підкласів: трансдіючі короткі інтерферуєчі РНК (тд-кіРНК, transacting small interfering RNAs, ta-siRNAs), натуральні трансдіючі короткі інтерферуєчі РНК (нат-кіРНК, natural *cis*-acting siRNAs, nat-siRNA), внутрішні кіРНК (endo-siRNA), п4/п5-кіРНК (p4/p5-siRNA), які транскрибуються за участю полімерази IV та V [205]. Різні класи маленьких РНК процесуються з різних прекурсорів (попередників) з використанням у цілому одного й того самого консервативного молекулярного механізму [147,831], який дає в результаті молекулу РНК, що впливає на події розвитку та реакції на зовнішні стимули, а також стабільність геному через збереження гетерохроматину [170,178].

Прекурсори міРНК транскрибуються з генів власного геному організму (*MIR*-гени) як одноланцюгова РНК з внутрішньою комплементарністю. Шпилька, що утворюється, являє собою дволанцюгову РНК (длРНК) та є субстратом для дії специфічних ендонуклеаз. Довжина міРНК становить 20–30 п.н. [308]. Їхня функція полягає у репресії генів, які беруть участь, переважно, у подіях розвитку та організації адаптації організму або через деградацію цільової мРНК, або через інгібування трансляції. В останні роки з'явилися дослідження, які свідчать, що міРНК, які регулюють хазяйські гени, знаходяться всередині послідовностей транспозонних елементів (TE). З них можуть походити також кіРНК [573,574,673,773,793,895,909]. Тобто TE є невичерпним джерелом мінливості міРНК, які проходять селекційне випробування на корисність в конкретних умовах існування хазяїна [207,358,485].

Прекурсори кіРНК є довгими дл-РНК, походження яких визначає підклас, до якого кіРНК відносять. Тд-кіРНК транскрибуються з локусів *TAS* також власного геному організму, які містять специфічний кіРНК-зв'язувальний сайт [833]. Нат-кіРНК походять від натуральних антисенсових транскриптів, які транскрибуються з генів, що перекриваються, та утворюють длРНК при

комплементарному спарюванні [147,831,857]. Endo-siRNA продукуються з длРНК, яка є шпилькоподібною структурою, як прекурсор міРНК [238]. В біогенезі беруть участь дві РНК-полімерази, IV та V. Саме з цими кіРНК пов'язують ініціацію ремоделювання хроматину. У якості джерела цих кіРНК вказують ДНК чужинного походження (ретровіруси, повтори, трансгени) [695, 772]. Саме вони розглядаються на сьогодні як один з головних молекулярних елементів захисту від транспозонів під час розвитку рослини [361,774].

Маленькі РНК розглядаються як інструменти виникнення епігенетичної мінливості у клітинах. Зокрема, маленькі РНК, що входять до складу молекулярного комплексу RISC, який процесує посттранскрипційне замовчування генів (PTGS), до комплексу RITS, що забезпечує транскрипційне замовчування (TGS) [205]. Було доведено, що мовчання дуплікованих генів у поліплоїдів може бути РНК-опосередкованим через косупресію [569] або РНК-інтерференцію [182] із застосуванням кі-РНК.

Щодо експресії у амфідиплоїдів міРНК та тд-кіРНК, дані, наявні в літературі, суперечливі. Переважну неадитивність у експресії міРНК встановлено для ресинтезованого виду *B. napus* [298], причому більше третини цих РНК були новими стосовно батьківських видів. В трьох поколіннях цього резин тезованого виду вивчали кількості міРНК та встановили, що вона зменшується від більш ранніх до більш пізніх поколінь [298]. У дослідженні [411] було показано адитивність експресії міРНК у поліплоїдів у цілому з незначними виключеннями. Одним з таких виключень є активація регуляції miRNA168, що її ціллю є *AGO1* у поліплоїдів [832]. Зменшення кількості *AGO1* призводить до зменшення кількості siRNAs [832]. Можливо це може пояснювати, чому у поліплоїдах пшениці зменшується кількість siRNAs [411]. Раніше [334] показали, що експресія міРНК та тд-кіРНК в аллополіплоїдів значно відрізняється від їхньої експресії у батьківських видів. Фенотипні зміни та еволюційні інновації в аллополіплоїдах можуть спричинюватися змінами у експресії міРНК та тд-кіРНК. В цьому ж дослідженні показано наявність певного рівня домінування експресії для міРНК одного з батьків (*A. arenosa*).

Раніше було встановлено, що рРНК та протеїн кодуючі гени *A. thaliana* були репресовані в аллополіплоїда частіше, ніж гени *A. arenosa*. Різниця у накопиченні міРНК між знову синтезованим та природним аллополіплоїдами могла вказувати на еволюційну лабільність маленьких РНК. Справді, не було можливості перевірити точних батьків натурального аллотетраплоїда тому не зрозуміло, чи була різниця в наявності вже між батьками, чи вона виникла лише у поліплоїда [334].

Специфічні міРНК є відповідальними за виникнення специфічних фенотипних змін в результаті відмінності експресії аллотетраплоїда від батьківських диплоїдів. В роботі [629] виявили різну регуляцію з боку *MIR163* у знову синтезованого *A. suecica* у порівнянні з батьківськими генотипами. Цільовий ген для *MIR163* бере участь у синтезі вторинних метаболітів, які забезпечують стійкість *A. thaliana* до комах [629]. Те, що зміна картини експресії міРНК та тд-кіРНК в аллополіплоїді у порівнянні з батьківськими видами може спричинювати зміни у фенотипі, в тому числі еволюційні інновації в аллополіплоїді, було припущено і в інших дослідженнях [545,629]. Було перевірено [334] експресію генів, що беруть участь у біогенезі маленьких РНК, *AGO* та *DCL*. Було виявлено неадитивну експресію при порівнянні батьків та аллотетраплоїда, проте на накопичення маленьких РНК це не впливало [334]. Хоча у наступному дослідженні генів *AGO1* та *DCL1* у домінантного мутанта знову синтезованого *A. suecica* зі зниженням експресії цих генів, виявлено знижений рівень міRNA [452].

Для повторів та транспозонів [541] та [559] припустили, що при міжвидових схрещуваннях міРНК та кіРНК можуть призвести до мовчання транскриптів, отриманих з транспозонів власного геному. Проте ці маленькі РНК можуть бути неефективними щодо транспозонів, об'єднаних у спільному геномі у гібриді чи аллополіплоїді, внаслідок чого і розвивається геномний шок. Цю гіпотезу було перевірено у кількох сучасних дослідженнях. Було показано [334], що кіРНК, асоційовані з повторами або транспозонами в геномі *A. suecica*, значно варіювали у батьківських видів *A. thaliana* та *A. arenosa*. Ці

маленькі РНК в аллополіплоїді експресуються відносно стабільно. Це дає підстави вважати, що інтеграція батьківських геномів в аллополіплоїді залежить від сумісності кіРНК цих геномів, тому що саме вони забезпечують мовчання транспозонів та послідовностей, асоційованих з повторами. Інші щодо кіРНК результати було отримано при вивченні пшениць різного рівня плоїдності — зі збільшенням рівня плоїдності від ди- до гексаплоїдії рівень експресії кіРНК зменшувався у аллополіплоїдів, але не в гібридах [411]. Одночасно зменшується рівень метилювання транспозонів [411]. В аллополіплоїді кіРНК накопичувались або значно більше, або значно менше, ніж очікувалось з їхньої кількості в батьківських видах. З цього факта автори висловлюють припущення, що в цьому роді гібридизація та аллополіплоїдизація потенційно призводять до зменшення стабільності геному [411]. На пшеницях з різним рівнем плоїдності [411] вказують на адитивний характер експресії міРНК з незначними виключеннями. Серед міРНК з надекспресією знайдено miRNA168, ціллю якої є *AGO1*, необхідний для утворення та функціонування RISC. Отже, така надекспресія має призводити до зменшення функціонування кіРНК у аллополіплоїда у порівнянні з батьківськими видами [832], що і спостерігається насправді [411]. Встановлено [334], що кіРНК, пов'язані з транспозонними повторами у *A. suecica*, значно варіюють у двох прабатьківських видів, *A. thaliana* та *A. arenosa*. Експресія кіРНК відносно стабільна у аллополіплоїдів. Це може вказувати на велике значення кіРНК для забезпечення мовчання транспозонів та повторів у аллополіплоїда. Було припущено [541,559], що у міжвидових гібридах міРНК або кіРНК можуть призводити до генного мовчання конспецифічних транскриптів, отриманих від транспозонів, та бути неефективними проти дивергентних транспозонних послідовностей від різних видів або аллополіплоїдів. Транспозони, що не замовчуються, активуються.

1.1.3.3. Метилювання ДНК та модифікація гістонів. Серед молекулярних механізмів змін, які називаються епігенетичними, на сьогодні краще за все вивчено гіперметилювання ДНК за мотивами CpG, CpCpG,

СрНрНр та СрНрG [274], наслідком якого є мовчання гена. Метилуванню підлягають не лише промоторні регіони гена, що призводить до транскрипційної репресії [617,795], а і кодуєча частина гена [810]. Значення метилування ДНК у геномі розглядається в двох аспектах: регуляція експресії генів та супресія і вивільнення транспозонів [133,408,445,465,544]. Обидва аспекти є суттєвими для розгляду змін експресії генів у гібридах та поліплоїдах. Крім того, на процес метилування цитозинів вказують як на потенційно мутагенний, оскільки метильований цитозин має високу імовірність спонтанного дезамінування, що перетворює його на тимідин [319] та викликає транзицію.

Метилування ДНК є одним з базових епігенетичних механізмів і його прийнято вивчати перш за все при вивченні аллополіплоїдів, хоча картина метилування геному у гібрида та аллополіплоїда у порівнянні з батьківськими видами неоднозначна. Для деяких видів (пшениця [407,748,781,936], *Brassica* [444,889], *Arabidopsis* [127,543,544]), констатували зміну картини метилування у гібридах та поліплоїдах, для бавовника – ні [501]. Триплоїдні гібриди кульбаби (*Taraxacum*), генетично однакові, виявили високий рівень мінливості за картоною метилування, причому метилування відбувалось *de novo* [836]. Картина метилування, яка зберігалася у наступних генераціях, залишалась мономорфною у межах кожної з отриманих ліній [836]. Такі зміни у картині метилування розглядаються автором як потенційне джерело генотипної мінливості, яка може мати позитивне адаптивне значення та сприяти збереженню знову виниклих триплоїдних ліній.

Дуже цікавими а перспективними для подальших досліджень механізмів регуляції експресії генів здаються нам результати, отримані при вивченні механізму замовчування трансгена (стійкість до гігроміцину) на трансгенних лініях арабідосиса при переведенні їх на автотетраплоїдний рівень [126]. Навіть новий термін було висунуто – polyploidy-associated transcriptional gene silencing (paTGS) [126]. Трансген успадковувався стабільно і замовчувався лише у автотетраплоїді. Мовчання гена спричинювалось двома генами, *DECREASE IN*

DNA METHYLATION 1 (DDM1) та *HOMOLOGOUS GENE SILENCING 1 (HOG1)*. Однак чому ген експресується у диплоїді і не експресується у тетраплоїді з'ясовано так і не було.

ДНК-метилування впливає на транспозонні елементи аллополіплоїдного геному, причому зміни в їхньому метилуванні відбуваються одразу після гібридизації. Метилування транспозонів відбувається частіше у порівнянні з випадковими фрагментами ДНК. Це вказує на важливу роль транспозонів як суб'єктів епігенетичних змін у гібридних геномах [656,657].

Для нас цікавою є робота [222], де показана наявність розбіжностей у картинах метилування реципієненого генотипу рису *Oryza sativa* та трьох інтрогресивних ліній рису з інтрогресіями від *Zizania latifolia* Griseb., дикорослого спорідненого виду. Всі три лінії за відсотком метильованих сайтів впізнання певними рестриктазами перевершували реципієнтний генотип та за картою метилування одна від однієї відрізнялись. Метилувались як білок-кодуючі гени, так і транспозони. Внутрішньолінійної мінливості за метилуванням виявлено не було. Отже, наявність у геномі чужинного матеріалу, за думкою авторів, є промотором якогось додаткового метилування. В статті не наведено даних чи посилань на рівень метилування у відповідного вихідного гібрида чи амфідиплоїда. На наш погляд, висновок про промоторну роль інтрогресії в геномі щодо подій метилування у відсутності згаданої інформації не є переконливим, адже на початку створення інтрогресивних ліній була подія гібридизації.

Ковалентна модифікація гістонових протеїнів є другим, після метилування цитозинів, первинний механізм епігенетичного контролю експресії генів [695]. Ковалентним модифікаціям (переважно ацетилювання та метилування) піддаються певні амінокислоти N-кінцевих частин гістонів і варіювання за цими модифікаціями виявилось настільки значним та суттєвим для форматування хроматину, що було висунуто та підтверджено гіпотезу гістонового коду, який суттєво змінює транскрипційний статус хроматину та впливає на всі матричні процеси, які відбуваються з молекулами

ДНК[386,439,822]. Метилування ДНК та модифікація гістонів діють разом, здійснюючі складні та конструктивні взаємодії [855,872].

Модифікація гістонів разом з метилуванням ДНК призводить до зміни транскрипційної активності генів, і саме цей механізм може лежати в основі фенотипних змін, які спостерігаються у поліплоїдів у порівнянні з очікуваними на основі фенотипів батьківських видів. Перш за все, феномен ядерцевого домінування, показаний на міжвидових аллополіплоїдах *Arabidopsis* та *Brassica*, який полягає у замовчуванні рибосомальних генів одного з компонентів схрещування у міжвидових гібридах [180,458,660,672]. При цьому кодуючі послідовності рДНК зберігаються і експресія генів може відновитися за умовою зміни плоїдності ядра [180]. Було показано, що замовчування генів пов'язано зі зміною щільності метилування та специфічною модифікацією гістонів з наданням знаків транскрипційно неактивного хроматину у промоторній ділянці рДНК відповідного промотора [181,458]. Про пшеницю *T. aestivum* відомо, що локуси рДНК геномів А та D протягом еволюції гексаплоїда свою активність втратили. Наразі доведено експериментально, принаймні для геному А, що ця втрата активності локусу починається у 4-ій генерації штучних аллогексаплоїдів, що містять субгеном А, завершується до 7-ої генерації. Втрата активності пов'язана зі збільшенням метилування ДНК та утворенням на гістонах знаків неактивного хроматину (H3K27me3 та H3K9me2) з наступною елімінацією гетерохроматизованого локусу [329]. Отже, маємо приклад того, як епігенетичні зміни (метилування ДНК та модифікація гістонів) призводять до змін генетичних, елімінації локусу. Локус рДНК має повторювальну структуру. Для повторюваних ділянок геному взагалі показано їхню схильність до елімінації у аллополіплоїдному геномі [192,329,335,890]. Виходить, що в основі елімінації повторів можуть лежати попередні епігенетичні зміни.

Ресинтезовані поліплоїди *Brassica napus* характеризувались більш пізнім цвітінням порівняно з батьківськими видами. Встановлено, що більш пізнє цвітіння аллополіплоїдів арабідопсиса *A. thaliana*–*A. arenosa* у порівнянні з

батьківськими видами [844] було пов'язане з надекспресією гена *FLC*, який інгібує раннє цвітіння. Надекспресія викликала ацетилювання певних гістонів у зоні промотора з формуванням знаків активного хроматину [844]. До того ж аллотетраплоїд характеризувався збільшенням біомаси. Інша група авторів показала, що в його геномі відбулись епігенетичні зміни у центральних генах циркадного годинника (*CCA1*, *LHY*, *TOC1* та *GI*), які впливають на експресію підконтрольних їм генів, що продукують крохмаль та хлорофіл [630].

Зміни у статусі метилювання, як і ковалентна модифікація гістонів та РНК-інтерференція, є важливими механізмами, що призводять до зміни у експресії генів у гібридах та поліплоїдах у порівнянні з батьківськими видами [726].

1.1.3.4. Роль транспозонів у організації мінливості геному. У злаків транспозони складають більше 60–90% геному [722,855], зокрема, у м'якої пшениці – 90–95% [133,188]. Вони класифікуються у дві групи: ретротранспозони, клас 1, рухаються через посередництво молекули РНК, та транспозони, клас 2, рухаються як молекула ДНК [867]. В рослинах більша частина транспозонів є LTR-ретротранспозонами [274,668]. Транспозони передаються наступним генераціям клітин та організмів як гени, проте, як вважається [250], їхня експресія не є корисною для хазяїна. Навпаки, їхня транспозиція може бути для нього небезпечна. Показано, що мовчання TE суворо контролюється з боку хазяйського геному кількома шляхами [707,772] та є ефективні механізми їхньої елімінації з геному через делетування [840]. Тим не менш, TE є у геномах майже всіх біологічних видів [130,675]. За сучасними уявленнями, транспозони роблять внесок у формування структури геномів та їхнього функціонування під час еволюції [130,132,392,596]. У цілому рух транспозонів у геномі може спричинювати хромосомні розриви, нелегітимну рекомбінацію, та різноманітні хромосомні перебудови [772].

Щодо впливу на гени, транспозони можуть викликати інсерції, делеції (у сучасній літературі – indels), зсуви рамки зчитування, інверсії, дуплікації і транслокації – весь спектр внутрішньогенних мутацій [395,445,498,905].

Наявність/відсутність мутагенного впливу інсерції транспозона до гена залежить від місця його вбудовування [132]. Доведена роль транспозонів в утворенні нових генів. Так, в геномі арабідопсиса біля 1,2 % білок-кодуєчих генів мають у своїй структурі послідовності, гомологічні білок-кодуєчим послідовностям транспозонів обох класів [515]. Крім того, було виявлено злиття транспозонних послідовностей з регуляторними елементами генів, визначених відповідальними за «доместикацію» організмів [275,419,401,494,897]. Гени зі зміненою функцією можуть виникати в результаті перетасовування (shuffling) екзонів, а спричинюють перетасування транспозони [120,607]. Наявність власних регуляторних модулів у транспозонів пояснює, чому вбудовування транспозона поблизу білок-кодуєчих генів хазяйського геному може впливати на регуляцію їхньої експресії, отже, на фенотипному рівні викликати мутацію [266,272,700]. Регуляція експресії з боку TE може відбуватися як в *cis*- так і в *trans*-положеннях [872].

Ще Барбарою Мак-Клінток було висловлено переконання, що ті зміни в нуклеотидних послідовностях, що виникають при об'єднанні різних геномів в одному організмі та розглядаються як наслідок «геномного шоку», виникають через збільшення активності транспозонів [572]. Долю транспозонів в гібридах та поліплоїдах потрібно розглядати в трьох аспектах: зміна транскрипційної активності, зміна транспозиційної активності, зміна метилювання. Ми розглянемо наявні дані про транспозони у віддалених гібридах, аутополіплоїдах та аллополіплоїдах. Через накопичення даних про будову геномів аутополіплоїдів їх стали розділяти на дві групи: ті, в яких розмір геному при поліплоїдизації збільшується вдвічі, а хромосоми формують мультиваленти в мейозі, тобто гомологи не втрачають подібності. І аутополіплоїди, в яких розмір геному після аутополіплоїдизації зменшується, а мейоз диплоїдизується, тобто подібність між гомологами втрачається, як це буває у аллополіплоїдів [249].

Прикладом аутополіплоїда, в якого геном не редукується після поліплоїдизації, є аутотетраплоїд *A. thaliana*. Активності ретротранспозонів в них не виявлено, а ДНК-транспозони, навпаки, зареєстровано [544].

Сучасними дослідженнями роль ретротранспозонів у реструктуризації генома аллополіплоїдів [407544,631,657] та тих з аутополіплоїдів, які після утворення набувають диплоїдизованої кон'югації хромосом у мейозі [249], поступово з'ясовується. При вивченні геному тритікале методами IRAP та REMAP було виявлено зникнення майже 28% компонентів ампліфікації, властивих батьківським видам, та поява кількох нових компонентів (4%) [136]. В іншій роботі, де використовували ще й техніку ITAP (inter-transposon amplified polymorphism) кількості компонентів набагато більші, до 80 % та 17 %, відповідно [798].

Появу нових інсерцій ретроелемента відмічали у природного аллополіплоїда *Spartina anglica* [658], хоча констатовалась також і втрата елементів. При вивченні синтетичного аллотетраплоїда *B. napus* виявили неадитивність SSAP-спектрів у порівнянні з батьківськими, а за кількістю ДНК адитивність була. За припущенням авторів, це свідчить про індуковані транспозоном геномні перебудови, а не вставку нових копій елементу до геному [729]. На такому ж аллотетраплоїді на підставі збільшення кількості міРНК, які походять від транспозонів, було зроблено припущення про активацію транспозонів у амфідиплоїді [298]. Вивчення SSAP-спектрів аллополіплоїдів *Spartina* показало виникнення делецій за участю ретроелементів [80]. Збільшення копій ретротранспозона констатували у геномі ресинтезованого *Nicotiana tabacum* [665]. У цілому поки ще формується уявлення, що у аллополіплоїді зміни, пов'язані з рухом транспозонів, в більшому ступені зазнає субгеном більшого розміру незалежно від напрямку схрещування, і ці зміни є, переважно, втратами копій транспозонів [134,389]. Проте незважаючи на докази збільшення транскрипційної активності ретротранспозонів у аллополіплоїдів одразу після їхнього створення, відомостей про активацію їхнього руху в геномі немає [76,400,407,408,544],

якщо не враховувати приклад з ретротранспозоном *Viju*, 50 % яких делетувала негайно після створення поліплоїда, а в наступних генераціях відбувався вибух транспозиційної активності зі збільшенням кількості копій [442]. Щодо ДНК-транспозонів, на знову створених аллогексаплоїдах пшениці було виявлено рух такого транспозону [891]. Про пшеницю взагалі думають, що її виникнення свого часу супроводжувалось вибухом активності ретротранспозонів, тому що кількість їхніх копій у сучасному аллогексаплоїді не відповідає сумі ретротранспозонів у геномі прабатьків. Для порівняння вивчали аллополіплоїди *A. speltoides* x *T. urartu*, *A. sharonensis* x *T. monococcum*, *A. speltoides* x *A. tauschii* та *T. turgidum* x *A. tauschii* [483].

Активацію транспозонів, яка відбувається внаслідок гібридизації та поліплоїдизації, пов'язують з деметилюванням їхніх повторів [132,192,544,905]. У синтетичного аллотетраплоїда арабідопсиса було виявлено реактивацію ретротранспозона *Ty-1 copia-like* та двох транспозонів *En/Spm-like* [544]. Для останніх двох було показано зменшення їхнього метилювання у аллотетраплоїда арабідопсиса та відсутність змін у метилюванні у автотетраплоїда арабідопсиса [543]. Такі самі зміни у метилюванні в геномі алло- та автотетраплоїда виявлено для ДНК-транспозона *AtMu1* [544].

Метилювання транспозонів зменшує їхню експресію [499,772]. Припускається, що метилювання транспозонів для забезпечення їхнього мовчання є захисним механізмом хазяйської клітини проти геномних перебудов, яким може сприяти рух транспозонів, активованих у гібридному геномі [570]. В той же час було встановлено, що наявність навколо гена TE у метильованому стані (mTE) пригнічує експресію таких генів [498,508,560]. TE у гіпометильованому стані експресію гена не зменшували [357]. Цей механізм негайно було залучення для пояснення, чому один і той самий ген у різних видів (порівнювали *A. lyrata* та *A. thaliana*) експресується по-різному, гіпотезу було названо “trade-off” [358]. Її одразу було залучено до пояснення добре задокументованого до того часу феномена, що у віддалених гібридах та амфідиплоїдах алель одного з батьків може відрізнитися за експресією від алеля

того самого гена іншого з батьків аж до повного замовчування одного з них [280,324]. Це названо зміщеною експресією гомеологів (unbalanced homeolog expression bias). Цей феномен спостерігався як у сталих аллополіплоїдів, так і у знову створених [84,276,732,844]. За цією гіпотезою при об'єднанні двох геномів у гібриді чи аллополіплоїді один з них мав навколо певного гена більше мТЕ, ніж ортологічний ген в іншому геномі, і цим визначається зсув у інтенсивності їхньої експресії у об'єднаному геномі. Такий ген зі зменшеним рівнем експресії є більш придатним кандидатом на видалення з геному чи для неофункціоналізації (див. пункт. 1.1.2) [775]. Зміни у експресії стосуються і послідовностей, що кодують маленькі РНК [322,334]. Таким чином ТЕ бере участь в експресії не лише кодуючих елементів геному, а і у своїй власній експресії через RITS-шлях. Попри зрозумілість та привабливість цієї гіпотези, запропонований нею механізм організації зміщеної експресії ортологічних генів у поліплоїдах не може бути єдиним і є приклади на користь цієї думки [346,358]. Слід враховувати, що алель-специфічну експресію може забезпечувати імпринтинг, наявність різних епігенетичних маркерів у різних геномах, різна динаміка метилювання ДНК субгеномів у об'єднаному геномі [582]. До того ж, на геномі *A. thaliana* показано наявність великої кількості (3%) внутрішньогенних транспозонів, їхня участь у регуляції експресії генів також має враховуватися [460].

1.2. Інтрогресивна гібридизація як чинник штучного розширення генетичного пулу пшениці

Пшениця, яка культивується, представлена переважно сортами двох аллополіплоїдних видів: пшениця м'яка *Triticum aestivum* L, ($2n=42$, AABBDD) та пшениця тверда *T. turgidum* ssp. *durum* ($2n=28$, AABB), триба Triticeae, яка включає всього 150 видів з різними геномами та різними рівнями плоїдності [647]. Еволюційне походження згаданих видів пов'язують з міжвидовою гібридизацією (утворення амфігаплоїдів, гібридів F_1) з наступним подвоєнням

кількості хромосом та утворенням амфідиплоїдів [423,711,]. Для пшениці м'якої такі події відбувались двічі: утворення аллополіплоїда з геномом ВВАА (близько 0,5 млн. років тому [723]) та наступне утворення аллогексаплоїда ВВАADD 10 тис. років тому назад [268]. Перший гібрид виник від запилення егілопса секції *Sitopsis* (геном S подібний до В) пилом пшениці-однозернянки (геном А). І в багатьох сучасних статтях геном пшениці позначають як ВВАADD. В нашій роботі ми пишемо скрізь позначення ААВВDD, яке використовувалось раніше і наявне в оприлюднених нами статтях [5,16,58,106,371]. Припускається, що в утворенні гібридів брала участь невелика кількість гамет-зигот, і з цим пояснюють вузьку генетичну базу пшениць, що культивуються [311]. Хоча час від часу з'являються інші думки з цього приводу [251,271,479,556]. Генетичний пул сучасних сортів обмежений тією мінливістю, що властива комерційним сортам та місцевим зразкам чи лініям, які можна залучати до внутрішньовидової гібридизації [409,610]. Доволі давно було висловлено думку [608], що для розширення генетичного пулу пшениць можна залучити її численних родичів, в тому числі таких, що мають інші у порівнянні з пшеницею геноми. Ідея виявилась конструктивною, і за декілька десятків років геном пшениці м'якої та, меншою мірою, твердої були штучно доповнені генами (алелями), які природним чином цим видам притаманні не були. До генетичного пулу пшениці було введено гени стійкості до багатьох небезпечних хвороб, шкідників, толерантності до руйнівних абіотичних чинників довкілля, а також гени з позитивним впливом на якість зерна пшениці [52,58,156,198,283,310,640,682,696,738,742,760]. Наш огляд ми обмежимо інформацією лише про інтрогресію до геному пшениці м'якої.

1.2.1. Види *Triticeae*, що використовуються як джерело інтрогресій.

Види родини *Triticeae* щодо їхнього відношення до субгеномів пшениці м'якої, прийнято групувати у первинний, вторинний та третинний генетичний пул [215]. Види з первинної групи містять геном(и), гомологічні одному з субгеномів пшениці м'якої. Це місцеві зразки гексаплоїдних пшениць, тетраплоїди, що культивуються, дикорослий *T. dicoccoides* та диплоїдні донори

геномів А та D гексаплоїдної пшениці. Гени з представників первинної групи можна переносити до пшениці м'якої звичайними методами гібридизації, беккросування, добору [283]. Можна прямо схрещувати з цими видами пшеницю м'яку, а можна створювати проміжні амфідиплоїди, синтетичні гексаплоїдні пшениці (див. підпункт 1.2.2.2) [313]. На сьогодні найбільш значні інтрогресії до пшениці надійшли від видів первинного генетичного пулу з геномами D та A, набагато менше — від геному В (S). Цікавими в цьому плані є не лише диплоїдні (однозернянки), а і тетраплоїдні види пшениці, *T. dicoccum*, *T. dicoccoides*, *T. carthlicum* (всі з геномом AABB), а також гексаплоїд *T. spelta* (AABBDD). Вторинний генетичний пул міститься у поліплоїдних видах пшениці, що містять інші порівняно з *T. aestivum* геноми, а також види *Aegilops*, які містять хоча б один геном, спільний з *T. aestivum*. Сюди відносяться, наприклад, *T. timopheevi* (AAGG), *T. zhukovskyi* (GGAAAA), а також *Ae. speltoides* (SS) як прабатько геному В пшениці. Перенесення генів від таких видів через гомологічну рекомбінацію можливо, якщо цільовий ген локалізований у хромосомі, що має гомолога серед хромосом пшениці. Третинний генетичний пул складають види та роди пшеницевих, більш віддалені від пшениці м'якої, чим види вторинного пулу. Серед найбільш відомих *Secale cereale* (RR), *Hordeum vulgare* (HH), *Thinopyrum elongatum* (EE), *Th. bessarabicum* (J або J^b, або E^b), *Th. intermedium* (різні субгеноми JJEES). Їхні хромосоми не гомологічні пшеничним, тому тут не можна використати природну гомологічну рекомбінацію. Доводиться використовувати спеціальні методи індукції кон'югації гомеологів та утворення транслокацій [283,604]. Види третинного генетичного пулу широко використовуються як джерело інтрогресій, хоча і вимагають застосування спеціальних методів роботи, які не обмежуються лише гібридизацією та добором, як при застосуванні видів з хромосомами, гомологічними одному чи кільком субгеномам пшениці м'якої [200,283,610,612]. Сучасні огляди свідчать, що в цьому генофонді можна знайти алелі, що забезпечать стійкість для майже всіх головних стресів, яким піддається пшениця [195,516,611,637].

1.2.2. Різноманіття інтрогресивних ліній пшениці м'якої. Якщо вважати інтрогресивними не лише ті лінії пшениці, у геномі яких частина власного хроматину замінена на чужинний, а і ті, де чужинний хроматин доданий до резидентного, класифікувати інтрогресивні лінії просто: чужинно-додані, чужинно-заміщені, транслоковані, рекомбінантні та, звичайно, сюди відносяться штучно створені амфідиплоїди з залученням пшеничних геномів. Пшениця м'яка [738] та тверда [159] виявили значну толерантність до хромосомної інженерії усередині цих геномів і різноманіття інтрогресивних ліній пшениці велике.

1.2.2.1. Чужинно-додані та чужинно-заміщені лінії. Чужинно-додані лінії не всі вважають за інтрогресивні [523], оскільки вони мають чужинний хроматин на додачу до повного геному пшениці, а не замість його гомеологічної частини. Тем не менш, разом з віддаленими гібридами та чужинно-пшеничними амфідиплоїдами вони часто слугують необхідною сходинкою для здійснення інтрогресії за ланцюгом: чужинно-додані – чужинно-заміщені – транслокаційні (рекомбінаційні) лінії пшениці. У таблиці 1.1 ми навели список дисомних чужинно-доданих ліній, що про їхнє створення знайшли посилання у літературі. Список неповний, але, на нашу думку, репрезентативний в тому сенсі, що відбиває стан залучення до створення таких ліній різних представників *Triticinae*. Бачимо, що не створюються адитивні лінії з видами пшениць, а також з *Ae. tauschii* (саме на *T. aestivum*, якою наш огляд обмежений). Повні набори ліній, що містять доданою кожному хромосому з геному виду-донору, створені для *S. cereale*, *Haynaldia villosa* та кількох диплоїдних видів егілопсу, з яких власне і починався цей напрямок роботи з віддаленої гібридизації. Для двох тетраплоїдних егілопсів – майже повні набори. Значне розмаїття видів багаторічних родичів пшениці було залучено до віддаленої гібридизації, проте повних наборів чужинно-доданих ліній отримано не було, як не було їх створено і для деяких видів егілопсів. На наш погляд, є три причини такого стану справ. По-перше, за переконливими підрахунками А. Лукашевського, створення чужинно-доданої ліній за стандартною

методикою О'Мара через беккросування до пшениці м'якої її гібрида F_1 з амфідиплоїдом вимагає цитологічного контролю трьохсот нащадків від кожної моносомно-доданої рослини [523]. Так виходить через те, що імовірність входження унівалента до складу гамети не перевищує 0,25, а серед чоловічих гамет анеуплоїдні (22-хромосомні) функціонують з частотою 0,01 [744]. Якщо хромосом 7, скринуємо 2100 нащадків. Але перед цим нам ще потрібно переконатися, що сім моносомно-доданих ліній, з якими працюємо, містять хромосоми з різних гомеологічних груп, тобто вирішити проблему ідентифікації хромосом. Робота ця виявилась дуже працемісткою, а отримані лінії вимагали підтримання і постійного контролю їхньої автентичності. Крім того, створенню чужинно-доданих та чужинно-заміщених ліній пшениці заважали гаметоцидні гени (*Gc*), наявність яких у геномах егілопсів виявилась нормою. Ці гени було виявлено у *Ae. caudata*, 3C [254], *Ae. cylindrica*, 2C [257], *Ae. geniculata*, 4M [451], *Ae. sharonensis*, 2S та 4S [539], *Ae. triuncialis*, 3C [255], *Ae. longissima* 2S та 4S [539], *Ae. speltoides*, 2S та 6S [817]. Вони суттєво ускладнювали створення регулярних наборів ліній. Гетерозиготна за гаметоцидним геном рослина, а такі гетерозиготи є обов'язковим етапом створення ліній з чужинним додаванням чи заміщенням, формувала життєздатними лише ті гамети, які містили в своєму геномі ген *Gc*, решта гамет переважно гинула через утворення хромосомних розривів [624]. Тому інтерес до такого екстенсивного способу залучення чужинного генофонду до генетичного пулу пшениці м'якої зник. По-друге, багаторічні родичі пшениці, які виявилися дуже привабливими у якості джерела корисних генів, часто є поліплоїдними, і навіть створити повні амфідиплоїди пшениці з такими видами не вдавалось. Створювали часткові амфідиплоїди та ще виникала проблема з їхньою цитологічною стабільністю. Проблема цитологічної стабільності амфідиплоїдів виникає постійно, навіть при створенні амфідиплоїдів з геномом AABBDD у залежності від компонентів схрещування [586]. Навряд чи потрібно вказувати, наскільки зростала проблема ідентифікації хромосом від поліплоїдних видів у порівнянні з диплоїдними видами, а створення повного

набору від неповних ліній взагалі було задачею нереальною. Тому в таблиці 1.1 вказані види, вказано кількість ліній, а які саме ці лінії за гомеологічною належністю хромосом, інформацію ми знайшли не завжди. По-третє, коли починалась робота зі створення чужинно-доданих та чужинно-заміщених ліній провідною ідеєю було створення набору ліній, в яких будуть залучені певні частини чужинних геномів на тлі геному пшениці м'якої, тобто створення своєрідного компендіуму чужинної мінливості, яким потім зручно буде скористатися. Досвід роботи показав марність такої надії перш за все через встановлення факта генетичної нестабільності амфідиплоїдів та їхніх похідних. Як тільки були достатньо розроблені методи ідентифікації, в тому числі використання молекулярно-генетичних маркерів та гібридизації *in situ*, одразу з'явилися докази рекомбінантної (міжгеномної) природи доданих чи заміщених хромосом, переданих до пшениці від поліплоїдних видів, наприклад, пірію [339,853,854]. Крім того, підтримання штучно створених ліній хоча б в межах цитологічної стабільності також виявилось задачею непростою. Так, було показано, що в геномі чужинно-доданих ліній з хромосомами жита часто виникають транслокації, отже, геном перебудовується, лінії втрачають автентичність [295]. І до цього часу розвиток методів ідентифікації чужинного матеріалу у реципієнтному геномі, удосконалення методик отримання віддалених гібридів та амфідиплоїдів, стандартизація методів забезпечення рекомбінації негемеологічних ділянок хромосом змінило технологію роботи з продуктами віддаленої гібридизації. Замість створення набору ліній та наступної їхньої оцінки з вирішенням питання, як їх можна залучити у покращення пшениці, стали продукти гібридизації одразу сканувати на наявність бажаних ознак, а потім вивчати структури геномів цікавих ліній щодо кількості та якості чужинних включень [91,195,847,898]. Таким чином, створення наборів чужинно-доданих ліній має переважно історичне значення, хоча, звичайно їх за можливістю підтримують в кількох установах, які виконують функції генетичних банків [160,311,377].

Список 44-хромосомних ліній, в яких чужинні хромосоми додані до геному пшениці м'якої

Вид та геном	Характеристика набору	Метод ідентифікації чужинних хромосом	Посилання на джерело
<i>Ae. bicornis</i> , S ^b	3S ^b , 7S ^b		цит. за [760]
<i>Ae. biuncialis</i> , UM	2M, 3M, 7M, 3U, 5U	GISH, FISH	[733]
<i>Ae. comosa</i> , M	2M	За походженням	[708]
<i>Ae. cylindrica</i> , DC	13 ліній	C-забарвлення	[290]
<i>Ae. geniculata</i> (<i>Ae. ovata</i>) MU	Повний набір	За походженням	[290]
	6U	Ознака стійкості	[790]
<i>Ae. longissima</i> , S ^l	Повний набір	C-забарвлення	[288]
<i>Ae. markgrafii</i> (<i>Ae. caudata</i>), C	Лінії B-F	C-забарвлення	[287]
		SSR	[662]
	1 лінія	Ознака стійкості	[887]
<i>Ae. mutica</i> T	Лінії A, C, E, F	C-забарвлення	[282]
<i>Ae. neglecta</i> UM (<i>Ae. triaristata</i>)	Лінії 2, 5, 7-ої груп	RFLP	[115]
<i>Ae. peregrina</i> (<i>Ae. variabilis</i>) SU	11 ліній	За походженням	[230]
	28 ліній	RFLP, ізономи	[903]
	Кілька ліній	C-забарвлення	[289, 787]
<i>Ae. searsii</i> S ^s	Повний набір	C-забарвлення	[669, 289]
<i>Ae. sharonensis</i> S ^{sh}	2S, 3S, 5S, 7S+4S(4D)	За походженням	[589, 592]
	Повний набір		цит. за [920]
<i>Ae. speltoides</i> S	Повний набір	RFLP	[286]
<i>Ae. umbellulata</i> U	1U, 2U, 5U, 6U, 7U	C-забарвлення,	[425]
	Повний набір крім 3U	GISH	[283]
<i>Ae. uniaristata</i> N	1N, 3N, 4N, 5N, 7N	RFLP, RAPD, SSR	[376]
<i>Ae. ventricosa</i> DN	7 ліній	Ознаки стійкості, за походженням	[211]
<i>Agropyron cristatum</i> P	6P	Молекулярні маркери	[176, 196, 339, 874]

Продовження табл. 1.1

Вид та геном	Характеристика набору	Метод ідентифікації чужинних хромосом	Посилання на джерело
<i>Agropyron cristatum</i> , P	2P	GISH, молекулярні маркери	[196,472,481]
<i>Agropyron cristatum</i> , P	7P	Молекулярні маркери	[478]
<i>Dasypyrum breviaristatum</i> V ^b	Кілька ліній	C-посмугованість, гібридизація <i>in situ</i>	[904]
	Моно-5V ^b	FISH, ПЛР-маркери	[919]
	7V ^b	FISH, ПЛР-маркери	[468]
<i>Elymus ciliaris</i>	12 ліній		цит. за [160]
<i>Elymus rectisetus</i> S ^t Y ^W	3 лінії (1-ої та 5-ої груп)	FGISH, RFLP, запасні білки	[571]
	1Y	Ознака стійкості	[639]
	1 St	FISH, GISH, молекулярні маркери	[224]
<i>Elymus trachycaulus</i>	24 лінії		цит. за [160]
<i>Leymus mollis</i> N ^s X ^m	3 лінії	FISH, GISH, молекулярні маркери	[901]
	Дисомно-додана лінія 7-ої групи	FISH, GISH, молекулярні маркери	[902]
	Подвійна моносомно-додана лінія з хромосомами 2-ої та 3-ої груп	FISH, GISH, молекулярні маркери	[898]
<i>Leymus racemosus</i> N ^s X ^m	17 ліній	Ознаки стійкості	[427,792,848]
	2Lr	Ознака стійкості	[598]
	7Lr	Кількісні ознаки колосу	[687]
<i>Haynaldia villosa</i> V	Повний набір		[525]
<i>Thinopyrum intermedium</i> ES ^t S	49 ліній	GISH	[118,800]
	7St, 7E, 2Ai	FISH	[117,752,854]
	2St	EST-SSR	[394]

Продовження табл. 1.1

Вид та геном	Характеристика набору	Метод ідентифікації чужинних хромосом	Посилання на джерело
<i>Psathyrostachys huashanica</i> Ns	Моносомно-додана лінія 3Ns	GISH, SSR, C-banding	[403]
	Дисомно-додана лінія 6Ns	GISH, SCAR, EST-SSR, EST-STS	[847]
	Дисомно-додана лінія 5Ns	Ознака стійкості, кількісні ознаки	[233,234]
<i>Psathyrostachys huashanica</i> Ns	Подвійна дисомно-додана лінія 5Ns-6Ns	FISH, GISH	[916]
	Дисомно-додана лінія 2Ns	Молекулярні маркери	[232]
<i>Secale africanum</i> R ^{af}	2R	Ознаки стійкості, морфології	[461]
<i>S. cereale</i> , R	Повний набір, сорт "Imperial"	За походженням	[231]
	Повний набір, сорт, "Blancol"	За походженням	[525]
<i>Secale cereanum</i>	1R, 4R, 6R	GISH, FISH, SSR-маркери	[734]
<i>Thinopyrum bessarabicum</i> JE ^b	5Eb	GISH, ознаки стійкості	[923]
	7J	Ознака стійкості	[887]
<i>Thinopyrum elongatum</i> EJ ^e	7 (1Ee – 7Ee)	Молекулярні маркери	[455]
<i>Th. junceum</i> J1J2E	Кілька ліній	Ознаки стійкості	[165]
	Хромосома 4-ої групи	EST-SSR	[853]
	Хромосома 2-ої групи	Ознака стійкості	[571]
	Одна лінія	Ознаки стійкості	[887]
	13 лінії (1-ої, 2-ої, 4–6-ої груп)	FGISH, RFLP, запасні білки	[571]

Стандартна технологія створення чужинно-заміщених ліній включає схрещування чужинно-доданої лінії з набором моносомних ліній. Чужинна хромосома займає місце пшеничної, яка відсутня у моносоміка. Якщо чужинна хромосома компенсує відсутність пшеничної, вважають, що між цими хромосомами існує гомеологія [740]. Власне, саме це стало методом рознесення хромосом родичів пшениці за гомеологічними групами. Можливо, це головне значення створення чужинно-заміщених ліній, тому що інтерес до них як хранителів чужинної генетичної інформації зменшується разом зі спрощенням роботи з отримання та ідентифікації невеликих за обсягом чужинних включень до геному пшениці м'якої, що забезпечують розвиток бажаної ознаки. Чужинно-заміщені лінії (табл. 1.2), як і чужинно-додані, в жодному випадку не мали безпосереднього комерційного значення, хоча і відомо кілька сортів з заміщенням 1R(1B) (Neuzucht, Salzmunde Bartweizen, Saladin [912]), які свого часу були взяті до схрещувань та слугували джерелом широко розповсюдженої у сортах транслокації 1BL.1RS. Пізніше було встановлено, що заміна цілою хромосомою 1R будь якого гомолога пшениці з 1-ої групи призводить до формування слабких рослин з редукованою насінневою фертильністю [424]. А коли у заміщенні бере участь лише коротке плече 1RS жита, лінії з будь-якою транслокацією, 1BL.1RS, 1DL.1RS і, особливо, AL.1RS характеризуються збільшеною масою коренів [246]. Виникло припущення, що саме це є причиною збільшення продуктивності сортів пшениці з транслокацією 1BL.1RS [839]. Схоже, що будь яке чужинне-пшеничне заміщення не залишається нейтральним щодо агрономічно-суттєвих ознак, тому зменшення кількості чужинного хроматину до такого мінімуму, щоб бажана ознака розвивалась, а всі небажані наслідки включення чужинного хроматину зникали, стало головною проблемою у інтрогресивній гібридизації.

Список 42-хромосомних ліній, в яких пара пшеничних хромосом заміщена парою чужинних

Вид та геном	Характеристика набору	Метод ідентифікації чужинних хромосом	Посилання на джерело
<i>Ae. comosa</i> , M	2M(2A), 2M(2B), 2M(D)	C-забарвлення	[708]
<i>Ae. longissima</i> , S ¹	Повний набір	C-забарвлення	[288]
	A, C, D	C-забарвлення	[627]
	5S(5A), 5S(5B), 5S(5D)	Ізоферменти	[593]
<i>Ae. markgrafii</i> , (<i>Ae. caudata</i>) C	5C(5A), 5C(5D)	C-забарвлення	[287]
<i>Ae. mutica</i> T	3 лінії 7-ої гомеологічної групи		[261]
	Кілька ліній 5-ої гомеолог. групи	SSR-маркери	[374]
	1,2,5,6,7 хромосоми геному T замість D-хромосом	Морфологічні маркери, SSR-маркери	[373]
<i>Ae. searsii</i> , S ^S	Повний набір	C-забарвлення	[291]
<i>Ae. sharonensis</i> , S ^{sh}	4S(4A), 4S(4B), 4S(4D)	C-забарвлення	[592]
	1,2,4,6,7 хромосоми геному S ^{sh} замість D-хромосом	Морфологічні, біохімічні маркери	[16]
<i>Ae. speltoides</i> S	1,2,3,4,6,7 хромосоми геному S ^{sh} замість D-хромосом	Морфологічні, біохімічні маркери	[16]
<i>Ae. tauschii</i> D	Повний набір	SSR	[663]

Продовження табл. 1.2

Вид та геном	Характеристика набору	Метод ідентифікації чужинних хромосом	Посилання на джерело
<i>Ae. umellulata</i> U	1,2,3,4,6,7 хромосоми геному S ^{sh} замість D-хромосом	Морфологічні, біохімічні маркери	[16]
<i>Ae. uniaristata</i> , N	3N(3A), 3N(3B), 3N(3D)	За походженням	[590]
<i>Secale cereale</i> , R	Набір з заміщенням D-хромосом	C-забарвлення	[284]
<i>S.africanum</i> , R ^a	5R ^a (5D)	GISH, FISH	[467]
<i>Ae. geniculata</i> (<i>Ae. ovate</i>), MU	5M ^g (5D)	GISH	[2216]
<i>Ae. peregrina</i> , (<i>Ae. variabilis</i>) SU	Кілька ліній неідентифікованих		[787]
	G (2A), G (2B), E (5B)	C-забарвлення	[760]
<i>Ae. kotschyi</i> , SU	2S(2A), 7U(7A)	GISH, FISH, SSR	[1815]
<i>Ae. neglecta</i> UM (<i>Ae. triaristata</i>)	5U ^t (5A)	GISH	[79]
<i>Ae. umbellulata</i> , U	1U, 2U, 5U, 7U	За походженням	[709]
<i>Ae. ventricosa</i> DN	4M ^v (4D)	C-забарвлення	[211]
<i>Agropyron cristatum</i> , P	6P(6D)	GISH, молекулярні маркери	[874]
	1P(1A)	GISH, молекулярні маркери	[654]
<i>Elymus trachycaulus</i> , StH	3 лінії		цит. за [160]
<i>Leymus racemosus</i> , NsXm	7Lr#1S(7A) (дителосомна)	Цитологічні методи	[848]

Продовження табл. 1.2

Вид та генотип	Характеристика набору	Метод ідентифікації чужинних хромосом	Посилання на джерело
<i>Leymus mollis</i>	3D(3Ns)	GISH, FISH, SSR, EST-STS	[655]
	1D(1Ns)	GISH, FISH	[934]
	7Ns(7D)	GISH, FISH	[900]
<i>Thinopyrum elongatum</i> , E або J ^e	3E(3A,D,D)	Ознака стійкості	[643]
	7E(7A,D)	Ознаки стійкості	[864]
	7E(7A,B,D)	PCR-markers	[758]
	Кілька заміщень з хромосомами 1E, 2E, 3E, 6E	Ознаки стійкості	[92]
<i>Thinopyrum intermedium</i> , EE st St	18 ліній	C-забарвлення, молекулярні маркери	[292,932,495]
	1 st (1D)	FISH	[364]
	Хромосоми 4-ої групи	Ознаки стійкості	[474]
<i>Thinopyrum ponticum</i> , EE st	6Ag(6A)	За походженням	[430]
	7Ag(7D) (Agrus)	За походженням	[750]
	39 ліній	Молекулярні маркери	[475]
	Кілька ліній	FISH, GISH	[767]
	4Ag(4D)		цит. за [938]
<i>Thinopyrum bessarabicum</i> , J	5E ^b	За походженням	[547]

Вказаний шлях створення чужинно-заміщених ліній з використанням моносомів (або нулісомів за їхньої наявності) спочатку був головним та застосовувався частіше за все. Його суттєва перевага перед іншими шляхами полягає у одночасному визначенні гомеологічної належності чужинної хромосоми. Інші способи створення чужинно-заміщених ліній – метод «комбінування» чи «змішування» хромосом третього субгеному в гібриді між гексаплоїдним амфідиплоїдом та сортом пшениці [15,36,99,811], використання

гібридів між гексаплоїдним тритікале та пшеницею м'якою [756,769], беккросування гібриду між амфідиплоїдом та пшеницею м'якою до пшениці м'якої з обов'язковим слідкуванням за збереженням цільової ознаки [373,477], вимагають додаткової роботи з ідентифікації чужинних хромосом, які замінили хромосоми пшениці. Крім того, створення заміщених ліній стало можливим з застосуванням просто гібридів пшениці м'якої з віддаленими родичами з наступним беккросуванням до пшениці для відновлення фертильності та наступною ідентифікацією наявних чужинно-пшеничних заміщень [815]. На наш погляд, цей спосіб створення чужинно-заміщених ліній за логікою подій є той самий, що і метод Є. Жирова з комбінування хромосом усередині гібридного геному штучного гексаплоїда [36]. Результативність роботи залежить від наявних методів ідентифікації чужинних хромосом і, що особливо важливо, існує можливість створення множинних заміщень [5,16,380,891,935], на важливості чого особливо наполягав Є. Жиров [36].

Коли чужинно-заміщена лінія створюється без застосування моносомної лінії, а таких технологій стає все більше, одразу постає питання ідентифікації гомеологічної належності чужинної хромосоми. Така ідентифікація спочатку здійснювалась за допомогою морфологічних [11,14,22,57,103,164,278,372,593], біохімічних маркерів [9,11,38,56,278,302,331,344,661,787,886,888], цитологічних методів [283,284,769]. Після розробки численних молекулярно-генетичних маркерів [176,202,339,388,427,614,754,769,770,816,920] молекулярних зондів до специфічних локусів [176,340,471,766,853,885,921,930], технології цитологічних досліджень з застосуванням флюоресцентної та геномної *in situ* гібридизації [13,336,338,388,769,782,800] ідентифікація заміщеної хромосоми стала питанням вибору методу ідентифікації та, на наш погляд, значно спростило всю процедуру інтрогресії до геному пшениці [203,297,339,472,636, 691,692,847,906,922,937]. Після того, як було практично втрачено інтерес до створення наборів ліній з чужинними хромосомами, доданими до геному пшениці м'якої чи такими, що заміщують одну з хромосом реципієнтного геному, головні зусилля було зосереджено на отриманні ліній з

чужинними транслокаціями, які несуть бажаний генетичний матеріал, але позбавлені такого хроматину, який погано впливатиме на агрономічні ознаки сортів, що будуть створені за участю таких транслокацій. Хоча чужинно-додані та чужинно-заміщені лінії як і раніше залишаються перехідним рослинним матеріалом, з яким працюють для отримання транслокацій чи рекомбінацій. Їх створюють та описують [232–234,396,468,472,478, 481,654,847,916,919]. З'являються нові різновиди чужинно-заміщених ліній, наприклад щойно описано створення ліній пшениці м'якої з заміщенням плечей дикорослого емеру (chromosome arm substitution lines, CASLs). Крім практичного значення, якого ми завжди чекаємо від ітрогресивних зразків, різноманіття створених ліній дало чималий внесок у вирішення різноманітних питань з генетики та молекулярної біології Triticinae, і коло цих питань розширюється [396,476].

1.2.2.2. Синтетичні гексаплоїдні пшениці як проміжні форми.
Синтетичні гексаплоїдні пшениці (synthetic hexaploid wheats, SHW) отримують від схрещування тетраплоїдної пшениці з диплоїдними видами, які свого часу слугували джерелом субгеномів пшениці м'якої— А, В, D. Для схрещування використовують *T. turgidum*, рідше *T. dicoccum*, *T. dicoccoides*. Робота розпочалась у 80-ті роки на тетраплоїдній пшениці та егілопсі Тауша [313]. У якості батьківського компонента схрещування досі частіше за все використовують *Ae. tauschii*. [637]. Рідше гексаплоїдні синтетики створюють з використанням видів з геномом А (*T. boeoticum*, *T. monococcum*, *T. urartu* [187,252]) і зовсім рідко — з геномом В(S) *Ae. speltoides* та інших видів секції Sitopsis [409]. Очевидно, це пояснюється перш за все тим, що хромосоми геному D *Ae. tauschii* та D-хромосоми пшениці м'якої рекомбінують вільно, чого не можна сказати про хромосоми А та В геномів. Диплоїдний прабатько останнього геному взагалі так і не ідентифікований, хоча ним частіше за все вважають *Ae. speltoides*. А хромосома 1А, 3А, 5А [528] та 4А [171] поліплоїдних пшениць не кон'югують з гомологами диплоїдних видів, скоріш за все через перебудови.

Роботу зі створення синтетичних пшениць з геномом ABD розпочали у 80-ті роки на основі колекцій зразків *Ae. tauschii*, зібраних Н. Вавіловим, Х. Кіхарою, Е. Лагудахом [311], і на сьогодні створено певну кількість ліній, які мають агрономічну цінність завдяки генам егілопса Тауша, перенесених від егілопса до пшениці саме через синтетичні пшениці. Тільки у CIMMYT таких гексаплоїдних синтетиків було створено 1500, ярих та озимих, з застосуванням 900 зразків егілопса Тауша [637]. Хоча, за сучасним переконанням, походження пшениці м'якої є поліфілетичним та пов'язаним з утворенням принаймні двох різних популяцій [271], генетичне розмаїття виду *Ae. tauschii*, джерела субгенома D, перевищує значно такий показник сучасного субгеному D пшениці м'якої [581], і робота з гексаплоїдними синтетиками виявилась дуже перспективною за результатами. Оскільки синтетичні гексаплоїдні пшениці часто мають небажані алелі певних генів та є слабо адаптованими у агрономічному аспекті, вони, як і всі інші амфідиплоїди, не можуть одразу стати сортами, а використовуються при беккросуванні з елітними сортами пшениці для продукування ліній, отриманих від синтетиків (synthetic derived lines, SDLs) [409]. На базі синтетиків з геномом егілопса Тауша було отримано лінії, стійкі до листової іржі, септоріозу (збудник *Septoria tritici* Rob. ex Desm.), сажки (збудник *Tilletia indica* Mitra), пшеничного кліща (*Eriophyes tulipae* Keifer), гессенської мухи (*Mayetiola destructor* Say) (цит. за [697], злакової попелиці (*Schizaphis graminum* Rondani) [198,459]. Крім того, у 80-тих роках над створенням подібних ліній працював Йорра з застосуванням пшениці твердої [399]. Він використовував спонтанні SHW-лінії від частково фертильних гібридів між пшеницею твердою сорту Langdon та різними зразками *Ae. tauschii*. Було отримано лінію Largo, стійку до злакової попелиці [398]. Ген стійкості *Gb3* з Largo було інтрогресовано до комерційних сортів пшениці м'якої [459]. Пізніше серед синтетичних ліній Langdon–*A. tauschii* було знайдено джерела стійкості до фузаріозу [640], стеблової іржі, збудника *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs., збудника *Phaeosphaeria nodorum* (E. Mull.) Hedjar), а також до гессенської мухи [294].

SHW, також, як інші амфідиплоїди, пшенично-чужинні додані та заміщені лінії не можуть безпосередньо використовуватися як сорти через наявність у чужинній хромосомі разом з бажаним геном відчутної кількості генів, що погано впливають на агрономічні властивості сорту (linkage drag). Крім того, чужинні хромосоми можуть поступатися пшеничним у стабільності передачі наступній генерації [156,198,390]. Проте охарактеризований рослинний матеріал є саме тими зразками (cytogenetic stocks), які можна оцінити на наявність бажаної ознаки, відібрати необхідні лінії та працювати з ними далі для зменшення обсягу чужинного хроматину [172,177,283,390,448,634,636,682,742,886].

1.2.2.3. Лінії з транслокаціями. Спосіб редукції обсягу чужинного хроматину у інтрогресивних зразках залежить від геномної належності чужинної хромосоми. Якщо її взято з такого геному, якому є гомолог серед трьох субгеномів пшениці, можна сподіватися на рекомбінацію між гомеологічними хромосомами. В цьому плані найбільш перспективним матеріалом є синтетичні гексаплоїдні пшениці (попередній пункт огляду). Якщо гомології між чужинною та пшеничними хромосомами немає, чужинну хромосому потрібно використати як джерело транслокацій її частин на хромосоми пшениці. З'явився та поширюється термін *segmental introgression lines* [160]. На наш погляд, термін своєчасний. Він дозволяє не розрізняти спосіб дімінуції чужинного хроматину, рекомбінація чи транслокація, а зосереджує інформацію лише на наявності у пшеничній хромосомі чужинного сегменту.

Як будь-які мутації, транслокації прийнято розрізняти на спонтанні та індуковані. Серед спонтанних найчастіший тип – робертсонівські (центричні), коли дві хромосоми розриваються біля центромери і об'єднуються плечі різних хромосом. Е. Сірсом було показано [661,662], що у пшениці унівалентні хромосоми схильні до продукування таких транслокацій. Спонтанні транслокації до геному пшениці м'якої було зареєстровано від *S. cereale* [911], *Th. ponticum* [576], *Ae. markgrafii* (*Ae. caudata* L.), *Ae. comosa*, *Ae. longissima*

(цит. за [760]), *Ae. kotschyi* та *Ae. peregrine* [553,554], *Ae. triuncialis* [449,562,716], *Th. intermedium* [349,529], *Psathyrostachus huashanica* [403], *Elymus repens* [914], *Leymus mollis* [480,636]. Звичайно, були зареєстровані та наводяться тут лише ті з них, які було ідентифіковано через наявність в їхньому складі генів стійкості до хвороб чи шкідників.

Для індукції транслокацій використовують два способи: фрагментація хромосом з випадковим об'єднанням утворених фрагментів та кон'югація гомеологічних хромосом. Історично перший спосіб – використання іонізуючого опромінення для розриву хромосом за центромерою з наступним випадковим об'єднанням плечей [741,742]. Опромінення пилку дало змогу створити першу лінію з егілопсно-пшеничною транслокацією від егілопса зонтичного з геном стійкості до листової іржі *Lr9* [741], пшенично-пирійну транслокацію з геном *Sr26* [430], пшенично-житню транслокацію *Transec* [229], транслокацію *1RS.1AL* з геном *Pm21* (цит. за [579]), транслокацію з геном *Gb5* від *Ae. speltoides* [861], транслокацію *Ahata* з геном *Lr19* із заміщеної лінії *Argus 7(7D)* за участю хромосоми *Th. ponticum* [750], кілька пшеничних ліній з транслокацією від хромосоми *2P (Agropyron cristatum)* на хромосоми пшениці *1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A, 3B, 5B, 7B, 1D, 4D, 6D* [473], хромосоми *7P* на хромосоми *2A, 3A, 5A, 7A, 3B, 5B, 7B, 7D* [516]. Недоліками методу вважаються великий обсяг перенесеного хроматину (зазвичай плече) та негомеологічність транслокації. Пізніше на прикладі транслокації *6VS/6AL* від *D. villosum* було показано, що гамма-опромінення може бути успішно застосовано для подальшої редукції розміру чужинного хроматину [177]. Крім того, можна навести приклад вдалого застосування іонізуючого опромінення для редукції транслокації *6DL.6VS* з геном *Pm21 H. villosa* у складі пшеничного геному [174], створення транслокацій *T5VS.5AL* та *T5VS.5DL* від *D. villosum* з геном *Pm55*. Перша з них також підсилює м'якість пшеничного борошна [927].

Сучасні автори, аналізуючи способи індукції транслокацій, розглядають індуквані опроміненням транслокації як такі, що мало відрізняються від спонтанних як за частотою, так і за результативністю щодо впливу

транслокацій на фенотип рослин, та відмічають велику кропотливість щодо обсягу цитологічних досліджень для добору оптимальних транслокацій [167, 311,523]. Тим не менш, за оприлюдненими результатами, напрям інтрогресивної гібридизації пшениці через залучення транслокацій з цільовим геном є результативним, отже перспектива цього напрямку не втрачається.

Щойно оприлюднено статті про досить новий напрямок застосування гамма-опромінення у роботі з інтрогресивним матеріалом. Хоча створення делеційних ліній для фізичного картування хромосом родичів пшениці запроваджено вже давно [111,684], залучення гамма-опромінення для отримання наборів делеційних ліній, де до пшеничного геному додавались частково і по-різному делетовані хромосоми *Agropyron cristatum* 2P [472], 6P [783,784] та 7P [518] дали початок набору бін-ліній хромосом родича пшениці, цікавого для інтрогресивної гібридизації. Для скринування ліній застосовували різні відомі на сьогодні молекулярні маркери. Цей матеріал було успішно використано для фізичного бін- картування гена стійкості до борошнистої роси, який містила хромосома 2P [472], гена стійкості до стеблової іржі на хромосомі 6P [931] та гена, що сприяв підвищенню маси тисячі зерен на хромосомі 7P [518]. Подібну ж роботу виконано для хромосоми 4J *Th. bessarabicum*, створюючи хромосомні аберації з використанням гамма-опромінення [679].

Розроблено спосіб генетичної фрагментації хромосом з використанням гаметоцидних хромосом з геном *Gc*, який викликає розрив хромосом у гаметах гібрида, гетерозиготного за цим геном. Розриви відбуваються лише у гаметах, позбавлених цього гена [42,226]. Такі гамети продукуються рослиною, гетерозиготною за геном *Gc*. Проте фрагментуються не лише чужинні, а і пшеничні хромосоми. Тому за ефективністю цей спосіб наближається до використання опромінення, тобто спирається на пошук оптимальної події серед великої множини тих, що відбулися. Вже створено значну кількість житньо-пшеничних та ячмінно-пшеничних транслокацій з використанням гаметоцидної хромосоми [566], а також ліній з транслокацією хромосоми 1P (*Agropyrum cristatum*) при схрещуванні дисомно-доданої за цією хромосомою лінії з

дисомно-доданою лінією за гаметоцидною хромосомою 2С виду *Ae. cylindrica* [473].

Фрагментація хромосом, як фізична (опромінення), так і генетична (ген *Gc*), не виявилась поки помітно ефективною щодо можливості отримувати генетично збалансовані інтрогресивні лінії [107,523,563]. Можливо, найбільш вдалим виключенням є транслокація з геном *Lr9* від *Ae. umbellulata*, отримана через опромінення [741].

Спостерігаючи за результатами перенесення чужинних хромосомних сегментів на хромосоми пшениці, ми відмічаємо дві особливості. По-перше, частота чужинних транслокацій якимось чином пов'язана з гомеологічною групою [283] та субгеномом пшениці [692]. По-друге, транслокації відбуваються або як робертсонівські, тобто перенесення цілого плеча, або як термінальні [293,500,636,739,741]. В літературі можна знайти пояснення обох особливостей. Якщо у геномі відсутній ген *Ph1*, гомеологічні хромосоми можуть кон'югувати та, отже, рекомбінувати. Проте частота та і сама можливість кон'югації залежить не лише від подібності хромосом за вмістом, а і від їхньої структури також. Так, було показано, що хромосоми 1А, 3А та 5А одностернянки з геномом A^m нормально кон'югують зі своїми гомологами у геномі пшениці м'якої лише у відсутності гена *Ph1* і дуже рідко за його наявності [528]. Отже, ці хромосоми геному одностернянки та геному пшениці м'якої розрізняються за структурою. Різні хромосоми геному *R. S. cereale* відрізняються від гомеологів пшениці за своєю структурою по-різному, і частота кон'югації та рекомбінації таких хромосом різна [622]. В обох випадках слід очікувати зменшення імовірності кон'югації таких хромосом та перенесення чужинного фрагмента на пшеничну хромосому. За результатами вивчення структури геному двох тетраплоїдних видів егілопсу висловлено припущення [601], що ділянки хромосом, збагачені на повтори, зокрема, мікросателітні, частіше бувають задіяними у хромосомних перебудовах, в тому числі транслокаціях. Звичайно, все це може стосуватися не лише хромосом жита, егілопсів чи одностернянки і пояснює цілком переконливо першу

особливість інтрогресій до геному пшениці, адже хромосоми різних гомеологічних груп мають різні характеристики та різний генетичний вміст. Крім того, з розвитком цитологічних та молекулярно-генетичних методів характеристики окремих хромосом геному стало зрозумілим, що деякі хромосоми пшениці м'якої перебудовані за рахунок реципрокних транслокацій у порівнянні з прабатьківськими хромосомами [588]. До того ж, перший скринінг потенційних носіїв чужинних транслокацій (нащадки гібридів, амфідиплоїдів, тощо) здійснюється за фенотипом за певними цільовими ознаками. На першому місці була та залишається стійкість до біотичних та абіотичних чинників. Можна думати, що частина транслокацій залишаються невідібраними, отже, не ідентифікованими щодо локалізації, загалом втраченими, і це не може не впливати на результат вивчення множини транслокацій щодо гомеологічного таргетінгу.

Друга особливість (або робертсонівські, або термінальні транслокації) цілком пояснюється самим механізмом рекомбінації між хромосомами. Гомеологічна рекомбінація базується на поодинокому кросинговері, подвійні події дуже рідкісні [743]. Поодинокі рекомбінації двох хромосом, чужинної та резидентної, призводять до утворення двох продуктів: пшеничної хромосоми з термінальним сегментом чужинної та чужинної хромосоми з термінальним сегментом пшеничної. Якщо розрив відбувається біля центромери, отримуємо робертсоновські транслокації, якщо усередині плеча – термінальні. Термінальні транслокації можуть утворюватися як на одному плечі, так і на обох.

Перспективу у інтрогресії генів до геному пшениці ми звикли пов'язувати з генами стійкості до стресових чинників доквілля, перш за все біотичних. Звичною та зрозумілою є думка, що агрономічно значущі ознаки, пов'язані з продуктивністю, навряд чи вдасться покращити за допомогою інтрогресій [198,850]. Зараз, коли накопичено велику кількість інформації про структуру геномів та гомеологію хромосом пшениці та її родичів та розроблено методи цільового перенесення невеликих обсягів чужинного хроматину, знов прокинулася надія за допомогою чужинної плазми покращувати пшеницю не

лише за ознаками її стійкості до стресів. Як симптоматичну в цьому плані можна розглядати серію робіт з видом *Agropyron cristatum*, геном Р. У його хромосомі 6Р на чужинно-доданих [339,874] та транслокованих [512,522,782] лініях було локалізовано кілька QTL з позитивним впливом на ознаки кількість продуктивних стебел та кількість зерен на колос [203,397,522,906], довжина колосу та маса тисячі зерен [922], а також на стійкість до борошністої роси [519], листкової іржі [636]. Транслокація хромосоми 7Р також позитивно вплинула на масу тисячі зерен [518]. Всі транслокації були невеликого обсягу. В той же час серед нащадків амфідиплоїда пшениця-*Th. bessarabicum* було ідентифіковано лінію з транслокацією 2J^s.2В з більш фертильним, у порівнянні зі звичайним пшеничним, колосом, більш довгим колосом, більшою кількістю зернівок на колос, у цілому – більш продуктивним [686]. Недолік лінії – пізні цвітіння, так що над вмістом доданого чужинного хроматину та втраченого пшеничного потрібно ще працювати. Транслокаційна лінія T2VS.2DL (донор транслокації – *D. villosum*) характеризується більш довгим колосом [926]. Створено лінію пшениці з невеликою транслокацією від *Psathyrostachys huashanica* на хромосому 5DS з підвищеною кількістю зерен на колос та стійкістю до жовтої іржі [406]. К. Цеолоні [158] вдалось об'єднати у одній лінії стійкість до фузаріозу від хромосоми 7EL *Th. elongatum* та підвищену продуктивність рослин за рахунок інтрогресії від на хромосомі *Th. ponticum* на хромосому 7DL пшениці.

Осмислення результатів робіт, націлених на отримання транслокацій чужинного хроматину на хромосоми пшениці з метою внесення до її геному корисних для агрономічних властивостей генів, показує, що явно позитивних результатів, без того, що називається тепер linkage drag, мало. Тобто отримати транслокаційну пшеничну лінію, стійку, наприклад, до певної хвороби – це перший крок успішної інтрогресивної гібридизації. А передати цей ген до геному лінії, яка пройде сортовипробування – це крок другий і відстань між цими двома кроками іноді буває нездоланною. Дуже виразний приклад – інженерія транслокації 1BL.1RS та інших за участю того самого житнього

плеча. Сорти (перші – Аврора, Кавказ та потім багато інших, за даними [690] більше 300 сортів у світі) спочатку характеризувались стійкістю до грибних хвороб листя та підвищеною продуктивністю. Але з самого початку показували знижені хлібопекарські властивості через наявність локусу *Sec-1* [933]. Тому над «покращенням» цієї транслокації працювали здавна та багато. Лукашевський [526,527] один з провідних дослідників, хто цим займався, писав, що до того часу, як вдалось видалити локус *Sec-1*, включити локуси *Gli-B1* та *Glu-B3*, залишивши при цьому кластер генів стійкості, ці гени стійкості стали вже непотрібними, адже з'явилися раси, до них вірулентні. Однак з цією транслокацією до пшениці м'якої потрапили також гени стійкості до злакової попелиці [567] та ячмінної попелиці [456]. Крім того було з'ясовано, що підвищена продуктивність генотипів з транслокацією скоріш за все пояснюється житнім локусом, який забезпечує підвищену біомасу коренів, а він тісно зчеплений з локусом *Sec-1* [753]. Отже, інтерес до цієї інтрогресії зберігається і процес отримання нових транслокацій з плечем 1RS став перманентним [488,609,933]. У недавній статті [487] описана зовсім інша можливість вирішення проблеми: ідентифіковано нову транслокацію 1BL.1RS з експресивним мутантом кількох генів локусу *Sec1* (на електрофоретичному спектрі відсутні деякі компоненти блоку, характерного для *Sec1*). Хлібопекарські властивості лінії були значно краще, ніж у аналогічних ліній, в яких ці гени експресувалися. Нещодавно було отримано ще дві транслокації з залученням обох плечей хромосоми 4R на пшеничні хромосоми 7A та 4B з генами стійкості до борошнистої роси, як вважають автори, іншими, ніж вже передані до пшениці від жита [90]. На додачу до вже відомої транслокації 6BS.6RL з геном *Pm20* отримано ще одну лінію з доданою хромосомою 6R, яка несе інший ген стійкості до борошнистої роси [91]. Тобто робота з житом далеко не обмежується транслокацією плеча 1RS.

У сучасному огляді [925] як на головну причину невеликої кількості агрономічно успішних транслокацій вказують на наявність структурних хромосомних перебудов у видах, які відіграють роль донора та реципієнта

чужинного матеріалу. По-перше, якщо гомеологічна транслокація відбувається за участю структурно перебудованих хромосом, вона скоріше за все не буде компенсаторною [925]. По-друге, структурна перебудова унеможлиблює рекомбінацію хромосом навіть за відсутності дії гена *Ph1*, а отже – скорочення обсягу чужинного хроматину [552]. Зрозумілий і виразний приклад – доволі стара транслокація Compair [578], за участю якої нікому не вдалось отримати агрономічно привабливу лінію. Менше двох десятків років тому було знайдено причину: транслокований сегмент інвертований у складі пшеничної хромосоми, отже на рекомбінації розраховувати не можна [623]. На нашу думку, все згадане є причиною того, що список чужинних корисних генів, перенесених до геному пшениці у складі транслокації, аж ніяк не наближається до розмаїття генів, хоча б стійкості до хвороб, які захищають сучасні сорти пшениці. Останніх набагато менше, і транслоковані лінії, як і їхні види-донори, залишаються переважно джерелом надій на розширення генетичного пулу пшениць, що культивуються, за рахунок споріднених видів. Тим не менш, кожна сучасна стаття про інтрогресивну гібридизацію, а наразі спостерігається новий спалах інтересу до цього напрямку досліджень, закінчується рефреном, що отриманий новий інтрогресивний зразок пшениці є важливим рослинним матеріалом для покращення генофонду пшениць, які культивуються. Для прикладу [90,91,339,446,506,602,915], і кількість публікацій з таким рефреном можна множити без обмежень.

1.2.2.4. Рекомбінантні лінії. Інтрогресивні рекомбінантні лінії пшениці м'якої можна створювати з залученням видів, геноми яких гомологічні хоча б одному з субгеномів пшениці м'якої. Це види з геномами D та A, тетраплоїдні види, які включають субгеном B, гексаплоїдні види з тими самими субгеномами з числа тих, що не культивуються. Але можна використовувати і види з геномами гомеологічними, з вторинного та третинного генетичних пулів. Для цього або індукують рекомбінацію гомеологічних хромосом, або використовують лінії з однойменними чужинними транслокаціями, величина яких у різних лініях різна.

Чимало корисних генів було інтродуковано до геному пшениці від тих її родичів, що їхні хромосоми можуть кон'югувати з хромосомами пшениці, вступати до рекомбінаційних подій, так що чужинні гени включаються через кросинговер до складу хромосом пшениці м'якої. Кілька генів стійкості до стеблової іржі було отримано від *T. monosocum* (*Sr21*, 2A [814], *Sr22*, 7A [414], *Sr35*, 3AL (цит. за [579]), *T. dicocum* (*Sr9*, 2B [428], *Sr13*, 6AL (цит. за [579]), *Sr17*, 7BL [577]), *T. durum* (*Sr11*, 6B [428], *Sr12*, 3B [757]), *T. timopheevii* (*Sr36*, 2B [579], *Sr37*, 4B (цит. за [579])). Гени стійкості до листової іржі було перенесено від *T. monosocum* (кілька неідентифікованих [823], *Lr63* на хромосому 3AS [434]), від *T. dicoccoides* (*Lr53* цит. за [579], *Lr63* [434]), *T. turgidum* (*Lr14a* [245], *Lr23* (цит. за [579]), *Lr61* (цит. за [579])). Гени стійкості до жовтої іржі геном пшениці м'якої отримав від *T. dicoccoides* (*Yr15*, 1BS, *YrH52*, 1B (цит. за [579])). Гени *Pm* до геному м'якої пшениці було інтрогресовано від *T. monosocum* (новий алель гена *Pm4* [731], *PmU*, 7AL [688], *Pm1b*, 7AL [359]), від *T. boeoticum* (*Pm25I*, 1AL [763], два не ідентифікованих гени, 7AL [187,252]), *T. dicoccoides* (*Pm16*, 4A (цит. за [579]), *Pm26*, 2BS [718], *Pm30*, 5BS [513], *Pm31*, 6AL [880], *Pm42*, 2BS [666], *Pm4a* [813], *Pm5a*, 7BL (цит. за [579]), *Pm50*, 2AL [599]), від *T. timopheevii* (*Pm27*, 6BL [384], *Pm6*, 2BL (цит. за [264])). Крім того від різних ди- та тетраплоїдних родичів до пшениці м'якої було перенесено гени стійкості до фузаріозу, злакової попелиці, гессенської мухи, вірусу штрихуватої мозаїки пшениці (цит. за [264]).

Щодо виду *Ae. tauschii*, хромосоми якого легко рекомбінують з хромосомами субгеному D пшениці м'якої, як джерело інтрогресії вид використовується двома способами. Перший – створення синтетичних гексаплоїдних пшениць (в тому числі використання тетраплоїдних компонентів AABB пшениці м'якої як тетраплоїдного компоненту схрещування [244,415,418,720]) з наступним їхнім схрещуванням з пшеницею м'якою та пошуком бажаних рекомбінантів [637] і це докладно було описано у підпункті 1.2.2.2. Щодо генів стійкості до грибних захворювань листя через гексаплоїдні

синтетики були залучені гени *Sr33* [415], *Sr45* (цит. за [579]), *Sr46* (цит. [579]), *Yr26* [470], *Lr21* [720], *Lr22a* [244], *Lr32* [418]. Другий – отримання гібридів ABDD та їхнє зворотнє схрещування з пшеницею м'якою для відновлення фертильності. Виникає можливість для рекомбінації між геномами D різного походження [313]. Серед генів, інтродукованих від егілопса Тауша через пряме схрещування – *Lr21* [365], *Lr39* [698], *Lr42* [197], *Pm58* [871].

Індукція гомеологічної рекомбінації пов'язана з обмеженням дії пшеничного гена *Ph1* (хромосома 5BL), що забороняє кон'югацію хромосом з неповною гомологією, тобто хромосом, які входять до однієї гомеологічної групи із семи, властивих представникам *Triticinae* [638,710]. За сучасними даними, ген відсутній в геномі будь-яких диплоїдних представників *Triticinae*, але у наявності у поліплоїдних *Triticum*, в тому числі, у *T. timopheevi* [321]. Його гомеологи у субгеномах А та D пшениці м'якої є нефункціональними [137]. Інший ген, *Ph2*, з аналогічним ефектом та більш слабкою дією було ідентифіковано пізніше та локалізовано на хромосомі 3D [583]. Хоча пізніше було ідентифіковано ще кілька генів з промоторною та супресорною дією щодо гомеологічної рекомбінації [302], їхня дія не була критичною, і при індукції гомеологічної рекомбінації враховують лише ген *Ph1*. За сучасними даними, для процесу кон'югації критичним є *TaZIP4-B2*, який знаходиться у середині генного кластера *Ph1* та продукт якого впливає на структуру хроматину [705]. Обмежити дію гена можна через його видалення, використовуючи специфічні лінії, нулісомні за хромосомою 5B та тетрасомні за іншою хромосомою з цієї ж гомеологічної групи. Є приклад застосування дисомно-заміщеної лінії пшениці Langdon 5D(5B) [743] для передачі до пшениці стійкості до фузаріозу від *L. elongatum* [385]. Нулі-тетрасоміки за хромосомою 5B було використано для перенесення генів стійкості до стеблової іржі від *Ae. markgrafii* до пшениці [243].

Крім того, на пшеницях м'якій [737] та твердій [315] було знайдено рецесивну мутацію *ph1*, яка виявилась делецією ділянки хромосоми розміром 3 Мб з геном *Ph1* [314]. Мутацію *ph2* також знайдено [157], її ефективність

менша. Мутантні алелі гена *ph1* не супресують кон'югацію гомеологів, і між пшеничним та чужинним гомеологами може здійснюватися обмін хромосомними фрагментами. З використанням мутанта *ph1b* до пшениці було перенесено гени стійкості до борошнистої роси від *Ae. longissima* [161], *Ae. triuncialis* [261], до іржі – від *Ae. cylindrica* Host [116], ген *Pm57* від *Ae. searsii* був перенесений до складу хромосоми 2В пшениці [510]. Індуковану геном *ph1* рекомбінантну лінію 7А-7JS з геном *Sr44* було отримано на основі відповідних чужинно-доданої та чужинно-заміщеної ліній *T. aestivum* / *Th. intermedium* [419]. Ген *Bdv2* стійкості до вірусу жовтої карликовості ячменю було отримано у складі рекомбінантної хромосоми 7D в тому самому матеріалі з використанням гена *ph1* [114,719]. Скорочено обсяг відомої Робертсонівської транслокації 7DS.7el₂L від *Th. ponticum*, яка крім гена *Sr43* містила ген *Yp*, що надавав борошну жовтого кольору [114,635]. Через гомеологічну рекомбінацію ген *Lr6b*, перенесений у складі транслокації на хромосому 3А від *Ae. speltooides*, було відокремлено від гаметоцидного гена *Gc* [551], зменшено обсяг транслокації від *At. sharonensis* з генами *Lr56* та *Yr38* на хромосому 6А пшениці [550].

При індукції гомеологічної кон'югації транслокація чужинного фрагмента відбувається на гомеологічну хромосому. Очікувалось та було підтверджено на рослинному матеріалі, що транслокація за участю гомеологічних хромосом характеризується більшою стабільністю при трансмісії у поколіннях та здатністю компенсувати відсутній пшеничний хроматин у порівнянні з транслокаціями, які відбуваються на негомeологічні хромосоми [156,198,284,293,390]. Виразним прикладом є застосування гомеологічної рекомбінації хромосом у роботі зі спонтанно-транслокованою лінією Agent, яка мала велику транслокацію хромосоми 3Ag *Th. ponticum* з генами *Sr24* та *Lr24* на хромосому 3А пшениці та характеризувалась зниженою продуктивністю [283,576]. Гомеологічна рекомбінація призвела до створення кількох ліній пшениці, де значно зменшена транслокація з вказаними генами була локалізована на хромосомах 3В та 3D пшениці [447,924].

Позбутися наслідків дії генів *Ph* щодо кон'югації хромосом можна не лише через видалення гена *Ph1*, а і за допомогою генів *Ae. speltoides Su1-Ph1* та *Su2-Ph2*, які супресують дію генів *Ph* та є епістатичними для них [242]. Відому лінію Compair з геном стійкості до жовтої іржі *Yr8* від *Ae. comosa* було створено як транслоковану через супресію гена *Ph1* із застосуванням для схрещування зразків *Ae. speltoides*, компетентних щодо супресії гена *Ph1* [283708]. Зараз встановлено, що генів – супресорів гена *Ph1* у геномі *Ae. speltoides* два, *Su1-Ph1* у хромосомі 3SL та *Su2-Ph1* у хромосомі 7SL [239]. Пізніше було створено лінію пшениці м'якої з інтрогресованим геном-супресором, *Ph1^l*, та було висунуто припущення, що ген потрапив до геному пшениці разом з частиною хромосоми 4S [173]. Можливо, що ген *Ph1^l* є іншим у порівнянні з генами *Su1-Ph1* та *Su2-Ph1*, все одно лінію було вдало використано для передачі до пшениці гена стійкості до листкової та жовтої іржі від *Ae. triuncialis*, *Ae. geniculata* [79] та *Ae. umbellulata* (цит. за [579]) через рекомбінацію гомеологів. Дозвіл на рекомбінацію між гомеологами при залученні до схрещувань певних зразків *Ae. speltoides* було використано для перенесення гена *Lr28* до пшениці у складі транслокації 4A.7S (цит. за [579]), для створення інтерстиціальної транслокації сегмента хромосоми 7S з генами *Lr47* та *Gb5* на хромосому 7A пшениці [235], для транслокації генів *Sr47*, *Sr32*, *Sr39* з хромосоми 2S цього ж егілопсу на хромосому 2В пшениці [416]. Ген стійкості до борошнистої роси *Pm12* було перенесено до пшениці м'якої через гомеологічну рекомбінацію з утворенням складної рекомбінантної хромосоми за участю хромосом 6В та 1В пшениці та 6S та 1S егілопса (цит. за [579]). Ген – супресор гена *Ph1* виду *Ae. speltoides* до цього дня частіше за все згадують як індуктора рекомбінації гомеологів у хромосомній інженерії, хоча знайдено кілька інших джерел супресії дії гена *Ph1*. Це *Elytrigia elongate* [241], *Ae. longissima* [584], *Ae. mutica* [226], *Ae. peregrine* [262], деякі види *Thinopyrum* [613], *Psathyrostachys huashanica* Keng ex Kuo [405], *Ae. geniculata* [511], *Agropyron elongatum*, *Ag. cristatum* [175,241]. Рекомбінантну хромосому, що об'єднує хромосомні сегменти хромосом з різних гомеологічних груп, 2 та 6,

містить інтрогресивна лінія *Ae. ventricosa* / *T. aestivum*, і ця хромосома містить чотири різних гени стійкості, чужинні для пшениці [805]. Повідомляють про ідентифікацію спонтанної рекомбінантної лінії, що походить від спонтанної транслокації 5M^g.5D (*Ae. geniculata* / *T. aestivum*) [511], рекомбінантної лінії, в якій хромосома 2В пшениці мала ділянку від однієї з двох хромосом групи 2 *Ae. triuncialis* [448]. У роботі [375], де повідомляється про створення інтрогресивних ліній *T. aestivum* / *Ae. mutica*, відмічається, що хромосоми з інтрогресіями зустрічаються для всіх трьох пшеничних хромосом гомеологічної групи 5, в той час коли за методом «змішування геномів» [36], у комбінаториці з залученням чужинного хроматину мають брати участь хромосоми лише субгеному D пшениці. Отримані результати наводять на думку про промоторну спроможність геному *Ae. mutica* щодо дозволу кон'югації гомеологічних хромосом.

Для створення рекомбінантних ліній без інактивації гена *Ph1* використовують лінії, що несуть у геномі гомеологічні чужинні транслокації різних обсягів. А вихідний матеріал для створення таких ліній, отримують двома шляхами: або пряме схрещування пшениці м'якої з диплоїдними родичом та наступна кропітка робота з фертильними нащадками [664,871]. Або створення амфідиплоїда між пшеницею твердою (чи тетраплоїдним компонентом AABB пшениці м'якої [36,375] з диплоїдним родичом і наступне його схрещування з пшеницею м'якою [119,637].

Назвемо пару реципрокних транслокованих хромосом (пшенична з чужинними фрагментами та чужинна з пшеничними фрагментами) альтернативною. Різні альтернативні пари (в різних мейоцитах) утворюються за участю різних сайтів рекомбінації, так що термінальні транслокації утворюються різного розміру. Для отримання інтерстиціальної транслокації потрібно схрестити лінії з транслокованими хромосомами альтернативної пари. У перебудованих хромосомах компонентів схрещування розміри вихідної транслокації мають не співпадати. Тоді за наявності гена *Ph1* кросинговер відбувається лише в повністю гомологічному сегменті чужинної хромосоми,

який у наявності на обох хромосомах. Результатом рекомбінації є два продукти: пшенична хромосома з інтерстиціальною транслокацією та повна чужинна хромосома. Такий шлях рекомбінації між гомеологами, розроблений ще Сірсом [743], є зрозумілим, привабливим та надзвичайно працемістким щодо цитогенетичної роботи з матеріалом.

Отже, використання гомеологічної рекомбінації для конструювання рекомбінантних хромосом якщо і позбавлено компоненту випадковості, яка у наявності при залученні фрагментації та об'єднання чужинних та пшеничних хромосомних фрагментів, за частотою успіху не є більш перспективним підходом. Ця робота потребує скринування великих популяцій на наявність цільового гена [236,237,527]. Найбільш відомою з цього напрямку хромосомної інженерії для інтрогресії генів є спроби зменшити житню ділянку в транслокації 1BL.1RS для відокремлення генів стійкості до хвороб від генів, що кодують секаліни [431,526,527]. Є інші приклади подібної роботи: скорочення транслокації 1(U^{PS}^P).1A від *Ae. peregrine* [552], скорочення пшенично-пирійних транслокацій 6A.6Ag [236] та 7D.7I^s [114,780].

Якщо лінії альтернативних пар схрещувати за умов відсутності дії гена *Ph1* (наприклад, застосовується мутант *ph1b*), можна створити чужинно-рекомбінантні лінії з хромосомою, яка є результатом кількох рекомбінаційних подій між чужинною та пшеничною хромосомою [510,520,546]. Ген *Sr39*, перенесений до пшениці у складі термінальної транслокації 2S.2B, опинився у складі інтерстиціальної транслокації саме через індукцію рекомбінації гомеологічних сегментів хромосом [546,634].

В останні роки з'являються роботи, в яких вказується хромосома пшениці, що несе чужинний хроматин певного родича пшениці, але не визначено, якій саме чужинній хромосомі належить цей хроматин і це незважаючи на застосування у дослідженні молекулярних маркерів [366,507,519,520,664,759]. Такі інтрогресивні лінії слід також вважати рекомбінантними, адже неефективність застосування молекулярних маркерів для ідентифікації гомеологічної належності чужинного хроматину вказує, як

правило, на невеликий обсяг чужинного сегмента. Наприклад, один з останніх генів стійкості до борошнистої роси, *Pm58*, перенесено до геному м'якої пшениці через беккросування до пшениці її гібрида зі стійким зразком егілопса Тауша [871]. Ген увійшов до складу хромосоми пшениці 2DS, як вважають автори, за рахунок рекомбінації. А ген *Pm53* від *Ae. speltoides* через пряме схрещування пшениці м'якої зі стійким зразком егілопса локалізовано у хромосомі 5BL [664].

Якщо ознайомитися з результатами скринінгу розмаїття зібраних у колекціях та знайдених у природних місцях зростання зразків ди- та тетраплоїдних пшениць [160,311,377], стає зрозумілим, що ми тільки трошки генів зачерпнули з великого їхнього розмаїття, що складає генетичний пул видів, зразків, ліній, що не культивуються, тому що не можуть конкурувати з сортами, продуктами цілеспрямованого тривалого добору. Звичайно, процес перенесення генів буде тривати у супроводі двох перманентних проблем інтрогресії: linkage drag та некомпенсаторний характер транслокації чи продукту рекомбінації. Проте, на наш погляд, ця тривала та кропітка робота має супроводжуватися та супроводжується накопиченням величезного пласта фундаментальної інформації про структуру геномів, про сінтенію генів та гомеологію хромосом близьких видів, про будову генів та ідентифікацію ділянок, що забезпечують специфічність їхньої дії. Все це у сукупності продукує знання, що дадуть у майбутньому можливість перейти до сайт спрямованого мутагенезу *in vivo* (на сучасному рівні маніпулювання з ДНК це вже називається редагуванням геному [489,517,849]), який, теоретично, дасть змогу змінювати ген інтересу у певному сайті та не зачіпати його оточення, зберігаючи у недоторканості ті генні мережі, що були створені тривалим штучним доббором для забезпечення високих товарних властивостей сорту.

1.2.3. Дослідження структури геному ліній інтрогресивного походження. Для ідентифікації транслокацій, визначення їхньої гомеологічної належності та уточнення щодо розташування на пшеничній хромосомі використовують ті самі методи аналізу, що і при роботі з чужинно-заміщеними

лініями. У ранні роки розвитку інтрогресивної гібридизації доступними були лише вивчення кон'югації хромосом у М1 МКП ліній та гібридів та морфологічні (фізіологічні) ознаки, що могли слугувати маркерами чужинного хроматину (огляди [14,263,311]).

Спроба використання адаптованого для пшениці методу диференційного С-зabarвлення [312] одразу довела його ефективність для ідентифікації термінальних та центричних транслокацій для хромосом жита [284,524] та слабку придатність для візуалізації інтерстиціальних транслокацій у разі відсутності на них діагностичних бендів [285]. Після розробки для пшениці методу геномної гібридизації *in situ* (GISH) [699,736] його стали широко та ефективно використовувати для визначення структури геному інтрогресивних ліній в термінах додавання, заміщення чи перебудови специфічних хромосом [199,236,283,285,338,475,635,782,854,874,928]. Одночасно було адаптовано для пшениці і флюоресцентну гібридизацію *in situ* (FISH) [894]. Було розроблено специфічні молекулярні зонди, які давали змогу розрізнити всі хромосоми субгеномів А, В та D пшениці [618,699,735]. Сполучення зондів було ефективним для родичів пшениці також [496,605,797]. Їх було успішно застосовано для ідентифікації окремих хромосом дикорослих родичів пшениці [879], вивчення структури геномів інтрогресивних ліній та амфідиплоїдів [159,336,404,600,603,746,874,899,915,928]. Подальше збільшення роздільної здатності методу FISH лежить на шляху використання високо специфічних зондів, наприклад, на основі кДНК, та вже доведено ефективність такого підходу [204]. Проте всі цитологічні методи характеристики геному характеризуються як складні, непрості для повторювання, мають обмежену роздільну здатність та залежать від стану хромосом при виготовленні препаратів. Робляться певні кроки для їхнього удосконалення [260,827], але методи залишаються слабо придатними для скринування великих обсягів матеріалу. Тим не менш, поєднання FISH-методу з аналізом С-посмугованості хромосом дало можливість не лише доводити наявність чужинного хроматину у геномі інтрогресивної лінії [336,471,506,800,929], а і локалізувати чужинні

транслокації на хромосомах пшениці з визначенням точок розриву хромосом [287,512,605,854,915,919].

Першими молекулярно-генетичними, не пов'язаними з цитологічними дослідженнями, маркерами були гени біохімічних ознак, і саме вони у 80-ті та 90-і роки використовувались для визначення гомеологічної належності чужинних хромосом, доданих до пшеничного комплементу [56,342,799]. Щодо ідентифікацій транслокацій, роздільна здатність біохімічних маркерів обмежувалась плечем через низьку щільність таких генів, локалізованих на хромосомах пшениці. Перші молекулярні маркери, RFLP, розроблені для пшениці у 90-ті роки, додали мало оптимізму щодо ефективності їхнього використання для вивчення інтрогресивних геномів через низький поліморфізм для пшениці та, головне, високу вартість та працемісткість [213]. Проте RFLP-маркери є кодомінантними та хромосомо-специфічними [213], отже виявились придатними для оцінки ступеню гомеології між хромосомами однієї і тієї гомеологічної групи, для виявлення перебудов усередині хромосом [571,918]. Ці маркери стали першим ефективним інструментом для виявлення криптичних інтрогресій, які за розміром були поза межами роздільної здатності цитологічних методів [448,449,907]. А в сполученні з сучасними цитологічними методами (GISH, FISH) використовувались для ідентифікації чужинних інтрогресій з геномів *Th. intermedium*, *Th. elongatum*, *S. cereale* до геному пшениці м'якої [335,702].

Так само малоефективними були перші ПЛР-маркери такі як, RAPD через низький поліморфізм та погану відтворюваність [279,852], хоча є кілька прикладів їхнього вдалого використання [217,662]. ПЛР відкрила можливість розробки цілої низки нових маркерів, що в їхній основі лежить поліморфізм за послідовністю нуклеотидів або кількості повторів певних коротких послідовностей. Справжній успіх у застосуванні молекулярних маркерів для вивчення структури інтрогресивних геномів пшеничних ліній був пов'язаний з розробкою та апробацією мікросателітних маркерів, основаних на поліморфізмі за кількістю мікросателітних повторів (SSR) у геномних локусах, оточених

нуклеотидними послідовностями, які визначають специфічність локуса та можуть бути застосованими як праймери у ПЛП [375,634,635,662,798,874]. Ефективними для виявлення перебудов у геномах інтрогресивного походження виявились маркерні системи IRAP (визначає наявність зміни розміру послідовності між двома ретротранспозонами) та REMAP (визначає наявність зміни розміру послідовності між ретротранспозоном та мікросателітним локусом) [68,849].

Поліморфізм за поодинокими нуклеотидами (SNP) також виявився корисним для відслідковування чужинних інтрогресій у геномі пшениці [941]. Було показано [816], що сиквенс нуклеотидних послідовностей окремих частин чужинного геному є джерелом SNP-маркерів які потім можна використовувати для вивчення геному інтрогресивної лінії пшениці з відповідним чужинним хроматином. Ефективними для вивчення інтрогресивних ліній виявились також EST (expressed sequence tags) – маркери, основані на поліморфізмі за послідовністю нуклеотидів у експресованих частинах генів [203,394,450,588,634,874]. Технології з вивчення транскриптому з залученням біоінформативних методів аналізу баз даних з сиквенсу послідовностей надали ще один тип маркерів, RNA-seq, який вже довів свою ефективність для диференціювання хромосом пшениці та її дикорослих родичів [202,472,482,846].

Ідентифікація молекулярних маркерів, які є внутрішньою частиною інтрогресованого гена або тісно з ним зчеплені, оптимізує роботу з залучення цільового гену до реципієнтного геному. Така ідентифікація постійно супроводжує роботи з інтрогресії, перш за все генів стійкості. Спочатку це були RFLP- [112,730,747] та RAPD-маркери [184,332,730]. З накопиченням інформації з сиквенсу геномів їх було витіснено більш сучасними маркерами, використання яких пов'язано з ПЛП: SSR [317,662, 698,830,838], RGA-STs [365], STS [747]. Один з нових типів маркерів – PLUG (PCR-based landmark unique gene) [379,380]. Маркерна система базується на консервативності ортологічних генів та є джерелом хромосомних «якорних» маркерів, які є дуже

ефективними для насичення бінів. Використання саме цієї системи показало, що сінтенія серед пшеницевих є дуже високою, за виключенням транслокації, що зачіпають три хромосоми, 4A, 5A, 7B [379]. Наразі PLUG-маркери використовуються для створення геномно-специфічних маркерів для різних геномів Triticinae та здаються перспективними для вивчення структури геномів з інтрогресіями [476]. Подібними маркерами, що базуються на подібності ортологічних генів у пшениці та родичів, є ще один новий тип маркерів, wheat conserved orthologous set (COS) [689]. Вже показано можливість їхнього використання для хромосом *H. chilense* [568] та їхню компетентність щодо хромосомної локалізації генів стійкості до борошнистої роси при їхньому перенесенні до геному пшениці м'якої від *Ag. cristatum* [196].

Здається, одним з найперспективніших методів вивчення окремих хромосом в межах різних геномів Triticinae та подальше застосування цієї інформації для вивчення рекомбінантних геномів стане сортування хромосом методом проточної цитометрії [219] особливо тепер, коли до цього методу додалось використання молекулярних маркерів, специфічних для окремих хромосом різних геномів [602]. Новий метод називається FISHIS (FISH in suspension) [316]. Хромосоми мітяться у суспензії за допомогою хромосомно-специфічних SSR-праймерів з флуоресцентною міткою. Так можна розділяти навіть ті хромосоми, які не відрізняються за розміром і тому не можуть бути відсортовані немодифікованим методом проточної цитофотометрії. Вже з'явилися роботи, в яких метод проточної цитометрії використовується для виділення чужинних хромосом з геномів чужинно-доданих ліній з їхнім наступним секвенуванням [693]. FISHIS здається перспективним методом для виділення рекомбінантних хромосом з їхнім наступним молекулярно-генетичним аналізом. На нашу думку, беручи до увагу методи секвенування ДНК нового покоління, цей метод може стати провідним для вивчення рекомбінантних геномів.

Аналізуючи результати хромосомної інженерії, наведені у підрозділі 1.2.2, можна побачити ясно різницю у схемі інтрогресії від диплоїдних джерел,

перш за все егілопсів, та поліплоїдних видів. Для диплоїдних видів, особливо тих, що першими залучилися до гібридизації з пшеницею, було розроблено логічні кроки на шляху створення ліній з обмеженим обсягом інтрогресії: чужинно-додана лінія – чужинно-заміщена лінія – транслокаційна (рекомбінантна) лінія. В переважній більшості випадків гомеологічна належність чужинної транслокації визначена практично завжди, а для диплоїдного виду це одна хромосома. На перших етапах інтрогресивної гібридизації намагались неухильно слідувати цій схемі. Для поліплоїдних егілопсів ідентифікація транслокації часто обмежується визначенням гомеологічної групи, а геном вказується не завжди. Для багаторічних злаків, що залучаються до інтрогресивної гібридизації з пшеницею, нормою є така інформація про структуру геному інтрогресивної лінії, коли ми можемо вказати хромосому пшениці, яка несе транслокацію, але не вказується, яка саме чужинна хромосома стала джерелом хроматину. Така ситуація здається цілком зрозумілою, коли автори лінії вказують, що транслокаційну лінію відібрано серед нащадків амфідиплоїда (як правило, неповного) пшениці та поліплоїдного родича за наявності цільової ознаки (як правило, стійкість до якогось чинника) [913]. І ми маємо кілька цілком відпрацьованих методик для визначення того, яка хромосома пшениці несе транслокацію. Але який хроматин транслокований, встановити важче [349,529, 801].

Для транслокації, наявність якої у геномі довести не можна, хоча фенотип рослини відрізняється від фенотипу вихідного зразка пшениці, використовують термін «криптична» [349,448,600,907,918]. Перше таке повідомлення стосувалось пшенично-житньої транслокації [703]. Вивчаючи моносомно-додані пшенично-житні лінії, автори, по-перше, вказали на генетичну нестабільність таких ліній, яка проявлялась у схильності резидентного геному до перебудов, по-друге, на появу ліній, фенотип яких вказував на наявність чужинних генів, але цитологічно (С-бендінг, *in-situ* гібридизація), чужинний хроматин не виявлявся. Тепер повідомлення про криптичні транслокації стали з'являться регулярно.

Було повідомлено про криптичні транслокації до геному пшениці від видів *Ae. geniculata* та *Ae. triuncialis* [434,449]. Перша включала гени стійкості до листової іржі *Lr57* і жовтої іржі *Yr4*, друга – *Lr58*. За свідомством авторів [449], маленький обсяг транслокацій, по-перше, позбавляв від небажаного генетичного супроводу (linkage drag) і по-друге давав змогу сподіватися, що між генами стійкості до двох різних видів іржі не буде рекомбінації. Було створено інтрогресивні лінії *T. aestivum/D. villosum* з деякими ознаками подібності до *D. villosum* (підвищена холодостійкість та стійкість до іржі), однак чужинного хроматину не було виявлено, хоча загальна кількість ДНК у геномі ліній була більша за таку кількість у нативному геномі пшениці [155]. Зроблено припущення про наявність криптичних транслокацій. Від схрещування пшениці з амфідиплоїдом, що містив геном *Th. intermedium*, було отримано лінії, стійкі до BYDV (вірус жовтої карликовості ячменю) та іржі. Чужинного хроматину детектовано не було, і лінії було названо «атипово» або «криптично» транслокованими [494]. Тому саме для таких ліній при вивченні їхньої геномної структури на перше місце зараз висуваються методи ідентифікації чужинного хроматину в їхніх геномах.

Використання молекулярних маркерів, основане на різних технологіях ідентифікації послідовності нуклеотидів у геномі гібридного походження, є на сьогодні основним методом вивчення змін, які можна детектувати в таких геномах. І саме їх використовують, коли хочуть довести наявність інтрогресій у геномі, який пройшов через гібридизацію та, можливо, аллополіплоїдизацію. Проте, на наш погляд, діагностична здатність методу молекулярних маркерів не є специфічною саме для інтрогресій, доводяться просто зміни у геномі. А яка природа змін, чи то включення чужинного хроматину, чи перебудова власного хроматину внаслідок перебування геному у шоці через проходження подій гібридизації та аллополіплоїдизації з залученням механізмів, перелічених у пункті 1.1.3, частіше за все залишається під питанням. Насправді, всі згадані зміни геному, які супроводжують гібридизацію та аллополіплоїдизацію, які вивчаються останні 10–15 років на природних аллополіплоїдах *Tragopogon*,

Senecio, *Spartina*, *Glycine* та ресинтезованих аллополіплоїдах *Triticale*, *Triticum aestivum*, *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis suecica*, *B. napus*, *Gossypium hirsutum*, і делеції [536,538,651,748,806,807], хромосомні перебудови [845,622,624,1058,374], анеуплоїдії, в тому числі приховані [492], також як генна конверсія [440,441,660,726] та дія транспозонів [407,657,833] можуть самі по собі змінювати результати скринування геному з використанням будь-яких молекулярних маркерів. І зареєстровані зміни можуть бути не пов'язаними з включенням до геному чужинного хроматину у тій лінії, що її геномну структуру ми вивчаємо. Специфічність маркерів далеко не завжди може диференціювати гомеологічні послідовності. Сполучення метода молекулярних маркерів з цитологічними може врятувати справу, проте при плануванні роботи потрібно забезпечити однозначну відповідність між картинами цитологічної та молекулярної візуалізації геномних змін. У цілому складається враження, що чужинні інтрогресії надійно ідентифікуються у резидентному геномі лише за умов великого обсягу (хромосома, плече, велика транслокація), а невеликі транслокації, також як і включення чужинного хроматину через гомеологічну рекомбінацію важко відрізнити від перебудов резидентного геному, які могли відбутися під час проходження їм стадії шоку через гібридизацію.

1.2.4. Інтрогресивна гібридизація як індуктор мінливості. Як видно із пункту 1.2.2, вважається, що результат інтрогресивної гібридизації полягає в тому, що до геному пшениці включається чужинний хроматин або через рекомбінацію (гомологічну чи гомеологічну), або через транслокацію, або через заміщення цілої пшеничної хромосоми на чужинну. Чужинно-додані лінії не всі дослідники вважають інтрогресивними. На наш погляд, цей термін можна вживати до всіх ліній, які походять від віддаленого гібрида. У попередньому пункті вказувалось, що лінії інтрогресивного походження можуть і не містити ідентифікований чужинний хроматин, хоча виявляються зміненими відносно вихідного пшеничного зразка за деякими характеристиками, які реєструються на різних рівнях оцінки фенотипу (морфологічні, фізіологічні, електрофоретичні спектри білків чи фрагментів ДНК). Нам здається, що лінії

гібридного походження (мається на увазі віддалені схрещування) варто називати інтрогресивними поза залежності від того, чи вдалось довести наявність саме чужинного хроматину в їхньому геномі. Що являють собою так звані криптичні інтрогресії, на сьогодні ми не знаємо. Чи то дійсно настільки маленьке за обсягом включення чужинного хроматину, що не вдається підібрати інструмент для його виявлення. Чи то зміни торкнулись пшеничного хроматину і ми змогли їх зафіксувати за зміненням фенотипом. В обох випадках пусковим механізмом змін є тимчасове перебування пшеничного геному, поки він знаходиться разом з чужинним хроматином, і лінію такого походження краще називати інтрогресивною. Така її характеристика певним чином орієнтує дослідника для розуміння природи тих змін, які відбулися у її геномі, що ми їх можемо бачити на фенотипному рівні.

У сучасних статтях можна знайти приклади для ілюстрації думки, викладеної у попередньому абзаці.

Показано (цит. за [295]), що у рослинах пшенично-житніх моносомно-доданих ліній з хромосоною 1R порушена поведінка хромосом у мітозах соматичних клітин. Внаслідок цього утворюються дочірні клітини, відмінні від вихідної клітини, що проходила мітоз. Автори прямо вказують на наявність житньої хромосоми у геномі як на стресовий чинник, здатний призводити до зміни каріотипу пшениці.

Хромосомно-додані пшенично-житні лінії вивчали методами IRAP та REMAP. Було знайдено такі компоненти спектру, яких не було у спектрі ДНК зразків, що використані для створення ліній. Автори вважають, що зміни відбулися вже в геномі чужинно-доданих ліній, не пов'язані безпосередньо з чужинним хроматином, а є проявом змін у нуклеотидних послідовностях внаслідок, скоріш за все, делецій. За думкою автора, зміни індукуються гібридністю вихідного для створення ліній геному [135]. Автори відмічають, що структурні перебудови хромосом у пшенично-житніх дисомних лініях відбуваються більш масштабним чином у порівнянні з такими у тритікале.

В більш ранній роботі тих самих авторів [136] вказується на появу у IRAP та REMAP спектрах нових компонентів, не властивих жодному з батьківських геномів. Це також вказує, що нові властивості геному (в даному випадку, послідовності нуклеотидів) можуть і не бути прямим наслідком включення чужинного хроматину до резидентного геному, тим більше, що не спостерігаються жодні зміни на цитологічному рівні [136,337]. Як було розглянуто у підпункті 1.1.3.4, активація транспозонів у наслідок «геномного шоку» у вигляді елімінації, проліферації та руху TE сприятиме змінам у реципієнтному геномі навіть якщо жодного чужинного хроматину до його складу не увійшло [191,659]. Було показано, що ступінь розбіжності між геномами батьківських компонентів гібрида (амфідиплоїда) за послідовностями TE корелює з перебудовою геномних фракцій TE, які відбуваються у геномі гібридного походження [745].

Вивчали моносомно-додані пшенично-житні лінії за хромосомами 2R та 5R [295]. Використовували методи AFLP та MSAP (метилування). Було знайдено велику та різну генетичну/епігенетичну варіабельність як у геномах цих ліній, так і в геномах нащадків від самозапилення, в яких вже не було житньої хромосоми. Виходить, що наявність житнього хроматину не є обов'язковою для виникнення такої мінливості [295]. Оцінюючи результати цієї роботи та висновок авторів, не можна не вказати на неможливість повної впевненості у відсутності чужинного хроматину. Адже ні певний набір молекулярних маркерів, ні молекулярно-цитологічні методи не можуть забезпечити стовідсоткової гарантії відсутності криптичних інтрогресій. Однак, за думкою авторів, результати роботи дають прямий доказ того, що у геномі моносомної чужинно-доданої лінії індукується значна генотипна та епігенетична мінливість. Як механізм індукції такої мінливості автори розглядають активність транспозонів, які було ідентифіковано у досліджених генотипах як Gypsy-like та Copia-like ретротранспозони. За думкою авторів, індуктором мінливості у нащадків чужинно-доданих ліній, що втратили чужинну хромосоми, була активація ретротранспозонної активності, яка

індукувалась у інтрогресивному геномі батьків таких нащадків. Використовуючи методи AFLP та MSAP, автори зробили висновок, що за генетичну мінливість нащадків відповідають Gypsy-like ретротранспозони, а за епігенетичну – Copia-like та Gypsy-like ретротранспозони однаково. Відмічається, що послідовності, в яких відбуваються зміни, індуковані у моносомних чужинно-доданих лініях, відрізняються від послідовностей, які змінюються за індукції аллополіплоїдизацією. Автори стверджують, що моносомні пшенично-житні додані лінії можна використовувати як ефективний метод розширення генетичної різноманітності пшениці м'якої [295]. Крім того, висловлено припущення, що чим менший обсяг чужинного хроматину залучений до складу геному, що формується після акту об'єднання двох різних геномів, тим більша імовірність виникнення хромосомних розривів, елімінації хромосом, структурних перебудов, включаючи елімінацію специфічних послідовностей, транслокації, рух TE [295]. З'явився новий термін, reshuffling (тасування) нуклеотидних послідовностей у геномі ліній такого походження. Посилаючись на відому нестабільність пшенично-житніх доданих ліній [712], автори розглядають тимчасову наявність у геномі чужинного хроматину (додана житня хромосома) у якості перманентного збудника процесів перебудування геному, який не затухає довго в лініях, що мають інтрогресивне походження, хоча чужинної хромосоми в їхніх геномах вже немає. При цьому вони посилаються на старі роботи Густафсона [333], де було показано наявність перебудов у субтеломерних ділянках житніх хромосом тільки у F₃ від схрещування тритікале з пшеницею, а у попередніх поколіннях вони не реєструвалися.

Широку фенотипну варіабельність було індуковано серед нащадків асиметричної вегетативної гібридизації пшениці м'якої та *Thinopyrum ponticum* [509]. Як саме виникла така мінливість, залишилось нез'ясованим. Було виділено шість ліній, які за каріотипом не відрізнялись від пшениці м'якої, але GISH аналіз свідчив про наявність в їхніх геномах коротких сегментів ДНК, інтрогресованих від пирію. Вивчення ДНК-профілів за кількома методами

виявило наявність численних генетичних та епігенетичних змін, включаючи делеції, зміни експресії генів, зміну картини метилювання, активацію ретротранспозонів. Але ці зміни не були напряму пов'язані з чужинними фрагментами. Автори вважають, що фенотипна мінливість виникла внаслідок змін у повторюваних послідовностях резидентного геному разом із епігенетичними змінами у регуляції експресії генів та/або переміщенням транспозонів. Генетична та епігенетична мінливість, яку було зареєстровано у клітинах пшеничної рослини, які підтримувались у культурі клітин, була набагато слабша у порівнянні з інтрогресивними клітинними лініями у культурі. Автори розглядають соматичну гібридизацію як індуктор генетичних та епігенетичних змін та вважають такий матеріал корисним для вивчення молекулярних механізмів, що призводять до змін у геномі внаслідок його інтрогресивного походження [509].

Практично такі саме результати описані для асиметричного соматичного гібриду між цвітною капустою (*Brassica oleracea* var. *botrytis*, $2n=18$, геном CC) та гірчицею (*Brassica nigra*, $2n=16$, геном BB) [842]. Механізми виникнення змін встановлені не були. Однак було виділено 28 інтрогресивних ліній, які характеризувались певними ознаками морфології, що відрізняли їх від батьківського сорту цвітної капусти. Методом мультикольорової FISH було показано, що лінії містять 18 хромосом цвітної капусти. Молекулярні маркери (65 SSR та 77 ALFP) ідентифікували наявність у геномі ліній фрагментів ДНК геному гірчиці, у середньому це становило 7.5% геному ліній. Вивчення профілів ДНК, отриманих різними методами, виявило численні генетичні та епігенетичні розбіжності між інтрогресивними лініями, включаючи зміни у складі послідовностей, делеції, зміни у картині метилювання. Частота втрати фрагментів (5.1%) була вища, ніж поява нових компонентів (1.4%). Дуже цікавою нам здається ідентифікація фрагментів, специфічних для геному тетраплоїдного виду *Brassica carinata* (BBCC $2n=34$), у середньому 15.5%. Методом MSAP показано, що зміни метилювання були подіями звичайними з перевагою гіперметилювання (12.4%) над гіпометилюванням (4.8%). Автори

вважають, що асиметрична соматична гібридизація є індуктором генетичних та епігенетичних змін, отже, є важливим джерелом нової мінливості, яка, теоретично, може бути корисною для розширення генетичного пулу видів, що культивуються [842].

Серед гібридів F_2 від схрещування зразків тетраплоїдної пшениці з *Ae. sharonensis* спостерігали зміни у електрофоретичному спектрі глютенінів у порівнянні з такими гібридів F_1 та батьківських генотипів: мутації поодиноких нуклеотидів, інсерції та делеції у відкритих рамках зчитування [393]. За [93], еволюція нуклеотидних послідовностей відбувається всього чотирма шляхами: заміщення поодиноких нуклеотидів, делеції (інсерції) повторювальних одиниць, зміни у окремих повторах, делеції (інсерції) блоків повторів. Всі ці шляхи генетичних змін розглядаються які можливі механізми геномної асиметрії аллополіплоїдів пшениці [269] і дійсно, наявність всіх цих змін показують у сучасних роботах з вивчення гібридних геномів. Делеції послідовностей у локусах HMW рослин F_2 від вказаного схрещування можуть бути результатом геномної асиметрії, яка відбувається для хромосом *Ae. sharonensis* та пшеничних хромосом.

Подібні висновки поступово були сформульовані у серії оприлюднених робіт з інтрогресивної гібридизації між рисом посівним (*Oryza sativa* L.) та дикорослим (*Zizania latifolia* Griseb) [222,502,505,514,858]. Гібрид F_1 один раз беккросували з рисом посівним. Спостерігали численні генетичні та епігенетичні зміни у інтрогресивних лініях, отриманих від гібриду [222,514,858]. Зміни у лініях продовжували траплятися за кілька поколінь після беккросу. Було зареєстровано мобілізацію МГЕ [505,749,851]. Згодом було з'ясовано, що одна з інтрогресивних ліній, що пішла від цього схрещування, у порівнянні з обома батьківськими зразками гірше переносить умови сольового стресу. Тобто спостерігали новітній фенотип, який, якого не було в жодного з компонентів схрещування. Дослідження показали, що експресія чотирьох генів, відомих як такі, що впливають на виведення іонів натрію з клітин кореня, характеризуються зниженою регуляцією. Саме ці зміни транскрипції генів

авторами розглядаються як такі, які відповідальні за появу нового фенотипу, а причиною зміни у транскрипції вважають інтрогресивну природу лінії, що вивчалась [896]. Результати, описані у [366, 505,749,851,858], дали авторам підстави припустити, що фенотипна мінливість інтрогресивних ліній не є результатом прямого включення до геному чужинного хроматину від *Zizania*. Схоже, що зміни виникають внаслідок вторинних геномних модифікацій, які включаються інтрогресією ДНК *Zizania* і не затухають у наступних поколіннях, причому ці зміни не є просто включенням чужинного хроматину у реципієнтний геном. Тим більш, що на тваринних клітинах у культурі ще раніше було показано, що випадкова інтеграція чужинної ДНК (йшлося про вірусний геном) запускає численні епігенетичні зміни у хазяйському геномі [353,615,701].

Справді, в більш сучасній роботі з цим самим матеріалом на інтрогресію невеликого сегмента ДНК *Zizania* до геному рису посівного вказують як на причину інтенсивної мінливості за кількістю повторів у мікросателітних локусах в інтрогресивних лініях. Тобто наявність інтрогресії не відхиляють. Ця мінливість виникає одразу після інтрогресії [221]. Мутували переважно повтори, що знаходяться у некодуючих послідовностях, мікросателіти з кодуєчих ділянок виявили більшу стабільність. Мікросателітна варіабільність у кодуєчих послідовностях генів може призвести до утворення передчасних стоп-кодонів, зсуву рамки зчитування, коли повтор динуклеотидний, розриву функціональних мотивів [221], тому вона може піддаватися негативному добору. Мікросателітну мінливість було знайдено навіть у хлоропластній та мітохондріальній ДНК інтрогресивних ліній, в тому числі у кодуєчих ділянках генів. Вказується, що мікросателітна мінливість виникає у соматичних примордіальних клітинах F_1 перед їхнім дифереціюванням до гамет і тому успадковується у поколіннях. Мінливість переважно стосувалась кількості повторів. Заміщення нуклеотидів спостерігались набагато рідше. Щодо фланкуючих ділянок мікросателітних локусів, там реєструвались нуклеотидні заміщення, делеції та інсерції. Автори вивчали 13 та 10 генів, які містять

мікросателітні послідовності у промоторній ділянці та інтронах, відповідно. І лише для трьох генів, Os02g15594 (кодує фосфатазу), Os05g35200 (кодує глікозилтрансферазу) та Os07g46750 (кодує фактор елонгації трансляції), було показано зв'язок їхньої експресії з мікросателітною мінливістю. Отже, ця мінливість виявилась суттєвою для генів, що беруть участь у процесах сигналювання та трансляції, і через це можуть викликати утворення нових фенотипів [221].

Однак у зовсім сучасній роботі 2017 року, виконаній все з тим самим матеріалом [875], стверджується вже зовсім напевно, що інтрогресивні лінії, які пішли від інконгруентного схрещування двох видів рису, виникли виключно під впливом пилку, який не вніс ДНК до геному ліній. В цьому дослідженні констатується активізація транспозонів. У цілому було зареєстровано 33 мобілізаційних події *de novo* за участю 13 TE, а саме MITE *mPing*, *Pong* та 11 LTR-ретротранспозонів. Транспозицію встановлювали з застосуванням локус-специфічної ПЛР та Саузерн-гібридизації. Аналіз експресії генів підтвердив, що принаймні деякі з мобілізованих TE спричинили успадковані зміни в експресії сусідніх генів, в тому числі ЛКО, що впливають на масу та розмір зерен. За думкою авторів, отримані результати свідчать, що запилення пилком спорідненого, хоча і несумісного виду викликає мобілізацію ендегенних транспозонів, яка може стати причиною успадкованої зміни у експресії генів, отже – появи новітніх варіацій ознак.

Для того, щоб зрозуміти, які саме генетичні зміни відбуваються в лініях, які мають інтрогресивне походження через те, що виникли як нащадки «гібрида» від вже описаного схрещування *Oryza sativa* ssp. *Japonica* cv. *Matsumae* з *Zizania latifolia* Griseb, було виконано сиквенс геному вказаного сорту рису та інтрогресивної лінії Z35 [859]. У лапках слово гібрид ми навели тому, що автори дослідження вказують на незвичайну, неканонічну гібридну природу цієї лінії та їй подібних. Лінію було отримано методом «повторного запилення» [502]. За цим методом, емаскульовані квітки волоті сорту *Matusmae* обробляли пилком виду *Z. latifolia*. За 40–50 годин волоть запилювали повторно

пилком сорту. Автори вказують, що всі інтрогресивні лінії отримано від однієї рослини "F₁" (лапки авторів) через наступне суворе самозапилення. Хоча дослідники, що працювали з отриманим матеріалом, вважають, що вплив чужого пилку на утворений організм можна порівняти із впливом геному патогенів, коли він взаємодіє з геномом хазяїна не через включення його сегментів до геному хазяїна, а через ініціацію якихось генетичних та епігенетичних перебудов [146,227,356], все одно автори називають свої лінії інтрогресивними. Більш того, у низці досліджень з залученням цього матеріалу показано, що в лініях визначається вміст хроматину *Z. latifolia* менше 0.1% від хазяйського геному і лінії характеризуються появою певних новітніх ознак, яких не було у батьківських компонентів «схрещування» [221,502,514,749,843, 851,858]. Яким чином узгоджуються ці два твердження – справжньої (*bona fide*) гібридизації не було і в лініях є чужинний хроматин, – нам зрозуміти не вдалось. Проте цитована серія робіт підтверджує наше розуміння терміну інтрогресивна лінія: така, що пішла від віддаленого схрещування, навіть якщо чужинний хроматин в ній не детектується. Однак автори [859] наполягають, що саме чужинний пилок провокує генетичну та епігенетичну нестабільність реципієнтного рослинного геному. За даними повногеномного сиквенсу, стосовно геному *Matsumae* лінія RZ35 має 41724 гомозиготних одонуклеотидних поліморфізми (SNPs) та 17839 гомозиготних інделів (indels). 3797 SNPs були несинономічними мутаціями. В геномі лінії RZ35 виявлено інтенсивну мобілізацію транспозонів. В процесі всебічного вивчення лінії було з'ясовано, що вона набула підсилену стійкість до захворювання рису пирикуляріоз, що не характеризувало сорт *Matsumae*. Одну несинономічну мутацію було знайдено в межах відомого гена стійкості до цього захворювання, *Pid3/Pi25*, а ПЛР у реальному часі зареєструвала підсилену експресію мутантного гена. За висновками авторів, чинником інтенсивних генетичних змін в лініях є інтрогресивна гібридизація. Якщо взяти до увагу природу цих ліній та переконання авторів, що роль чужого пилку полягає лише в певній дестабілізації реципієнтного геному, яка супроводжується генетичними

змiнами, виходить, що дана серiя робiт надає переконливі докази на користь того, що вже сам процес контактування рiзних геномiв, навіть якщо він не супроводжується їхнім об'єднанням та створенням гiбрида *bona fide*, запускає механiзм генетичних змiн у резидентному геномi і може, таким чином, ставати чинником появи серед нащадкiв новiтнiх варiантiв ознак [859].

Звичайно, на наш погляд, поява новiтнiх стосовно батькiвських фенотипiв варiантiв ознаки, хоча б нових компонентiв у електрофоретичному спектрі iнтрогресивної лiнii, зовсiм не є доказом того, що формування цього компонента не пов'язано з наявністю iнтрогресii десь в цiй самiй хромосомi, до якої специфічно пiдiбрані для дослідження молекулярні маркери. Така невизначенiсть у трактовцi результатiв лише вказує на обмежену iнформативнiсть електрофоретичних спектрiв ДНК, отриманих за якоюсь певною технологiєю. Результати мають отримуватися рiзними методами, а потiм порiвнюватися, адже до повного розумiння молекулярних процесiв, які вiдбуваються у геномах гiбридного походження ще далеко [809].

Зрозумiло, що змiни у експресii генiв, які є характерними для геномiв гiбридного походження та були неодноразово задокументовані для рiзних амфiдиплоiдiв, включаючи пшеницю [407,465], можуть мати як генетичну, так і епiгенетичну природу [530,776]. І в обох випадках не є доказом наявностi у геномi чужинного хроматину. Вивчення метилювання цитозину у гiбридах F_1 мiж видами пшеницi та егiлопсу та їхнiх амфiдиплоiдiв показало, що картина метилювання змiнюється у порiвнянні з батькiвськими геномами для 13% локусiв як для повторюваної, так і для низькокопiйної ДНК [748,882]. При вивченнi аутополiплоiдiв та алотетраплоiдiв арабiдопсиса у порiвнянні з їхнiми батьками констатувалися кiлькiсні змiни у протеомi, що, за думкою авторiв, може бути наслiдком швидкої змiни у посттранскрипцiйній та трансляцiйній регуляцii експресii [628]. Отже, змiни у експресii вiдбулися, вони констатуються на фенотипному рiвнi, але, коли мова йде про аутополiплоiдiв, чужинного хроматину у геномi немає. Тобто змiни у експресii не є наслiдком

наявності чужинного хроматину у геномі. У випадку аутополіплоїда зміна спричинюється виключно поліплоїдизацією власного хроматину.

Фенотипна мінливість при інтрогресивній гібридизації має ще один аспект – затухання експресії чужинного гена, коли він потрапляє до реципієнтного геному. Питання вивчається давно на багатьох моделях і саме цей напрямок спостережень за фенотипною мінливістю, яка генерується геномом з інтрогресією, був першим, починаючи з відомого феномена мовчання трансгена. Численні роботи з вивчення експресії чужинних генів на тлі резидентного геному показали, що зміна у експресії такого гена є справа досить звичайна і є наслідком того, що відбувається взаємодія чужинного гена та генетичного оточення хазяйського геному [145,680,875,877,908]. Для пшениці було показано неодноразово затухання стійкості при перенесенні гена стійкості від чужинного виду на тло геному пшениці [172,269,383,580,749,877]. На пшеничних генотипах було показано, що ген стійкості *Sr6* змінює свою експресію через взаємодію з алелем *sr6* чутливого партнера за схрещуванням [429], як припускає автор, через дію транспозона чи через парамутація-подібний механізм. Цілком природно припустити, що подібні механізми зміни експресії резидентного гена включаються і при інтрогресивній гібридизації. Видно, поліплоїдний стан пшеничного геному накладає свій відбиток на експресію генів, в тому числі чужинного походження. Наприклад, коли [414] перенесли ген стійкості до стеблової іржі від *T. monosocum* L.) до пшениць твердої та м'якої, спостерігалась прогресивна втрата стійкості разом зі збільшенням плоїдності геному реципієнта. Супресія стійкості може спричинюватися негативною взаємодією між гомеологічними та негемеологічними локусами різних субгеномів поліплоїда, як це було показано для гена *Lr34*, який супресував стійкість до стеблової іржі [412], а також для гена *Pm3*, який супресував ген *Pm8* в деяких лініях з транслокацією 1BL.1RS [580,877]. При цьому показано, що ця втрата стійкості не пов'язана ні з втратою гена, ні з мутацією, ні з мовчанням гена [370]. Було з'ясовано, що утворюються білкові продукти обох генів, створюють гетеромерний комплекс і він стає

неефективним для участі у сигнальному каскаді, що має забезпечити захисну реакцію [789]. Автори висунули припущення, що одночасна експресія кількох NB-LRR-генів стійкості призводить до домінантно-негативної взаємодії через посттрансляційний механізм за участю доменів LRR. Дослідження на гібридах F₁-F₄ трансгенних ліній із пірамідованими різними комбінаціями алелів гена *Pm3* виявили факт генетичної супресії між різними алелями [789]. Шляхом проведення тестів на інфекцію із застосуванням ізолятів *Bgt*, авірулентних до певних алелів гена *Pm3*, було виявлено, що у трансгенних лініях *Pm3b/Pm3a* та *Pm3b/Pm3f* була у різному ступені пригнічена *Pm3a*- та *Pm3f*-опосередкована стійкість. У трансгенних лініях із комбінаціями алелів *Pm3a/Pm3c*, *Pm3a/Pm3d*, *Pm3b/Pm3d* не спостерігалось явище пригнічення стійкості до різних рас *Bgt*.

Проте причина затухання експресії чужинного гена стійкості може бути іншою, якщо стійкість контролювалась кількома генами, а перенесеним виявився один, для якого, припустимо, було знайдено маркер, який давав змогу його відслідкувати.

За думкою [896] у селекції рослин звичайним прийомом є використання якоїсь невизначеної невеликої інтрогресії у геномі для індукції новітніх варіантів ознак, за якими спостерігає селекціонер. Наприклад, [866] показали, що інтрогресія змінює багато фенотипних ознак *Helianthus annuus*, які мають адаптивну відповідь на біотичні та абіотичні стреси. Наразі стає зрозумілим, що інтрогресія спричинює появу новітніх ознак не тільки за рахунок очікуваного включення чужинного хроматину до хазяйського геному та його взаємодії з резидентним геномом, а і може генерувати нову генетичну та епігенетичну мінливість в цьому геномі [80,163,858]. Серед докладно охарактеризованих за їхнім походженням інтрогресивних ліній від схрещування *O. sativa* та *Z. latifolia* було знайдено таку (RZ35), що у порівнянні з вихідним сортом більш ефективно використовувала Нітроген, мала більш тривалі фенофази та підсилена резистентність до пірикуляріозу [749,858]. Однак фізіологічні та молекулярні механізми цих цікавих змін залишаються нез'ясованими [896].

З'являються статті, де розглядається роль гібридизації в еволюції як постачальника нової мінливості, не доступної популяціям у відсутності гібридизації [123,842]. І тим самим вказується на її роль постачальника нової мінливості, яку раніше визнавали лише за мутаціями. Справді, на наш погляд, з огляду на визначення мутації як на будь-яку зміну у нуклеотидній послідовності, інтрогресивну гібридизацію слід вважати мутагенним чинником, а не альтернативним першоджерелом мінливості. Для зміни у експресії генів, яка успадковується, у сучасній генетиці є термін епімутація.

Зі створеними різними методами інтрогресивними лініями доводиться виконувати великий обсяг робіт, щоб довести корисний ген до його практичного застосування у комерційних сортах пшениці, позбавившись від поганого впливу чужинних включень на агрономічно важливі властивості (наприклад, пшенично-житні транслокації з плечем 1RS, пирійно-пшенична транслокації 7DS.7eL₂L). Широко відомим вже є прикрий факт швидкої втрати набутої через інтрогресію стійкості до збудників захворювань (наприклад, гени стійкості до листової іржі та борошнистої роси пшенично-житньої транслокації 1BL/1RS). Нарешті, на сьогодні вже розроблені методи прямої генетичної трансформації пшениці, які дають змогу вводити до її геному лише цільовий ген без супутнього непотрібного хроматину транслокацій. І все ж залишається уявлення, що інтрогресивна гібридизація пшениці зайняла важливе місце в технології її селекції. Це підтверджується активізацією досліджень у цьому плані у останнє десятиріччя після деякого спаду інтересу до цього напрямку робіт, який спостерігався в останні 10-15 років минулого сторіччя [516,696]. Хочеться думати, що таке відновлення інтересу не в останню чергу пов'язане з накопиченням доказів того, що сама по собі інтрогресивна гібридизація є фактором підсилення генетичної пластичності у нащадків віддаленої гібридизації у порівнянні з батьківськими генотипами.

Список публікацій автора дисертації, цитованих у розділі 1

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

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.

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.

Терновская 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.

Маньковська ОС, Антонюк МЗ. Гаметоцидні гени представників *Aegilops* L. Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. 2010;8(1):140-53.

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;368-75.

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.

Marusik I, Antonyuk M, Ternovskaya T. Minimization of volume of alien chromatin in the introgressive common wheat lines. International Symposium "Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources"; Yalta, 26-31 May 2002. Abstracts, 2002:12-3.

Antonyuk M, Ternovskaya T, Vdovychenko Zh. Minimization of alien chromatin volume in the introgressive common wheat lines. In: Pogna NE, Romano M, Pogna EA, Galterio G, editors. Proceedings of the Tenth International Wheat

Genetics Symposium; 1-6 September 2003; Paestum, Italy. Roma: Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura; 2003, p. 869-71.

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, p. 33.

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; Abstract book, Beijing China, 2012, p.151-2.

АНТОНЮК МЗ, Єфіменко ТС, Мартиненко ВС, Терновська ТК. Створення ліній м'якої пшениці з генетичним матеріалом від *Aegilops mutica*. International Scientific Conference “Breeding and Genetics of Agrocltural Crops: Traditions and Prospects”; October 17-19th, 2012; Odesa, Ukraine. Тези доповідей. Одеса, 2012, с.123-4.

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. Abstract book, Beijing China, 2012, 154-5.

Mykhailyk S, Antonyuk M, Shtefiuk T. Identification and analysis of wheat TaMSH7 gene promoter region. In: Buerstmayr H, Lang-Mladek Ch, Steiner B, Michel S, Buerstmayr M, Lemmens M, Vollmann J, Grausgruber H, editors. Proceedings of the 13th International Wheat Genetics Symposium; April 23-28, 2017; Tulln, Austria. University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna; BOKU - University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna Department of Agrobiotechnology (IFA-Tulln) & Department of Crop Sciences, Austria; 2017, p. 84.

Shtefiuk T, Mykhailyk S, Antonyuk M, Ternovska T. Appllication of RGAP technique for genotype screening of introgressive wheat lines resistant to powdery

mildew. In: Buerstmayr H, Lang-Mladek Ch, Steiner B, Michel S, Buerstmayr M, Lemmens M, Vollmann J, Grausgruber H, editors. Proceedings of the 13th International Wheat Genetics Symposium; April 23-28, 2017; Tulln, Austria. University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna; BOKU - University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna Department of Agrobiotechnology (IFA-Tulln) & Department of Crop Sciences, Austria; 2017, p. 244.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Рослинний 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 (м, Одеса, Україна).

Сорти пшениці твердої (*T. durum* Desf.) Леукурум та Черномор, 28-хромосомні зразки, що вважаються пшеницею твердою, але їхнє походження пов'язане з утворенням та самозапиленням гібриду між пшеницями м'якою та твердою, це Mutiko italicum 59h1432 (Краснодарський НДІСГ), Кандиканс, Рубрум (Інститут рослинництва, Харків).

Нулі-тетрасомні лінії сорту Чайніз Сприн: нулі-4D-тетра-4A та нулі-4D-тетра-4B.

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 *Aegilops speltoides*, Авролата (AABB^{UU}), у складі геному якого об'єднані тетраплоїдний компонент AABB сорту м'якої пшениці Аврора та геном UU диплоїдного виду *Aegilops umbellulata*, Аврозис (AABBS^{sh}S^{sh}), у складі геному якого об'єднані тетраплоїдний компонент AABB сорту м'якої пшениці Аврора та геном S^{sh}S^{sh} диплоїдного виду *Aegilops sharonensis* [36,939]. Амфідиплоїди за суттю є продуктами заміщення субгенома D генотипу Аврора (AABBDD) на геном диплоїдного егілопса (рис. 2.1).

Штучний амфідиплоїд Міоза ($2n=6x=42$, AABBMM), який має геноми А та В від озимої твердої пшениці *T. durum* Mutiko italicum і геном M^t від *Ae. comosa* [982].

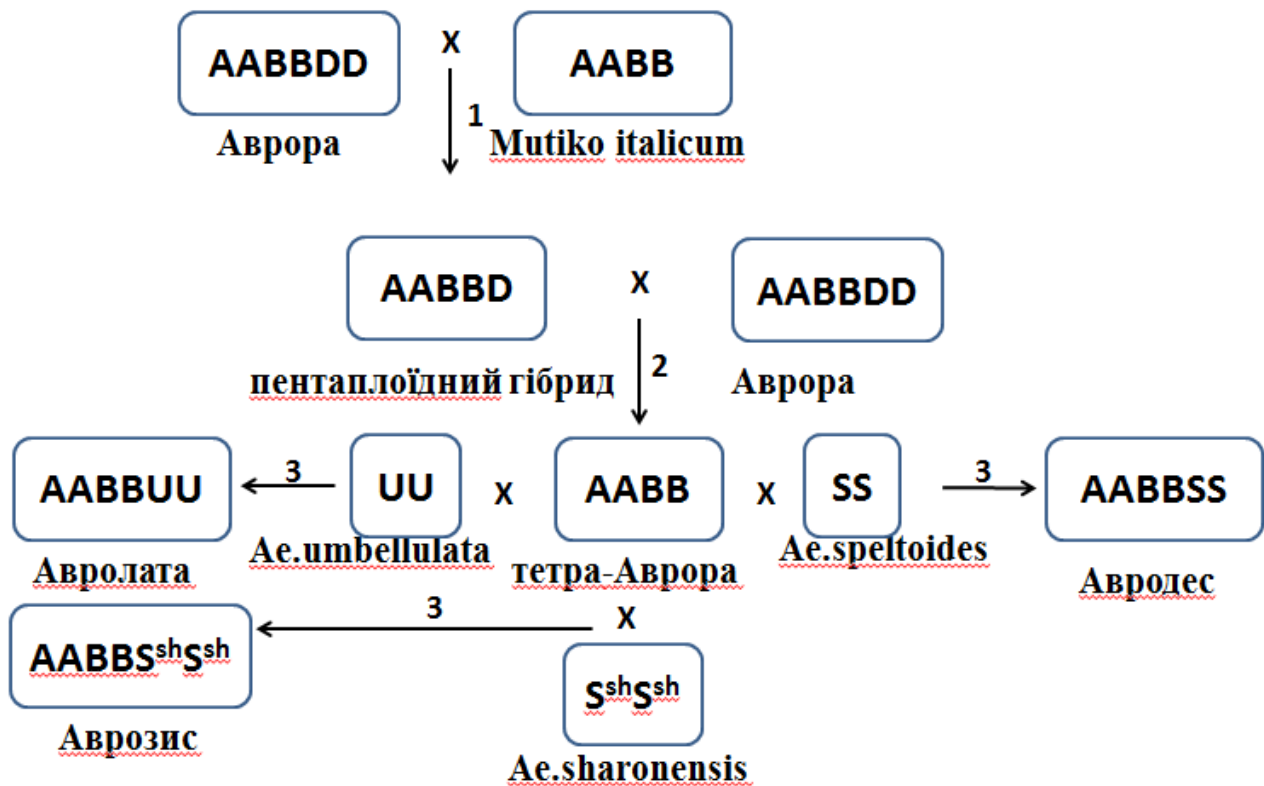


Рис. 2.1. Схема створення геномно-заміщених амфідиплоїдів на основі геному AABBDD сорту Аврора. **1** – Пентаплоїдний гібрид AABBDD було отримано від схрещування *T. aestivum*, сорт Аврора та *T. durum*, лінія Mutiko italicum. **2** – Пентаплоїд шість разів беккросувався з сортом Аврора, серед нащадків від самозапилення рослин шостого беккросу цитологічно знайдено тетраплоїди AABB (тетра-Аврора). **3** – Тетра-Аврору схрестили з одним з вказаних диплоїдних егілопсів, гібрид F_1 обробляли колхіцином, утворилися амфідиплоїд з субгенами А та В від сорту Аврора та субгеномом егілопсу, який за суттю замінив собою субгеном D сорту Аврора (за [36]).

Інтрогресивні лінії м'якої пшениці, похідні геномно-заміщених амфідиплоїдів Авродес, Аврозис та Авролата, було отримано в період 1983-1990 роки як цитологічно сталі гексаплоїдні лінії [35,37,62] та ідентифіковано щодо кількості та цитологічної належності чужинного хроматину у період

2.2. Методи дослідження

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

2.2.1. Методика гібридизації. На колосі рослини, яку було визначено материнським компонентом схрещування, пінцетом видаляли пиляки в двох крайніх квітках кожного колоску, виключаючи 2-3 верхніх та 2-3 нижніх, найбільш молодих. Середні квітки кожного колоску видаляли. Луски не обрізали. Емаскульоване колосся накривали пергаментним ізолятором і залишали для запилення. Запилювали через 2-4 дні, один колос материнської рослини одним колосом рослини, обраної як батьківський компонент схрещування. Запилювали вручну, поміщаючи зрілий пиляк до квітки із зрілою маточкою. За необхідності колосся з майже зрілими пиляками зберігали у холодильнику при 4°C до двох тижнів. Обмолот виконували вручну.

2.2.2. Методика оцінки ознак. За ознаками морфології рослини оцінювали на певних стадіях онтогенезу: за опушенням листкової піхви – на стадії кущіння, за остистістю, формою та щільністю колосу, восковою осугою, кольором пилків на – стадії цвітіння, за кольором колоса, опушенням, формою та жорсткістю колоскової луски, наявністю вдавленості в її основі – на зрілому колосі (табл. 2.1). Оцінювали середні колоски головного колосу.

За борошнистою россою рослини оцінювали у польових умовах тричі на стадіях кущіння, виходу в трубку, молочної стиглості за 9-бальною шкалою [42]: повна стійкість – 9 балів, 5% ураження на нижніх листках – 8 балів, 10% ураження на листках нижнього ярусу – 7 балів. Такі рослини вважаються стійкими. Ураження до 20% (сильне ураження листя прикореневої зони та незначне ураження листя середнього ярусу) 6 балів, до 40% (сильне ураження листя прикореневої зони та середнього ярусу) – 5-6 балів, 60% (сильне ураження усього листя рослини) – 3-4 бали, до 80% (сильне ураження усієї

рослини, в тому числі і колосу) – 1-2 бали. Такі рослини вважались чутливими до польових рас збудників.

Таблиця 2.1

Градації морфологічних ознак, за якими оцінювали рослини

Ознака	Цифровий шифр та характеристика градації ¹⁾			
опушення листяної піхви	1: відсутнє		2: у наявності	
воскова осуґа	1: у наявності	2: відсутня		3: на колосі відсутня
остистість	1: колос безостий	2: остистий	3: напівостистий	4: з остеподібними відростками
форма та щільність колосу	1: веретено- подібний		2: спельтоїдний	3: скверхедни й
зabarвленн я пиляку	1: жовтий		2: фіолетовий	
колір стиглої колоскової луски	1: червоний	2: світло- коричневи й	3: темно- коричневий	4: чорний
опушення колоскової луски	1: відсутн є	2: густе суцільне	3: густе, нерівномірно розподілене за лускою	
	4: роз- ріджене	5: розріджене, нерівномірно розподілене за лускою		6 – щетинчасте
жорсткість колоскової луски	1: м'яка	2: жорстка	3: луска дуже жорстка	
вдавле- ність основи луски	1: у наявності	2: відсутня	3: вдавненість слабо виражена	

Примітка: ¹⁾ Шифром «1» завжди позначається градація, властива сорту Аврора.

2.2.3. Методи цитологічних досліджень. Дослідження мітозу. Метафаза мітозу вивчали для встановлення кількості хромосом в клітинах первинних корінців індивідуальних паростків досліджуваних зразків пшениці за модифікованою методикою [860]. Насіння пророщували на фільтрувальному папері у чашках Петрі до досягнення корінцями довжини 10-15 мм, після чого паростки переносили до холодильника на ніч. Зранку наступного дня, за 5 годин до проведення передобробки, пророслі зерна залишали при кімнатній температурі без доступу світла. Один або два корінці відривали пінцетом та переносили до скляної трубочки з двома отворами, закритими сітчастим матеріалом для подальшої обробки. Метод підрахунку кількості хромосом реалізували в три етапи.

I етап – передобробка та фіксація. Під час забору корінців трубочки з корінцями поміщали в крижану воду. З крижаної води трубочки з матеріалом переносили в порожній ексікатор та заливали емульсією (додавали 200 мкл 1-бромнафталіну до 400 мл води, струшували в пластиковій пляшці кілька хвилин до отримання емульсії). Постукували ексікатор з трубочками, щоб вийшли бульбашки повітря і корінці повністю були в емульсії. У результаті цього бромнафталін осідає на корінцях та проникає у клітини. Він сповільнює проходження метафази, тобто слугує накопиченню метафазних клітин у меристемі, та викликає конденсацію хромосом. Ексікатор вміщували в холодильник при 4°C. За 16–18 годин трубочки виймали із емульсії бромнафталіну, струшували залишки емульсії та вміщували в ексікатор з крижаною оцтовою кислотою на 4 години – відбувалась фіксація матеріалу. Далі зразки проводили через суміш крижаної оцтової кислоти та 96 спирту (співвідношення 1 : 3), 4 години, після чого трубочки з матеріалом переносили до ексікатору з 80% спиртом для зберігання у холодильнику при 4°C.

II етап – мацерація (гарячий гідроліз) та забарвлення. Після спирту трубочки промивали дистильованою водою. Підігрівали на водяній бані скляний стакан з 1 н розчином HCl з термометром до 60-62°C. Вміщували у стакан трубочки. Температура різко падає на 2–4°. Протягом 12 хвилин

гарячого гідролізу температура має залишатися у межах 58–60°. Після гідролізу трубочки переносили у холодну дистильовану воду для охолодження і далі — до реактиву Шиффа, де залишали в темному місці на 1,5-2 год. при кімнатній температурі.

Склад реактиву Шиффа (на 400 мл):

390 мл H₂O

10 мл HCl 37% (конц.)

2 г фуксину основного для ФСК

4,8 г метабісульфіту Na чи K

Після додавання всіх компонентів реактив Шиффа не потрібно перемішувати. Розчин вистоявся у темряві до повного знебарвлення.

Трубочки діставали з реактиву Шиффа. Вміщували в стакан з дистильованою водою і корінці переносили в пробірки типу еппендорф для подальшого вивчення.

Етап 3 – підготовка чавлених препаратів та встановлення кількості хромосом. Для цього на предметне скло у краплині 45% оцтової кислоти препарувальною голкою відрізали забарвлену у фіолетовий колір верхівку корінця, накривали покривним склом. Ручкою препарувальної голки постукували по покривному склу для розподілу клітин по предметному склу у моношар. Процес можна контролювати при збільшенні 10 ок. х 10 об. Після доброго розподілу клітин покривне скло придавлюється до предметного і препарат готовий для пошуку метафазних пластинок та підрахунку в них кількості хромосом. Пластинки шукали при збільшенні 10 ок. х 10 об., хромосоми рахували при збільшенні 10 ок. х 40 об.

Дослідження мейозу [49]. Рослинний матеріал збирали на стадії мейозу, при цьому колос знаходиться у трубці між 2 та 3 листками. Кожен колос, звільнений від листків, занурювали у розчин Карнуа (6 частин спирту, 3 частини хлороформу, 1 частина крижаної оцтової кислоти), у пробірці об'ємом 10мл та інтенсивно струшували. Розчин змінювали один раз через 12 год. За добу після початку фіксації пробірки поміщали в холодильник для збереження.

Для приготування чавлених препаратів колоски попередньо профарбовували в 1-2% розчину карміну у 45% розчині оцтової кислоти протягом 20 хвилин. Для покращення контрасту матеріал зберігався в розчині барвника і більш довгий період – від доби до кількох тижнів. Потім окремі квітки відділяли за допомогою препарувальних голок і розбирали для вивільнення усіх трьох пиляків. З них вилучали материнські клітини пилку (МКП). На предметне скло наносили 45% розчин оцтової кислоти та, за необхідністю, краплину карміну для кращого профарбовування препарату. Для покращення контрасту препарат злегка нагрівали над спиртовим пальником. Потім накривали покривним скельцем та надавлювали зверху пальцем через фільтрувальний папір.

Хромосомні конфігурації вивчали в метафазі I. Пластинки шукали при збільшенні 10 ок. x 10 об., хромосоми аналізували при збільшенні 10 ок. x 40 об. Підраховували кількість закритих та відкритих бівалентів, унівалентів та мультівалентів. Вивчали тетради на наявність мікроядер та реєстрували кількість тетрад з різною кількістю мікроядер. Гібриди від схрещування рослин з різним складом генома мають облігатні уніваленти, кількість яких залежить від кількості хромосом, за якими розрізняються компоненти схрещування. Кількість облігатних унівалентів враховували для корекції співвідношень розщеплення між фенотипними класами стосовно теоретично очікуваного $(3:1)^n$.

2.2.4. Методи роботи з білками. Для зручності роботи з пластинами поліакриламідного гелю, в яких виконували електрофоретичне розділення білків їх «пришивали» до скла, обробляючи одну з кожної пари скляних пластин розчином такого складу:

Оцтова кислота	1 мл
Етиловий спирт	10 мл
3 – methacryloxypropyltrimethoxysilane (bind-silan)	50 мкл

Перед використанням розчин настоювали протягом двох тижнів. Наносили 20-30 мкл розчину силану на скло, розтирали по поверхні скла фільтром, що не лишає ворсу.

Екстракція та електрофорез альфа- та бета-амілази [12]. Екстракційний буфер для β -амілази містить 0,5 М NaCl, 1,5% β -меркаптоетанол та барвник – бромфеноловий синій. Екстракційний буфер для α -амілази містить 30% цукрозу, 0,2% хлорид кальцію, бромфеноловий синій. Поліакриламідний гель для β -амілази має вміст акриламідну 7,5% на буфері 0,02 М трис, 0,06 М гліцин. Співвідношення акриламідну до бісакриламідну в гелі становить 1:60. Поліакриламідний гель для α -амілази має аналогічний буферний склад, проте містить 5 М сечовини, гель містить 6,5% акриламідну. Електродний буфер (рН 8,4) містить 0,01 М трис, 0,06 М гліцин. Електрофорез проходить від „-” до „+”, параметри - 300 В, 15 мА (на одне скло). Розділення триває 3 години.

Розчин крохмалю для виявлення амілаз (в розрахунку на 1 л), містить 30 г гідролізованого крохмалю, 9 г ацетату натрію та 3мл крижаної оцтової кислоти. Розчин Люголя (1 л): калій йодистий – 5 г, йод – 2,6 г, 100% трихлороцтова кислота – 50,4 мл.

Екстракція та електрофорез пероксидази [9]. Екстракцію проводили із сухого, подрібненої зернівки протягом 16-18 годин у 150 мкл екстракційного буферу такого складу: Трис-300 мг, Аскорбінова кислота-350 мг, Сахароза-10 г, Цистеїн HCl-35 мг. ЕДТА-150 мг, H₂O- до 50мл, кристалики бромфенолового синього. Після екстракції проби центрифугували 10 хвилин із прискоренням 10000 xg. У слоту вносили 35мкл екстракту. Розділення пероксидази проводили від аноду до катоду протягом 6,5 годин. Параметри проведення (на дві пластини гелю): U = 299 V; I = 15 mA (протягом 30 хвилин); U = 299 V; I = 30 mA (до кінця електрофорезу)..

Гель з розділенням пероксидази фарбували у 0,1М розчині гваяколу із внесеним пероксидом водню протягом 20 хвилин. Після появи світло-червоних смуг ізоферменту гель промивали та фіксували забарвлення 10% оцтовою кислотою.

Екстракція та електрофорез кислій фосфатази [38]. Сухі зерна подрібнювали, додавали в проби 150 мкл екстракційного буферу. Склад екстракційного буферу такий же, як і при електрофорезі зернової пероксидази. Склад гелю, електродного буферу та параметри електрофорезу такі самі, як для бета-амілази. Екстракцію проводили протягом ночі при температурі 4°C. Перед нанесенням проби центрифугували 10 хвилин при 6 тис. об./хв. і відбирали по 25-30 мкл супернатанту кожної проби для аналізу. Склад гелю, електродного буферу такі ж, як при електрофорезі β-амілази. Проходження електрофорезу кислій фосфатази – від катоду до аноду. Параметри проведення (на дві пластини гелю): $U = 299 \text{ V}$; $I = 15 \text{ mA}$ (протягом 30 хвилин); $U = 299 \text{ V}$; $I = 30 \text{ mA}$ (до кінця проведення електрофорезу). Тривалість електрофорезу 3-3,5 годин. Гістохімічне забарвлення проводили розчином складу: 0.2 М ацетатний буфер рН 5.0 – 100 мл, 1-нафтилфосфат (Na-сіль) – 50 мг, 1М $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 1 мл, о-діанізидин – 50 мг. Реакцію зупиняли 10% оцтовою кислотою, гелі промивали проточною водою та висушували. Розчин для виявлення кислій фосфатази містить: 0,2 М ацетат натрію – 70 мл, 0,2 М оцтова кислота – 30 мл, 1М MgCl_2 – 0,1 мл, О-діанізидин – 100 мг, α- нафтилфосфат – 100 мг. Для проявлення кислій фосфатази гель витримували у відповідному розчині протягом години при 37°C. Фермент виявлявся у вигляді коричневих смуг.

Екстракція та електрофорез зернової та листової естераз [7]. Для електрофорезу зернової естерази зерна витримували дві доби на зволжених фільтрах, щоб вони наклюнулись, довжина колеоптиля не перевищувала 1 см. Для виділення листової естерази рослини витримували до стадії, коли довжина зеленого листя становила 3-7 см. Після цього рослинний матеріал гомогенізували у 200 мкл екстракційного буферу (фосфатний буфер рН 7.0) витримували протягом ночі при температурі 4°C. Перед нанесенням проби центрифугували 5 хв. при 8000 хг. Для електрофоретичного розділення відбирали по 20 мкл супернатанту у слоту. Електрофорез проводили від катода до анода протягом 3,5-4 годин.

Гелі фарбували у розчині для виявлення активності листової та зернової естераз: α - нафтилацетат – 80 мг, ацетон – 2 мл, сіль fast blue RR – 200 мг, фосфатний буфер (pH=6,0) – 200 мл. Після проявлення достатньої кількості зон активності, забарвлення фіксували 10% розчином оцтової кислоти. Скло з гелем промивали проточною водою, висушували.

Екстракція та електрофорез гліадинів проводили за модифікованою методикою Бжезинського [10,149]. SGB-буфер містить 1,2 г гістидину солянокислого, 1,6 мл крижаної оцтової кислоти на 50 мл водного розчину. MSS-буфер має такий склад: 30,4 г акриламід, 1,6 г метиленбісакриламід, 4,55 мл розчину заліза сірчанокислого (концентрація 44 мг/100 мл), 245 мг аскорбінової кислоти на 100 мл буферу. Розділяючий гель містить 22 мл розчину MSS, 67,5 мл 4,44 М сечовини, 6 мл оцтової кислоти, 4,5 мл води. Концентруючий гель об'ємом 25 мл містить 4,25 мл розчину SGB, 3,9 мл MSS розчину, 16,8 мл 4,44 М сечовини. Десятикратний електродний буфер (300 мл) містить 10 мл мурашиної кислоти. Розчин для проявлення (в розрахунку на 1 л) включає : 200 мг Coomassie brilliant blue R, 170 мл ацетону, 60 мл крижаної оцтової кислоти та 60 мл 100 % трихлороцтової кислоти.

Подрібнену у ступці Абіха зернівку заливали 150 мкл 70% етанолу, через 1,5 години відбирали 70 мкл спиртового екстракту та випарювали етанол протягом ночі при температурі 50°C. Сухий осад розчиняли в 50 мкл 5,5 М сечовини, витримували протягом 30 хв. У слоту вносили 20 мкл екстракту. Розділяючий (нижній) гель нашаровували бутанолом, вимиваючи його після полімеризації гелю дистильованою водою. Для нижньої камери (–) використовували однократний електродний буфер, для верхньої камери (+) – вдвічі розведений нижній. Розділення проводили від анода до катода протягом 6 годин. Умови проходження форецу (розрахунок на 2 пластини гелю): $U = 299$ V; $I = 15$ mA – до входження в розділяючий гель; $U = 299$ V; $I = 30$ mA – до кінця форецу. Після закінчення форецу гелі витримували у розчині з Coomassie brilliant blue R протягом 8-16 годин та відмивали гарячою водопровідною

водою. Зони активності гліадинів виявляли у вигляді синіх смуг на блакитному фоні.

Екстракцію та електрофорез запасних білків глютенінів виконували за методикою Лемлі [453]. Зернівки подрібнювали у ступці Абіха і заливали 200 мкл екстрагуючого буферу, що містив: гліцерин – 11 мл; SDS – 2 г; 1 М трис-НСІ (рН 6,8) – 8 мл; бета-меркаптоетанол – 5 мл; кілька кристаликів бромфенолового синього; дистильована вода – до 95 мл. Екстракцію проводили протягом 1,5 год. Витримували на киплячій водяній бані протягом 3 хв. Розділення відбувалося у 12,5 % поліакриламідному гелі. Розділяючий гель (30 мл) містив: 30% р-н акриламідну – 12,5 мл; 1% р-н метилбісакриламідну – 3,1 мл; 1,5 М р-н трис НСІ (рН 8,7) – 7,5 мл; 10% р-н SDS – 0,3 мл; дистильована вода – 6,5 мл; 10% р-н персульфату амонію – 100 мкл; TEMED – 10 мкл. Концентруючий гель (10 мл): 30% р-н акриламідну – 1,67 мл; 1% р-н метилбісакриламідну – 1,3 мл; 1,5 М р-н трис НСІ (рН 8,7) – 1,25 мл; 10% р-н SDS – 0,1 мл; дистильована вода – 5,6 мл; 10% р-н персульфату амонію – 50 мкл; TEMED – 5 мкл. Розчини персульфату амонію та TEMED додаються безпосередньо перед заливанням гелю. Електродний буфер: трис – 3,6 г; гліцин – 17,3 г; SDS – 1,2 г; дистильована вода – до 1,2 л. (рН 8,3). В кожному слоту наносили по 11 мкл білкового екстракту. Електрофорез проводили від «-» до «+» і завершували після виходу з гелю фронту бромфенолового синього. Умови розділення: 300 В, 30 мА – до входження фронту барвника у розділяючий гель, далі – 300 В, 60 мА до кінця електрофорезу (в розрахунку на дві пластини гелю). Після закінчення розділення скло з гелем фіксували протягом 12 годин у фарбі такого складу: Coomassie brilliant blue R – 200 мг; етиловий спирт 96% – 170 мл; крижана оцтова кислота – 60 мл; ТХО (100%) – 60 мл; дистильована вода – до 1 л. Надлишки фарби відмивали проточною водою з додаванням невеликої кількості оцтової кислоти.

2.2.5. Методи роботи з ДНК. Розчини для екстракції ДНК із рослинного матеріалу. ЦТАБ (цетилтриметил амоній бромід, СТАВ) -буфер: 1,4 М хлорид натрію, 20 мМ ЕДТА, 100 мМ трис солянокислий (рН 8.0), 2% ЦТАБ, 10

мкг/мл РНКаз, рН 8.0. Суміш для депротейнізації: хлороформ та ізоаміловий спирт у об'ємних співвідношеннях 24:1. Суміш для преципітації нуклеїнових кислот: 95% етиловий спирт, 0,5 М ацетат натрію, рН 5.2 [878]. Виділення ДНК з рослинних тканин виконували за модифікованим методом [228]. Етиольовані пагони (зернівки або заморожене листя з зелених рослин) зважували та розтирали в ступці за низької температури (для заморожування використовували рідкий азот). Гомогенат інкубували в ЦТАБ-буфері за температури 65°C протягом години; використовували 2 мл буфера на 1 г тканини. Додавали до гомогенату рівний об'єм суміші хлороформ:ізоаміловий спирт, та м'яко перемішували протягом 30 хвилин. Зразки центрифугували протягом 10 хвилин із прискоренням 8000 xg; верхню – водну – фазу відбирали, та із нею повторювали процедуру депротейнізації сумішшю хлороформу та ізоамілового спирту. Із відібраної водної фази осаджували нуклеїнові кислоти: додавали рівний об'єм ізопропанолу, інкубували пробірки протягом кількох годин за температурою -20 °C та центрифугували протягом 15 хвилин із прискоренням 10000 xg. Осад ресуспендували в 70% етанолі та осаджували, як написано вище. ДНК розчиняли в ТЕ-буфері.

Концентрацію та якість виділеної ДНК досліджували спектрофотометрично на приладі СФ-2000 в УФ діапазоні спектру за довжин хвиль 230, 260 та 280 нм, що відповідає спектрам поглинання цукрів, нуклеїнових кислот та протеїнів відповідно. Зразки розводили в 75 разів; вимірювання проводили проти кювети із розведеним в 75 разів ТЕ-буфером. Концентрацію ДНК визначали за формулою $C = D \times 50 \times 75$, де С – концентрація, D – поглинання на довжині хвилі 260 нм, 50 – перерахунковий коефіцієнт для нуклеїнових кислот, 75 – розведення зразків.

Суміші для ПЛР містили буфер для Таq-полімерази однократний (трис-НСl 100 мМ, КСl 500 мМ, Nonidet NP40 0,8% (o/o), рН 8.8), 2,5 пМ кожного праймеру в суміші, 1,5 мМ MgCl₂, 2 мМ кожного із дезоксирибонуклеотидтрифосфатів, 50-100 нг матричної ДНК, 1 одиницю активності Таq-полімерази (різних виробників). Ампліфікацію, здебільшого,

проводили в такому режимі роботи термоциклера: 1) початкова денатурація при 95 °С - 3 хв., 2) денатурація при 94 °С - 1 хв., 3) гібридизація при 55 (або 60) °С – 1 хв., 4) елонгація при 72 °С – 2 хв., 5) фінальна елонгація при 72 °С – 10 хв; етапи 2-4 повторювались протягом 35-45 циклів. Реакцію виконували переважно за [715]. Оптимізацію ПЛР з новоствореними праймерами використовували з tdПЛР [435]. Для ампліфікації використовували термоциклери “Eppendorf Master Cycler Personal” (Німеччина) або “Applied Biosystems 2720” (США).

Електрофорез ДНК у агарозному гелі проводили за [727]. Наявність продукту ампліфікації контролювали в агарозному 2% гелі, приготованому на 1^x ТБЕ-буфері. Готували буфер з 5кратного ТБЕ буферу: трис (гідроксиметил амінометан) – 54 г, борна кислота – 27,5 г, EDTA (етилендіамін тетраацетат) 0,5М, рН 8,0 – 20 мл, об’єм доводили до 1 л дистильованою водою. У камеру для горизонтального електрофорезу заливали 1^x ТБЕ-буфер. Буфер для нанесення зразків в слоти агарозного гелю містив: 60% гліцерин, кілька кристаликів бромфенолового синього та ксилен-ціанолу. Параметри електрофорезу: 200 V, силу струму поступово змінювали від 85 до 120 мА. Продукти візуалізували бромистим етідієм в ультрафіолетовому світлі ($\lambda = 320 - 340$ нм) з використанням маркерів мас PBR 322 гідролізована ензимом BsuR1 (M21) та ДНК фага λ гідролізована Bgl1 (M17) (виробництва SibEnzyme).

Електрофорез ДНК у 6% поліакриламідному гелі із 7 М сечовиною:

30% акриламід, на 1 ^x ТБЕ	8 мл;
2% метиленбісакриламід, на 1 ^x ТБЕ	6 мл;
сечовина	16,8 г;
1 ^x ТБЕ	до 40 мл;
10% розчин персульфату амонію	480 мкл;
N, N, N',N' -тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД)	20 мкл.

Буфер нанесення для форезу в поліакриламідному гелі містив: 99% формахід – 9,5 мл, 0,5 М EDTA, рН = 8,0 – 0,5 мл, бромфеноловий синій та

ксиленціанол– 1 – 2 кристали. Розчин персульфату амонію та ТЕМЕД додавали безпосередньо перед заливанням гелю. Зразки прогрівали 3 хвилини при температурі 95°C у ампліфікаторі, охолоджували на льодяній бані. Електрофорез проводили від катода до анода протягом 3,5 – 4 годин. Умови фореу: 400V – незмінно, 27 мА до входження фронту барвника в гель, після входження – 33 мА. Розділені у гелі фрагменти ДНК виявляли за допомогою реакції зі сріблом [125,128].

Після проведення розділення продуктів ампліфікації в 6%-му поліакриламідному гелі пластини гелю фарбували азотнокислим сріблом. Гель промивали проточною та дистильованою водою. Фіксацію гелю проводили у фіксаторі протягом 8 хвилин. Забарвлювали 0,012 М розчином азотнокислого срібла (додаючи 1,2 мл 37% формаліну із розрахунку на 500 мл розчину барвника безпосередньо перед занурюванням гелю у барвник) протягом 10 – 11 хвилин. Промивали дистильованою водою. Обробляли гель проявником, додаючи 2 мл формаліну у розрахунку на 1 літр проявника безпосередньо перед початком проявлення. Знову фіксували у фіксаторі протягом 2 хвилин. Гель промивали у дистильованій воді. Сушили гель. Для виявлення фрагментів ДНК у ПААГ використовували наступні розчини: нітрат срібла – 1,5 г, 37% формалін – 2,4 мл (додається безпосередньо перед використанням), об'єм доводили дистильованою водою до 1 л. Розчин для проявлення фрагментів ДНК, розділених у ПААГ: гідроксид натрію 45% – 33 мл, формалін – 2 мл (додається безпосередньо перед використанням), об'єм розчину доводили дистильованою водою до 1 л.

Виділення та очищення продуктів ампліфікації з поліакриламідного гелю [727]. Целофан з гелем на ньому перенесли у резервуар наповнений водою з концентрацією EtBr 10мг/мл. Після 10 хвилин фарбування целофан з гелем перенесли на транслюмінатор для ідентифікації продуктів ампліфікації ПЛР. Гель з компонентами спектру вирізали з гелю стерильним скальпелем та поміщали у пробірки. Подрібнювали скляною паличкою, заливали 600 мкл TE + 0.1 М NaCl, поміщали пробірку на 16 годин при 37°C для дифузії ДНК з

акриламідного гелю. Після інкубації у термостаті, пробірки процентрифугували на малих оборотах з метою осадити акриламідний гель на дні. Супернатант, що містив ДНК, переносили у нову пробірку де, ДНК переосажували спиртами. Після чого процентрифугували пробірки при 13 тис. об/хв на холоді 20 хвилин..

Виділення та очищення ДНК з агарозного гелю. Компонент електрофореграми вирізався стерильним скальпелем, переносився у 500 мкл пробірку що містила маленький отвір на дні і була заповнена на 1,5 см скловатою. Така пробірка поміщалася в більшу (1,5 мл) і центрифугувалася 5 хвилин при 6 тис. об/хв. [727]. В результаті на дні 1,5 мл пробірки утворювався осад, що складався з ТБЕ буферу та розчиненої у ньому ДНК. Подальша очистка ДНК проводилася з використанням набору GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific). Осад розчиняли у 50 мкл TE буферу та вимірювали концентрацію ДНК.

2.2.6. Методи статистичної обробки даних. Перевірку значущості різниці між емпіричним розподілами рослин за фенотипними класами та теоретичним, розрахованим у відповідності до нульової гіпотези, яка висувалась, виконували із застосуванням методу χ^2 [24]. Для порівняння співвідношення між невеликими обсягами класів (сума варіантів всіх класів менше 120) використовували чотирьохпольний критерій хі-квадрат з поправкою Єйтса за формулою $\chi^2 = \sum \frac{(|O - E| - 0,5)^2}{E}$, де O – обсяг емпіричного класу, T – обсяг теоретичного класу.

Якщо розподіл варіантів ознаки не підкорявся закону Гауса, використовували непараметричні критерії оцінки значущості статистичних гіпотез, зокрема дисперсійний аналіз Кроскала-Уолліса [24].

Частки порівнювали за допомогою z-критерію, коли обсяг вибірки, для якої визначалася частка, перевищував 120. При порівнянні часток $<0,25$ застосовували ϕ -перетворення [24].

Для дослідження зв'язку між ознаками за відсутності нормального розподілу варіант у вибірці розраховували коефіцієнт кореляції Спірмена [24].

Якщо кількість порівнянь не перевищувала 4, для урахування ефекту множинних порівнянь використовували поправку Бонферроні для вихідного рівня значущості 0,05: $\alpha_n = 0,05/k$, де k — кількість порівнянь, α_n — потрібний рівень значущості. Критичне значення χ^2 -квдрата розраховували за формулою

$$\chi^2_n = \chi^2_1 + (\chi^2_2 - \chi^2_1) \times \frac{\alpha_n - \alpha_1}{\alpha_2 - \alpha_1},$$

де χ^2_n — потрібне критичне значення критерію χ^2 -квдрат, χ_1 та χ_2 — критичні значення χ^2 -квдрат, що знаходяться у таблиці ліворуч та праворуч від потрібного критичного значення, α_n — потрібний рівень значущості, α_1 та α_2 — рівні значущості, що знаходяться у таблиці критичних значень χ^2 -квдрата зліва та справа, відповідно [24].

Якщо обсяг одного з класів чотирьохпольної таблиці був менший 5,

використовували точний критерій Фішера за формулою $P = \frac{R_1!R_2!C_1!C_2!}{N!O_{11}!O_{12}!O_{21}!O_{22}!}$, де

R_1 та R_2 — суми за рядками, C_1 та C_2 — суми за стовпчиками, O_{11} , O_{12} , O_{21} , O_{22} — числа у комірках чотирьохпольної таблиці [24].

Для визначення зчеплення між генами використовували метод LOD scores [362]. Формулу для розрахунку показника правдоподібності наводимо у відповідних експериментальних підрозділах, де пояснювати її сенс більш доцільно. Для переведення одиниць кросинговеру до одиниць карти хромосоми використовували функцію Косамбі [438].

РОЗДІЛ 3

ЦИТОЛОГІЧНА СТАБІЛЬНІСТЬ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ

3.1. Мінливість ліній за кількістю хромосом

Відомо, що внесення чужинного генетичного матеріалу у стабілізований геном рослинного виду часто має наслідком цитологічну нестабільність нового геному [135,299,586,917]. Проте цитологічну стабільність чужинно-заміщених та транслокованих ліній вважають більш високою у порівнянні з амфідиплоїдами та чужинно-доданими лініями [586]. Цитологічно стабільною є лінія, у генераціях якої підтримується одна і та сама кількість хромосом. Для гексаплоїдної пшеничної лінії це 42, у мейозі формуються 21 бівалент, і гамети отримують по 21 хромосомі. Питання цитологічної стабільності інтрогресивної лінії будь-якої структури безперечно набуває важливості при її застосуванні у експериментах з генетичного аналізу [835]. Тому всі лінії, які були задіяні у схрещуваннях та гібридологічному аналізові, були охарактеризовані нами щодо їхньої цитологічної стабільності. Перш за все лінії було охарактеризовано за кількістю хромосом в окремих їхніх представниках.

Було досліджено (2003 рік, 50 паростків на лінію) 17 ліній — похідних Авродесу (табл. 3.1), 21 лінія — похідних Авролати (табл. 3.2), та 20 ліній — похідних Аврозису (табл. 3.3), які під час їхнього створення були гексаплоїдними [16] і з того часу за кількістю хромосом не перевірялися. Наявність у геномі пшениці включень чужинного хроматину, що є характерним для інтрогресивних ліній, взагалі може бути чинником цитологічної нестабільності таких ліній [156,751]. Поодинокі випадки появи анеуплоїдних (40, 41, 43 хромосоми) рослин інтрогресивних ліній не виходять за межі таких показників, вказаних для генотипу Аврора [461]. Хоча за нашими даними (табл. 3.3), серед 82 паростків Аврори не було знайдено жодного анеуплоїда.

Характеристика ліній — похідних Авродесу за кількістю хромосом

Лінія ges	Модальна кількість хромосом	Частка паростків з кількістю хромосом, що відхиляється від модальної, $p \pm s_p$		
		40	41	43
2	42		0,06±0,033	0,02±0,020
5	42		0,14±0,049	
7	42	0	0,02±0,020	0
12	42	4	0,06±0,033	0
15	42	0	0	0,02±0,020
16 безоста	42	0	0,04±0,028	0
16 остиста	42	0	0,02±0,020	0
19	42	0	0	0
33	42	0	0	0
34	42	0,02±0,020	0,06±0,033	0
51	42	0	0,02±0,020	0
53	42	0	0	0
54	42	0	0,02±0,020	0,02±0,020
60	42	0	0	0
67	42	0	0	0
80	42	0	0	0
87	42	0,02±0,020	0	0

Найбільш детальну інформацію представлено для ліній похідних Аврозису, залучених нами до генетичного аналізу (табл. 3.3). Серед перевірених паростків крім нулі-, моно-, три- та тетрасоміків зустрічались рослини з телоцентриками, дицентриками, кільцевими хромосомами та фрагментами.

Характеристика ліній – похідних Авролати за кількістю хромосом

Лінія res	Модальна кількість хромосом	Частка паростків з кількістю хромосом, що відхиляється від модальної, $p \pm s_p$		
		40	41	43
158	42	0	0	0
161	42	0	0	0
164	42	0	0	0,02±0,020
176	42	0,02±0,020	0,02±0,020	0
177	42	0	0,02±0,020	0
189	42	0	0,06±0,033	0
193	42	0	0,02±0,020	0
195/2	42	0	0	0,02±0,020
196	42	0	0,02±0,020	0
201	42	0	0,02±0,020	0
202	42	0	0	0
206	42	0	0	0
207	42	0	0	0
211	42	0	0,02±0,020	0
215	42	0	0	0
217	42	0	0	0
219	42	0	0	0
221	42	0	0,02±0,020	0
222	42	0,02±0,020	0	0
226	42	0	0	0
237	42	0	0,02±0,020	0

Частка паростків з кількістю хромосом, що відрізняються від модального значення, була $0,032 \pm 0,0060$ для похідних Авродесу та $0,014 \pm 0,037$ для

похідних Авролати. Різниця між ними була лише на рівні значущості 0,05 ($z = 2,48$). Для похідних Аврозису частка таких паростків була значно вищою, $0,102 \pm 0,0091$. Вона відрізнялась як від 0,014 ($z = 8,99$), так і від 0,032 ($z = 6,50$).

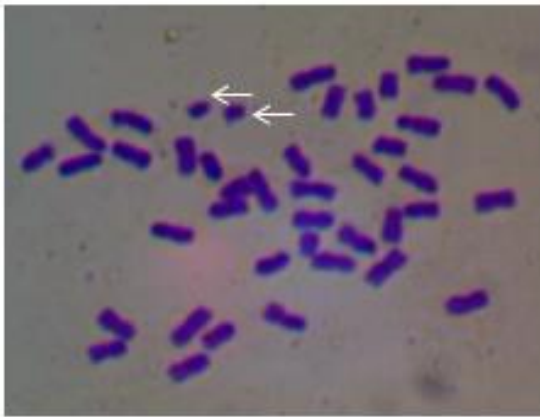
В лініях – похідних Аврозису res122, 132 та 139 було по 4 хромосоми з супутниками замість двох, властивих сорту Аврора та інтрогресивним лініям, створеним на його основі. У геномі пшениці м'якої, який не зазнавав жодних інтрогресивних втручань, є дві пари хромосом з ядерцевими організаторами, що цитологічно виявляються як супутники, 1В та 6В. Сорт Аврора походить від схрещувань озимих сортів пшениці м'якої Нойцухт, Безостая 4, Безостая 1 (цит. за [32]). Сорт Нойцухт несе житню хромосому 1R [31], а сорт Аврора — житню транслокацію 1BL.1RS [587], спонтанну хромосомну перебудову, що її було відібрано через наявність у плечі 1RS генів стійкості до низки грибних захворювань пшениці. Завдяки цьому у метафазі мітозу спостерігається лише одна пара хромосом з супутниками, 6В. Супутники цієї хромосоми доволі великі, як правило, добре розрізняються на цитологічних препаратах (рис. 3.1, а). Коли у паростків деяких ліній доводиться констатувати наявність чотирьох супутників замість двох, друга пара супутників відрізняється від першої (рис. 3.1., г). По-перше, ці супутники принаймні вдвічі менші за супутників хромосоми 6В. По-друге, вони слабо відділяються від основної маси хромосоми, тобто перетяжка слабо виражена (рис. 3.2). Тому ми вважаємо, що другу пару супутників видно не на кожній метафазній пластинці. Коли серед рослин однієї і тієї самої лінії констатується наявність метафазних пластинок з двома та чотирма супутниками, скоріше за все лінія характеризується стабільною наявністю чотирьох супутників, проте їх видно не завжди. Хромосомна локалізація другої пари супутників не встановлена.



а)



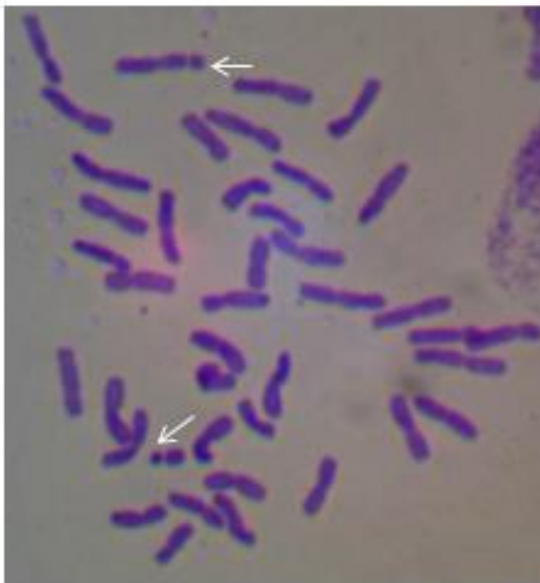
г)



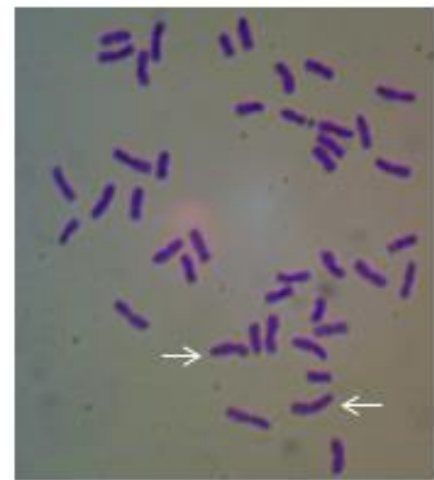
б)



д)



в)



е)

Рис. 3.1. Метафазні пластинки ліній – похідних Аврозису з типовим хромосомним складом генотипу Аврора (а) та відхиленнями від такого: б) 42 хромосоми, 2 пари дуже коротких; в) 41 хромосома, 1 із супутником звичайна, 1 із супутником вкорочена; г) 43 хромосоми, 2 хромосоми з нетиповими

супутниками, 1 зі звичайним, гомолог вкорочений, 2 дицентрики; д) 41 хромосома, 2 різні телоцентрики; е) 42 хромосоми, 2 дицентрики. (Об'єктив 40X, масштаб не витримано).

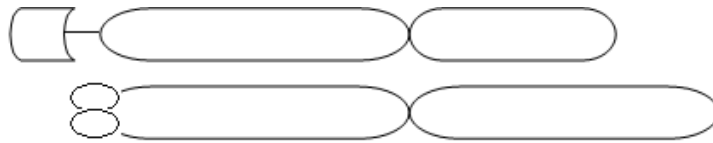


Рис. 3.2. Схема хромосоми 6В з обов'язковим супутником (зверху) та невідомої хромосоми з другою парою супутників.

Пророщування ліній – похідних різних геномно-заміщених амфідиплоїдів для отримання корінців показало, що лінії відрізняються одна від одної за схожістю, причому найбільшою мінливістю характеризуються лінії — похідні Аврозису (табл. 3.4). Ці лінії за схожістю можна було розділити на чотири групи : схожість, близьку до рекурентного сорту має лінія res134, схожість більше 60% мають лінії res117, 128, 132, 137, середню схожість (30–60%) мають лінії res115, 118, 122, 127, 139, 140, 146, схожістю до 30% характеризуються лінії res121, 135, 138, 148. Оскільки похідні Аврозису показали й найбільшу мінливість за кількістю хромосом, було перевірено, чи не відбивається схильність окремих ліній до анеуплоїдії на схожості насінин. Як видно з таблиці 3.4, показники схожості для ліній варіюють від 19 до 98%. Проте жодного зв'язку між мінливістю за кількістю хромосом та схожістю насіння ліній встановлено не було ($r_s=0,04$).

Виходить, що лінії з відносно високою часткою анеуплоїдів, необов'язково мають великий відсоток насінин, що не проростають. Отже, деякі порушення у кількості хромосом можуть бути сумісні з життям, що не є чимось новим для алогексаплоїдних рослин. З іншого боку, є лінії з низькою схожістю та низьким же відсотком анеуплоїдів. Проте ніколи не можна дізнатися, яку саме хромосомну кількість мали насінини, які не проросли.

Можливо, в цьому випадку анеуплоїдія зачіпає такі хромосоми, без яких неможливий розвиток рослини.

Таблиця 3.3

Характеристика ліній — похідних Аврозису за кількістю хромосом

Лінія res	Кількість паростків лінії з даною кількістю хромосом								Всього рослин
	40	41	42	41+t	40+2t	43	інша	Дицентрик	
102	1	3	36						40
115	0	6	31				1	0	38
117		2	64	0	0	10	0	0	83
118	1	6	61	0	0	2	0	0	70
121	0	3	24		0	1	0	0	28
122	0	2	30	6	0	1	0	0	39
127	0	3	61	2	0	1	0	0	67
128	2	10	72	0	0	2	3	0	89
132	0	3	74	2	2	2	1	2	86
134	0	0	95	0	0	0	5	0	100
135	0	0	25	0	0	0	2	0	27
137	0	0	103	0	0	0	5	10	109
138	0	0	25	0	0	0	1	0	26
139	0	0	74	0	0	0	1	0	78
140	0	0	43	0	0	1	1		46
142	0	0	28	0	0	0	0	0	28
143	0	1	51	0	0	1	0	0	53
146	0	0	33	0	0	0	0	1	34
147	0	0	47	0	0	1			48
148	0	0	21	1	0	1	2	1	27
Аврора	0	0	78	0	0	0	0	0	78

У лініях res146 та 148 спостерігали пару дуже маленьких хромосом, не властивих каріотипу Аврора, мабуть, димінутивних (рис.3.1, б). Можна

припустити, що поява димінутивних хромосом є наслідком дії гаметоцидної хромосоми 4S^{sh} під час створення ліній – похідних Аврозису. Аналогічний випадок спостерігали у аллоцитоплазматичній лінії пшениці із цитоплазмою від *S. cereale*, в якій було виявлено хромосоми, що утворилися внаслідок димінуції хроматину [621].

Таблиця 3.4

Характеристика ліній Аврозису за лабораторною схожістю та кількістю анеуплоїдів (відсоток з біноміальною похибкою)

Лінія res	Лабораторна схожість, %	Кількість анеуплоїдів, %	Лінія res	Лабораторна схожість, %	Кількість анеуплоїдів, %
102	36 ± 4,8	10 ± 4,7	135	25 ± 3,5	7 ± 5,0
115	41 ± 4,0	18 ± 6,3	137	85 ± 2,9	6 ± 2,2
117	67 ± 3,9	23 ± 4,6	138	19 ± 3,2	4 ± 3,8
118	47 ± 3,5	13 ± 4,0	139	58 ± 4,0	5 ± 2,5
121	22 ± 3,4	14 ± 6,6	140	36 ± 3,9	7 ± 3,6
122	36 ± 3,9	8 ± 4,3	143	55 ± 5,0	4 ± 1,9
127	45 ± 4,1	9 ± 3,5	146	31 ± 3,8	3 ± 2,9
128	77 ± 3,9	19 ± 4,2	147	52 ± 5,0	21 ± 1,4
132	75 ± 3,9	14 ± 3,7	148	26 ± 3,6	22 ± 8
134	98 ± 1,2	5 ± 2,2	Аврора	97 ± 1,7	0 ± 0

Для з'ясування питання про те, чи відрізняється цитологічна стабільність одних і тих самих ліній різних генерацій, було вивчено паростки насіння рослин, вирощених у 2009 року із насіння, отриманого у 2002 (м. Одеса), 2004 (м. Київ), 2007 та 2008 (м. Біла Церква) роках. Для цього дослідження було обрано лінії, які протягом кількох років спостереження демонстрували нестабільність за ознаками морфології, а також електрофоретичними спектрами гліадинів та глютенінів (розділ 4). Планувалось дізнатися, чи не пов'язана нестабільність за морфологічними та біохімічними ознаками з цитологічною нестабільністю ліній. Визначали хромосомні числа у

50 паростків з кожної генерації. Жодної різниці у цитологічній стабільності одних і тих самих ліній різних генерацій встановлено не було (табл. 3.5). До того ж, зіставлення таблиць 3.1–3.3 з таблицею 3.5 показало, що не вдається зв'язати нестабільність ліній за деякими ознаками з їхньою цитологічною нестабільністю. Відмінності хромосомних чисел від модального 42 статистично не розрізняються для ліній, мінливих за деякими ознаками морфології та запасними білками, та таких, що мінливими не є. Лінії – похідні Аврозису за цим показником зберігають відмінність від ліній – похідних Авродесу та Авролати в бік зменшеної частки модальної кількості хромосом серед паростків окремих ліній.

Таблиця 3.5

Цитологічна стабільність деяких інтрогресивних ліній різних генерацій, вказано частку 42-хромосомних рослин з біноміальною похибкою

Номер лінії res ¹⁾	Рік отримання насіння			
	2002	2004	2007	2008
7	1	1	0,98±0,020	0,98±0,020
13	1	0,98±0,020	0,98±0,020	0,96±0,028
22	0,98±0,020	0,94±0,034	0,94±0,034	0,96±0,028
31	1	0,98±0,020	0,98±0,020	0,98±0,020
32-1	0,96±0,028	0,94±0,034	0,96±0,028	0,96±0,028
33	1	1	0,98±0,020	1
34	1	0,96±0,028	0,98±0,020	0,94±0,034
39	0,98±0,020	0,98±0,020	1	0,98±0,020
45	1	1	0,98±0,020	0,98±0,020
67	1	1	1	0,98±0,020
70	0,96±0,028	1	1	1

Продовження табл. 3.5

Номер лінії res ¹⁾	Рік отримання насіння			
	2002	2004	2007	2008
80	1	1	1	1
102	0,96±0,028	0,94±0,034	0,90±0,042	0,92±0,0378
113	0,98±0,020	0,98±0,020	0,96±0,028	0,98±0,020
115	0,90±0,042	0,88±0,046	0,82±0,0543	0,84±0,0518
118	0,96±0,028	0,94±0,034	0,90±0,042	0,96±0,028
121	0,90±0,042	0,92±0,0378	0,86±0,0490	0,90±0,042
122	0,90±0,042	0,92±0,0378	0,92±0,0378	0,94±0,034
132	0,96±0,028	0,90±0,042	0,90±0,042	0,90±0,042
139	1	0,96±0,028	0,96±0,028	0,94±0,034
143	0,96±0,028	0,98±0,020	0,96±0,028	0,98±0,020
147	1	0,98±0,020	1	1
148	0,90±0,042	0,78±0,059	0,80±0,0566	0,90±0,042
151	1	0,98±0,020	1	0,98±0,020
181	1	100	1	1
218	0,98±0,020	0,96±0,028	0,96±0,028	0,98±0,020
250	0,98±0,020	1	1	1

Примітка: ¹⁾ лінії res 1–80— похідні Авродесу, лінії res 102–148— похідні Аврозису, лінії res 151–250— похідні Авролати.

За літературними даними, кількість анеуплоїдів серед нащадків деяких амфідиплоїдів або залишалася стабільною від покоління до покоління [25], або збільшувалася в ряді поколінь [141,644]. Для моносомних ліній показано [608], що кількість моносоміків серед нащадків від покоління до покоління зменшується через добір проти анеуплоїдного пилку. В той же час нулісоміки та інші анеуплоїди, на відміну від моносоміків, є стерильними, повністю або частково, хоча зберігається й імовірність їхнього новоутворення серед нащадків

інтрогресивних ліній за рахунок можливих порушень у проходженні мейозу. Очевидно, кількість анеуплоїдів у інтрогресивних лініях тяжіє до рівноваження за допомогою цих протилежно спрямованих процесів.

Результати, наведені у підрозділі 3.1, показують, що 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 димінутивні 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.

3.2. Картина кон'югації хромосом у M1 МКП ліній

Джерелом цитологічної нестабільності ліній та сортів пшениці є процес мейозу, якщо впродовж його окремих фаз спостерігаються певні відхилення від нормального ходу подій. Одним з таких відхилень може бути зниження кросинговерного потенціалу через неповну кон'югацію гомеологічних хромосом. Наслідком цього є формування відкритих бівалентів, де два гомологи зв'язані хіазмою тільки в одному плечі пари хромосом замість двох. Кількісна характеристика цього відхилення дається у відповідності до запропонованого [796] рівняння $2\mu = -\ln(1 - B)$, де 2μ є величина кросинговерного потенціалу, а B — кількість плечей, пов'язаних хіазмою. Так, для закритого бівалента $B=2$, а для відкритого — $B=1$. Повна відсутність кон'югації між двома гомологами призводить до наявності у метафазі 1 мейозу двох унівалентів замість біваленту. На відміну від члена пари бівалентів, кожен з яких відходить до одного з полюсів, поведінка унівалентних хромосом характеризується трьома ймовірностями: (1) 0,25 відійти до даного полюсу,

0,75 не відійти до даного полюсу через (2) відставання та втрату у цитоплазмі (0,50) та (3) відходження до іншого полюсу (0,25) [423]. Саме це є причиною формування анеуплоїдних гамет та зигот та відхилення кількості хромосом у паростках від 42. Картина поведінки хромосом у мейозі показує причину відхилення кількості хромосом від 42, якщо це спостерігається при обстеженні цитологічної стабільності лінії.

Картина мейозу МКП цих ліній розглядалась у порівнянні з такою рекурентного генотипу м'якої пшениці Аврора, яка, в свою чергу, характеризується певними особливостями. Через наявність транслокації 1BL.1RS Аврора на відміну від сортів з неперебудованим геномом часто має у М1 мейозу уніваленти, внаслідок чого формуються гамети з анеуплоїдною кількістю хромосом. Значення кросинговерного потенціалу для Аврори варіює від 2,27 до 3,68 із середнім значенням 2,83 [30,32]. За нашими даними, кросинговерний потенціал генотипу Аврора склав 2,28. Серед нащадків від схрещування сорту Аврора (батьківський компонент) з моносомними лініями Чайніз Спринг з'являються анеуплоїди через функціонування анеуплоїдних чоловічих гамет із 20 хромосомами та гамет із аберантними хромосомами [30]. Крім того, показано, що у хромосомах 3В і 2В цих сортів є гени часткового десинапсису [30]. Така геномна будова сорту Аврора сприяє послабленню кон'югації, що виявляється у збільшенні кількості відкритих бівалентів та появи унівалентів. Це слід брати до уваги при інтерпретації результатів вивчення мейозу інтрогресивних ліній, створених на основі цього сорту, а також гібридів F_1 за їхньою участю. Адже послаблення кон'югації між хромосомами може бути не наслідком наявності інтрогресій у геномі одного з партнерів зі схрещування, а проявом генотипу Аврора. Отже само по собі послаблення кон'югації ще не свідчить про зміну структури геному лінії стосовно геному Аврори. Можливо, що заміщення хромосом Аврори із 2 та 3 гомеологічних груп або транслокації за участю цих хромосом може компенсувати негативний вплив рецесивних генів десинапсису сорту Аврора.

За картиною поведінки хромосом у мейозі було вивчено 26 ліній — похідних Аврозису, 5 ліній — похідних Авродесу та 12 ліній — похідних Авролати (табл. 3.6). Вивчали лише ті лінії, які брали участь у формуванні гібридних комбінацій, що створювались для потреб генетичного аналізу. Саме цим пояснюється різна кількість вивчених ліній серед похідних різних геномно-заміщених амфідиплоїдів [100].

Таблиця 3.6

Показники кон'югації хромосом у МІ МКП ліній *T. aestivum* / *Ae. sharonensis*, *T. aestivum* / *Ae. speltoides*, *T. aestivum* / *Ae. umbellulata* та рекурентного генотипу Аврора (середні значення \pm похибка)

Лінія res	Кількість МКП	Кількість бівалентів		унівалентів	мультивалентів	2μ
		закритих	відкритих			
Аврора	48	16,79 \pm 0,19	4,14 \pm 0,19	0,33 \pm 0,11	0,03 \pm 0,018	2,28
Лінії — похідні Аврозису						
115	102	18,53 \pm 0,13 ²⁾	1,96 \pm 0,11 ²⁾	0,90 \pm 0,11 ²⁾	0,02 \pm 0,016	2,65
117	109	19,26 \pm 0,09 ²⁾	1,29 \pm 0,07 ²⁾	0,90 \pm 0,10 ²⁾	0,07 \pm 0,033	2,95
118	74	19,00 \pm 0,12 ²⁾	1,68 \pm 0,10 ²⁾	0,59 \pm 0,11	0,17 \pm 0,051 ¹⁾	2,9
121	102	18,57 \pm 0,13 ²⁾	2,06 \pm 0,13 ²⁾	0,61 \pm 0,09	0,04 \pm 0,031	2,71
122	47	18,40 \pm 0,14 ²⁾	2,17 \pm 0,16 ²⁾	0,85 \pm 0,15 ²⁾	0	2,63
126	77	19,82 \pm 0,07 ²⁾	0,84 \pm 0,04 ²⁾	1,01 \pm 0,11 ²⁾	0	3,32
127	78	17,96 \pm 0,12 ²⁾	2,51 \pm 0,13 ²⁾	1,05 \pm 0,11 ²⁾	0,21 \pm 0,044 ²⁾	2,47
128	87	18,62 \pm 0,10 ²⁾	1,92 \pm 0,12 ²⁾	0,69 \pm 0,10 ¹⁾	0,06 \pm 0,022	2,69
129	102	18,77 \pm 0,10 ²⁾	2,06 \pm 0,10 ²⁾	0,43 \pm 0,08	0	2,86
130	85	18,91 \pm 0,09 ²⁾	1,74 \pm 0,08 ²⁾	0,68 \pm 0,10 ¹⁾	0	2,85
131	72	18,96 \pm 0,17 ²⁾	1,75 \pm 0,15 ²⁾	0,44 \pm 0,10	0	2,89
132	80	18,30 \pm 0,11 ²⁾	2,20 \pm 0,14 ²⁾	1,00 \pm 0,11 ²⁾	0,06 \pm 0,027	2,57
134	76	18,61 \pm 0,19 ²⁾	2,07 \pm 0,16 ²⁾	0,58 \pm 0,10	0,05 \pm 0,031	2,74
135	34	19,26 \pm 0,11 ²⁾	1,56 \pm 0,09 ²⁾	0,35 \pm 0,13	0,05 \pm 0,019	3,09
136	132	19,04 \pm 0,12 ²⁾	1,67 \pm 0,10 ²⁾	0,48 \pm 0,07	0,21 \pm 0,048 ²⁾	2,93
137	69	18,01 \pm 0,26 ²⁾	2,55 \pm 0,21 ²⁾	0,81 \pm 0,11 ²⁾	0,22 \pm 0,074 ¹⁾	2,51
138	93	19,85 \pm 0,06 ²⁾	1,01 \pm 0,05 ²⁾	0,56 \pm 0,09	0,08 \pm 0,041	3,48
139	82	18,98 \pm 0,15 ²⁾	1,75 \pm 0,13 ²⁾	0,43 \pm 0,09	0,01 \pm 0,014	2,91
140	52	19,40 \pm 0,12 ²⁾	1,40 \pm 0,12 ²⁾	0,81 \pm 0,14 ¹⁾	0,21 \pm 0,058 ²⁾	3,15

Лінія res	Кількість МКП	Кількість бівалентів		унівалентів	мультивалентів	2μ
		закритих	відкритих			
141	69	18,55 ± 0,13 ²⁾	2,29 ± 0,13 ²⁾	0,46 ± 0,10	0	2,78
142	61	19,13±0,14 ²⁾	1,67±0,12 ²⁾	0,30±0,12	0	3,01
143	96	18,56±0,17 ²⁾	2,06±0,14 ²⁾	0,73±0,10 ¹⁾	0	2,7
144	75	18,27±0,12 ²⁾	2,20±0,15 ²⁾	1,07±0,12 ²⁾	0	2,56
145	106	18,29±0,10 ²⁾	2,17±0,13 ²⁾	1,08±0,10 ²⁾	0	2,56
146	120	18,38 ± 0,09 ²⁾	2,03 ± 0,11 ²⁾	1,17 ± 0,10 ²⁾	0,04 ± 0,027	2,57
148	97	18,36±0,10 ²⁾	2,07±0,12 ²⁾	1,13±0,10 ²⁾	0	2,57
Лінії — похідні Авродесу						
7	87	18,8±0,19 ²⁾	2,0±0,10 ²⁾	0,5±0,05	0	2,87
12	100	18,3±0,07 ²⁾	1,8±0,09 ²⁾	0,5±0,08	0,03±0,02	2,44
17	53	18,4±0,15 ²⁾	1,7±0,10 ²⁾	0,3±0,07	0,4±0,13	2,78
19	116	19,1±0,14 ²⁾	1,8±0,08 ²⁾	0,4±0,04	0,02±0,009	3,11
53	88	18,4±0,12 ²⁾	2,1±0,15 ²⁾	0,5±0,10	0	2,71
Лінії — похідні Авролати						
177	77	18,5±0,12 ²⁾	1,4±0,11 ²⁾	0,5±0,11	0,2±0,06 ¹⁾	2,80
189	106	18,3±0,15 ²⁾	2,0±0,13 ²⁾	0,8±0,08 ¹⁾	0	2,56
196	75	17,9±0,11 ²⁾	2,2±0,16 ²⁾	1,1±0,12 ²⁾	0	2,46
206	120	18,3±0,11 ²⁾	2,1±0,11 ²⁾	1,0±0,10 ²⁾	0,1±0,02	2,57
207	82	18,0±0,08 ²⁾	2,2±0,16 ²⁾	1,2±0,12 ²⁾	0,15±0,05 ¹⁾	2,48
211	102	18,0±0,17 ²⁾	2,0±0,10 ²⁾	0,5±0,05	0,4±0,11 ²⁾	2,84
215	76	16,8±0,07	1,7±0,07 ²⁾	0,7±0,10 ¹⁾	0,9±0,10 ²⁾	2,36
217	97	18,7±0,11 ²⁾	1,6±0,10 ²⁾	0,6±0,11	0	2,64
221	107	19,2±0,14 ²⁾	1,8±0,1 ²⁾	0,4±0,05	0	3,18/
221/1	72	18,5±0,13 ²⁾	2,2±0,17 ²⁾	0,4±0,08	0	2,69
226	58	19,2±0,14 ²⁾	1,6±0,12 ²⁾	0,3±0,09	0	3,03
237	87	18,4±0,16 ²⁾	2,1±0,15 ²⁾	0,7±0,08 ²⁾	0	2,62

Примітки: ¹⁾ за t-критерієм без урахування ефекту множинних порівнянь різниця з відповідним показником генотипу на рівні значущості 0,05;

²⁾ те саме на рівні значущості 0,01.

Ми не побачили якоїсь суттєвої різниці у картині М1 мейозу в лініях різного походження. Всі вони (крім 215) у порівнянні з Авророю формували більшу кількість закритих бівалентів. Це не суперечить даним про рецесивний характер десинаптичних генів, носієм яких є Аврора [30]. 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 ліній 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.

Отже, вивчення М1 мейозу в МКП інтрогресивних ліній має значення в плані пророкування цитологічної стабільності чи нестабільності. Можна припускати, що наявність у М1 унівалентів та мультивалентів не є прикметою цитологічної стабільності. Проте дані, наведені у підрозділі 3.1, свідчать про більшу цитологічну стабільність ліній, ніж можна було б очікувати за результатами вивчення мейозу. Здається, що анеуплоїдні гамети, якщо вони і утворюються рослинами інтрогресивних ліній, відкидаються негативним добором на користь еуплоїдних гамет, які переважно беруть участь у заплідненні, та зигот, які формують життєздатне насіння. Непрямим чином ця думка підтверджується зниженою фертильністю практично всіх інтрогресивних ліній. Тобто зернівки утворюються не трьома квітками колоска, як це буває у сортів пшениці, а меншою їхньою кількістю. Найбільш цікавим для нас, з погляду на можливість використання інтрогресивних ліній для генетичного аналізу, є питання про те, чи випадковим чином (стохастично) утворюються анеуплоїдні гамети, які не беруть участь у заплідненні? Чи на перспективу гамети взяти участь у заплідненні може впливати наявність (відсутність) у складі її геному чужинного матеріалу і таким чином здійснюється мейотичний драйв.

Список публікацій, оприлюднених за результатами досліджень, викладених у розділі 3

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;126-27.

Вдовиченко ЖВ, Терновская ТК, Антонюк М.З. Цитогенетическое изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы, устойчивых к мучнистой росе. Агроекологія та біотехнологія. Зб. наук. праць ін-та агроекології та біотехнології. Київ, 1999, вип. 3, с. 70-78

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.

Антонюк МЗ, Вдовиченко ЖВ, Терновская ТК. Цитогенетическое изучение линий мягкой пшеницы, устойчивых к мучнистой росе за счет генов *Aegilops sharonensis*. 11-й Конференция Европейского общества по анеуплоидии пшеницы; 24-28 июля, 2000; Новосибирск, Россия. Тезисы докладов. Новосибирск, 2000:194-5.

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. In: Pogna NE, Romano M, Pogna EA, Galterio G , editors. Proceedings of the Tenth International Wheat Genetics Symposium; 1-6 September 2003; Paestum, Italy. Roma: Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura; 2003, p. 1272-4.

Маньковська О, Терновська Т, Антонюк М. Цитогенетична характеристика стійких до борошнистої роси ліній пшениці з хромосомою 4S^{sh} та без неї і гібридів за їхньою участю. Перша конференція молодих вчених «Біологія рослин та біотехнологія»; 5–7 жовтня 2011; Біла Церква, Україна. Тези доповідей, 2011, с.53.

РОЗДІЛ 4

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

4.1. Визначення геномної структури через вивчення хромосомних конфігурацій у М1 МКП гібридів

Коли інтрогресивні лінії беруть участь у схрещуваннях для їхнього генетичного аналізу за якоюсь ознакою, дані з вивчення хромосомних конфігурацій у М1 мейозу МКП є абсолютно необхідними для правильного розуміння результатів фенотипної оцінки рослин. При цьому для кожного гібрида F_1 , створеного від схрещування інтрогресивних ліній одна з одною або з генотипами м'якої пшениці, береться до уваги хромосомна конфігурація у М1 мейозу при найвищій асоціації хромосом. Наявність пари унівалентів у М1 МКП гібрида між лініями показує, що в них перебудована одна і та сама хромосома, проте по-різному, так що такі хромосоми не кон'югують. Якщо різними виявляються дві хромосоми з різних пар хромосом, про це свідчить поява 4-х облігатних унівалентів у мейозі. В гібриду між Авророю та інтрогресивною лінією одна з таких хромосом є пшеничною, а інша може бути хромосомою егілопса чи хромосомою з великою пшенично-егілопсною чи пшенично-пшеничною перебудовою. Такі хромосоми у інтрогресивній лінії представлені парою гомологів та кон'югують. Гетероморфний або відкритий біваленти можуть формуватися, коли кон'югують хромосоми, гомологія яких порушена внаслідок внутрішньохромосомної перебудови, пшенично-пшеничної або пшенично-егілопсної. Наявність мультивалентів також свідчить про внутрішньохромосомні перебудови, які відрізняють інтрогресивну лінію від рекурентного генотипу [37,62]. 21 пара бівалентів у гібриді між інтрогресивними лініями свідчить про їхню подібність за геномною структурою.

Навіть якщо інтрогресивна лінія є цитологічно стабільною та утворює 21 бівалент у мейозі, це не означає, що такими ж будуть її гібриди з генотипами м'якої пшениці або з іншими інтрогресивними лініями. Дійсно, якщо лінія має чужинну хромосому, яка заміщує пшеничного гомеолога, у МІ мейозу такої лінії формуються 21 бівалент, але 20 бівалентів плюс два уніваленти у гібриді F_1 з генотипом м'якої пшениці. Якщо схрестити дві інтрогресивні лінії, наявність 21 бівалента у МІ мейозу гібридів F_1 засвідчує, що ці лінії мають однакову геномну структуру, тобто співпадають за обсягом та гомеологічною належністю чужинного хроматину. Навпаки, якщо вони не є однаковими, цю різницю висвітлює характер хромосомних конфігурацій у МІ мейозу за умов максимальної асоціації хромосом. Коли у мейозі такого гібрида утворюються уніваленти замість бівалентів, ми маємо пам'ятати, що співвідношення між фенотипними класами у поколінні, що розщеплюється, буде спотворено, якщо критичний ген розташований у хромосомі, яка не бере участь у формуванні біваленту і втрачається у анафазі 1 з імовірністю 0,5 взагалі та з імовірністю 0,75 для конкретної гамети [423]. Можливість прогнозування відхилень емпіричних розщеплень в таких випадках від теоретично очікуваних була продемонстрована [31,66,835]. Для такого прогнозу потрібно знати поведінку хромосом у мейозі гібридів F_1 , що створюються за участю інтрогресивних ліній, а також життєздатність анеуплоїдних нащадків, які виникають за умов нерегулярного мейозу. Саме тому було вивчено поведінку хромосом у МІ гібридів F_1 у всіх випадках, коли інтрогресивні лінії піддавали генетичному аналізу. Особливо активно за картиною метафази мейозу вивчались лінії – похідні Аврозису, як самі лінії, так і їхні гібриди, тому що частина з них була носієм гаметоцидної хромосоми, частина – ні. Вони активно залучались до генетичного аналізу і було цікаво дізнатися, як впливає наявність гаметоцидної хромосоми на його результати. Тому, як і у підрозділі 3.2, переважна частина даних щодо вивчення мейозу стосується похідних Аврозису. Лінії – похідні Авролати та Авродесу вивчали набагато менше.

4.1.1. Вивчення гібридів інтрогресивних ліній – похідних Аврозису з сортом Аврора. При схрещуванні з пшеницею м'якою чужинно-заміщених ліній – похідних Аврозису можливим є утворення гомеологічних асоціацій хромосом. Показано [711], що кон'югація між хромосомами м'якої пшениці та виду *Ae. sharonensis* відбувається, хоча й з дуже низькою частотою. Принаймні з А-хромосомами можуть кон'югувати всі хромосоми егілопса [34]. За літературними даними, застосування методу диференційного забарвлення хромосом дало змогу з'ясувати, що хромосоми А та D геномів кон'югують з частотою 0,77 асоціацій на клітину, В та S — 0,52, а А та D — 0,23 асоціацій на клітину [273]. Такі незначні частоти не можуть суттєво викривлювати висновки щодо геномної структури лінії відносно рекурентного генотипу, проте сама можливість утворення мультивалентів за рахунок кон'югації негомологічних хромосом має бути врахована при аналізі результатів вивчення мейозу.

Гібриди інтрогресивних ліній з сортом Аврора характеризувались більшою кількістю закритих бівалентів, ніж сам сорт Аврора (табл. 4.1). І це не суперечить даним про рецесивний характер десинаптичних генів, носієм яких є Аврора [30]. З іншого боку, виявлено лінії (табл. 4.1, рис. 4.1) гібриди яких з сортом Аврора суттєво відрізняються від цього сорту за кількістю тривалентів ($p < 0,01$): лінії 115, 117, 118, 127, 128, 129, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142 та квадривалентів ($p < 0,05$, лінія 148). Це певним чином може виправдовувати збільшену у порівнянні з сортом Аврора кількість унівалентів у гібридах. Хоча, на наш погляд, головна причина появи мультивалентів у мейозі гібридів між лініями та сортом Аврора – це наявність у геномі ліній реципрокних транслокацій, які могли виникати під час створення ліній. Тому при схрещуванні з сортом Аврора та з деякими інтрогресивними лініями (табл. 4.2) вони здатні утворювати мультиваленти у М1 мейозу, хоча мейоз у самих лініях відбувається без особливих порушень. При схрещуванні з сортом Аврора виявляються і такі транслокації, в яких брали участь лише пшеничні хромосоми. Якщо хромосоми не утворюють бівалент у мейозі, у тетрадах з'являються мікроядра (рис. 4.1). Формування містку у АІ також свідчить про

Таблиця 4.1

Показники кон'югації хромосом у МІ МКП гібридів F₁ інтрогресивних ліній *T. aestivum* / *Ae. sharonensis* з рекурентним генотипом Аврора¹⁾

Лінія ges, схрещена з Авророю	Кількість клітин	Закриті біваленти	Відкриті біваленти	Уніваленти	Мультиваленти	
					III	IV
115	95	16,1±0,15**	2,4±0,15**	4,3±0,11**	0,2±0,04**	0,01±0,01
117	78	15,9±0,18**	3,0±0,18**	4,2±0,1**	0,06±0,03*	0±0
118	55	13,9±0,27**	4,3±0,26	4,4±0,18**	0,38±0,07**	0±0
121	50	16,9±0,18	2,6±0,2**	3,0±0,19**	0,02±0,02	0±0
122	95	16,1±0,17**	3,6±0,15	2,5±0,13**	0±0	0,02±0,01
126	71	19,5±0,17**	0**	2,9±0,05**		
127	69	16,4±0,18	2,4±0,18**	4,1±0,1**	0,16±0,04**	0±0
128	66	15,9±0,20**	2,6±0,22**	3,9±0,14**	0,41±0,06**	0±0
129	48	18,8±0,17**	0**	3,8±0,05**	0,29±0,07**	
130	93	17,2±0,07*	0,7±0,07**	1,7±0,10**		
131	96	18,9±0,15**	0**	4,3±0,05**		0,02±0,001
132	59	16,9±0,19	2,8±0,18**	2,5±0,14**	0,02±0,02	0,02±0,02
134	6	16,0±0,73	3,7±0,76**	2,7±0,42**	0±0	0±0
135	47	16,4±0,23*	2,4±0,23**	4,1±0,1**	0,09±0,04*	0,02±0,02
136	72	17,2±0,19	1,9±0,10**	4,4±0,12**		
137	37	15,2±0,22**	3,4±0,18	4,2±0,18**	0,22±0,07**	0±0
138	55	15,7±0,19**	2,9±0,2**	4,5±0,16**	0,11±0,04*	0,02±0,02

Продовження табл. 4.1

Комбінація схрещув.	Кількість клітин	Закриті біваленти	Відкриті біваленти	Уніваленти	Мультиваленти	
					III	IV
139	47	14,670,28 ^{**}	3,9±0,25	4,3±0,18 ^{**}	0,13±0,06 [*]	0,06±0,04
140	56	15,7±0,18 ^{**}	2,9±0,18 ^{**}	4,2±0,15 ^{**}	0,21±0,06 ^{**}	0±0
141	63	18,2±0,13 ^{**}	0 ^{**}	4,8±0,09 ^{**}	0,22±0,06 [*]	
142	79	16,4±0,1	3,1±0,11	1,5±0,19 ^{**}	0,24±0,08 [*]	
143	60	17,1±0,12	2,8±0,09 ^{**}	1,8±0,11 ^{**}		0,01±0,04
144	86	17,3±0,11 [*]	2,3±0,09 ^{**}	2,6±0,08 ^{**}		
145	44	17,0±0,18	3,1±0,14 ^{**}	2,2±0,07 ^{**}		
146	83	16,4±0,13 [*]	3,3±0,13 [*]	2,3±0,09 ^{**}	0,01±0,01	0,05±0,02
148	37	16,2±0,24 ^{**}	3,2±0,21 [*]	2,7±0,17 ^{**}	0±0	0,12±0,04 [*]

Примітка: ¹⁾ – арифметичне середнє значення відрізняється від середнього для сорту Аврора за критерієм Даннета [24] на рівні значущості: * – 0,05, ** – 0,01.

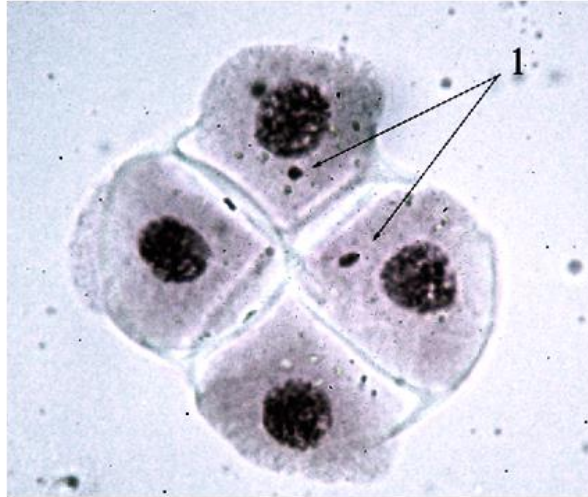


Рис. 4.1. Мікроядра (1) у тетрадах гібрида 126 х Аврора.

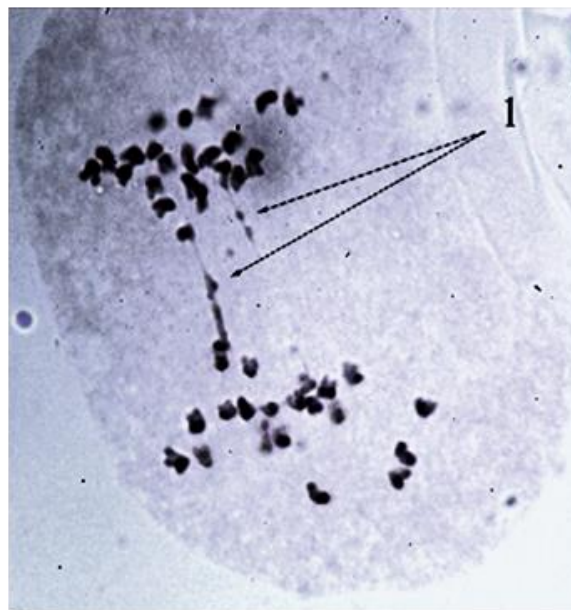


Рис. 4.2. Містки (1) у AI мейозу МКП гібрида 137 х Аврора (Об'єктив 40X)

наявність міжхромосомної транслокації (рис. 4.2). В цілому з таблиці 4.1 видно, що геноми ліній зазнали перебудови у порівнянні з геномом Аврори.

У таблиці 4.1 наведені статистичні оцінки показників, які характеризують перебіг мейозу. Наш досвід свідчить, що найбільшою інформативністю щодо хромосомних перебудов є ці показники при найвищій асоціації хромосом у M1 (табл. 4.2). З цієї таблиці видно, що наявна у лініях найвища кількість хромосом, які змінені настільки значно, що ніколи не кон'югують з гомологом Аврори, — дві. Це можуть бути як заміщені, так і значно перебудовані через інверсії або транслокації хромосоми. Лінії 121, 122, 126, 130, 132, 134, 142–146,

148 відрізняється від Аврори за однією парою хромосом, лінії res 115, 117, 118, 127–129, 131, 135–141 — за двома. Той факт, що всі досліджені лінії виявилися суттєво перебудованими стосовно Аврори, не є випадковим: досліджувалися лінії з чіткими чужинними ознаками – стійкість до борошнистої роси, опушення листкової піхви, остистість, змінений спектр бета-амілази. Результати генетичного аналізу цих ліній за вказаними ознаками наведено у розділі 6.

Таблиця 4.2

Найвища асоціація хромосом у M1 МКП гібридів F₁ від схрещування інтрогресивних ліній — похідних Аврозису з рекурентним генотипом Аврора

Лінія res, яку схрестили з Авророю	Кількість МКП	Модальна конфігурація асоціації хромосом у M1 ¹⁾	Лінія res, яку схрестили з Авророю	Кількість МКП	Модальна конфігурація асоціації хромосом у M1
115	95	19 ^{Пз} +4 ^I	135	47	19 ^{Пз} +4 ^I
117	78	19 ^{Пз} +1 ^{Пв} +4 ^I	136	72	17 ^{Пз} +2 ^{Пв} +4 ^I
118	55	18 ^{Пз} +1 ^{Пв} +4 ^I	137	37	17 ^{Пз} +2 ^{Пв} +4 ^I
121	50	19 ^{Пз} +1 ^{Пв} +2 ^I	138	55	18 ^{Пз} +1 ^{Пв} +4 ^I
122	95	19 ^{Пз} +1 ^{Пв} +2 ^I	139	47	17 ^{Пз} +2 ^{Пв} +4 ^I
126	71	20 ^{Пз} +2 ^I	140	56	18 ^{Пз} +1 ^{Пв} +4 ^I
127	69	19 ^{Пз} +4 ^I	141	63	19 ^{Пз} +4 ^I
128	66	18 ^{Пв} +1 ^{Пв} +4 ^I	142	94	18 ^{Пз} +2 ^{Пв} +2 ^I
129	48	19 ^{Пз} +4 ^I	143	102	18 ^{Пз} +2 ^{Пв} +2 ^I
130	93	19 ^{Пз} +1 ^{Пв} +2 ^I	144	48	19 ^{Пз} +1 ^{Пв} +2 ^I
131	96	19 ^{Пз} +4 ^I	145	39	19 ^{Пз} +1 ^{Пв} +2 ^I
132	59	19 ^{Пз} +1 ^{Пв} +2 ^I	146	83	19 ^{Пз} +1 ^{Пв} +2 ^I
134	6	18 ^{Пз} +2 ^{Пв} +2 ^I	148	57	19 ^{Пз} +1 ^{Пв} +2 ^I

Примітка: ¹⁾ – в табл. 4.2–4.5 Пз — закритий біваленти, Пв — відкритий бівалент, I — унівалент.

Лінії, що мають два облігатних уніваленти та один відкритий (гетероморфний) біваленти (121, 122, 130, 132, 144, 145, 146, 148) розглядаються як такі, що мають одну транслокацію на додаток до заміщення однієї хромосоми. Якщо відкритих бівалентів два (лінії 134, 142, 143), припускається наявність двох транслокацій. Лінія 126 не має такої транслокації, яка б заважала утворенню закритого біваленту. 14 ліній характеризувались наявністю обов'язкових чотирьох унівалентів. Це дає змогу припустити заміщення в їхньому геномі двох пшеничних хромосом на чужинні. З них лінії 115, 127, 129, 131, 135 та 141 не мають таких транслокацій, які заважають повній кон'югації гомологів. Лінії 117, 118, 128, 138 та 140 мають одну, а лінії 136, 137, 139 — дві транслокації.

4.1.2. Особливості перебігу мейозу у гібридах F_1 від схрещування інтрогресивних ліній – похідних Аврозису. Лінії – похідні Аврозису, залучалися у циклічні схрещування для виконання генетичного аналізу, тому картина перебігу мейозу в їхніх гібридах ретельно вивчалася (табл. 4.3). Деякі гібриди між різними інтрогресивними лініями не мають унівалентів у МІ МКП мейозу. Це гібриди 115 x 117, 115 x 139, 117 x 118, 121 x 122, 121 x 148, 122 x 148, 126 x 44, 127 x 117, 128 x 138, 131 x 117, 132 x 121, 132 x 146, 134 x 127, 135 x 117, 135 x 128, 137 x 118, 137 x 138, 138 x 117, 139 x 128, 140 x 138, 142 x 126, 148 x 146. Отже, вказані пари ліній є подібними за структурою геному щодо наявних в ньому інтрогресій. Те, що перебудови відносно геному Аврори у наявності, показує зіставлення даних цієї таблиці та таблиць 4.1, 4.2.

Лінії 121, 122, 132, 146 та 148 (група 1) мають однакову конфігурацію хромосомних асоціацій у мейозі гібридів F_1 з Аворою. Ці лінії мають бути однаковими за геномною структурою та мати одну чужинну хромосому (або значно перебудовану пшеничну) замість пшеничного гомеолога та одну хромосому з транслокацією.

Група 2 ліній 126, 130, 142, 143 також мають одну заміщену хромосому та, відповідно, 0, 1, 2 та 2 транслоковані хромосоми. Проте це не та хромосома, що у ліній групи 1, оскільки у мейозі гібридів між ними утворюються 4 уніваленти.

Іншу велику групу ліній з подібною структурою геному утворюють лінії 115, 117, 118, 127, 128, 131, 135, 137, 138, 139, 140 (група 3). Вони не відрізняються одна від одної за двома заміщеними або значно зміненими стосовно геному Аврори хромосомами, проте між ними є відмінність за хромосомами з транслокаціями.

Лінії 129, 136 та 141 також мають по дві хромосоми, що не кон'югують з гомеологами Аврори. При цьому лінії 129 та 136 (група 4) мають лише одну пару змінених хромосом таку саму, як у лініях групи 2. А лінія 141 має одну спільну змінену хромосому з лініями групи 3 та жодної – з лініями групи 2 і не входить до складу жодної зі сформованих груп.

Щодо гомеологічної належності заміщених та перебудованих хромосом, припущення про це можна робити тільки на основі спостереження за фенотипом інтрогресивних ліній за тим ознаками, що формуються за участю генів, чия хромосомна локалізація відома. Така інформація наводиться у підрозділі 4.4, де і робиться припущення про гомеологічну специфічність чужинних інтрогресій у досліджуваних лініях. *Таблиця 4.3*

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 ^{Пс} + 2 ^{По}	135x117	56	20 ^{Пс} + 1 ^{По}
115x139	37	18 ^{Пс} + 3 ^{По}	135x128	42	18 ^{Пс} + 3 ^{По}
115x148	41	18 ^{Пс} + 1 ^{По} + 4 ^I	135x139	43	19 ^{Пс} + 2 ^{По}
117x118	18	19 ^{Пс} + 2 ^{По}	136 x 129	38	19 ^{Пс} + 2 ^{По}
117x128	54	21 ^{Пс}	136 x 143	29	20 ^{Пс} + 2 ^I

Продовження табл. 4.3

Схрещування ліній res	Кількість МКП	Конфігурація у М1 при максимальній асоціації хромосом	Схрещування ліній res	Кількість МКП	Конфігурація у М1 при максимальній асоціації хромосом
117x134	24	$20^{Pc} + 1^{Po}$	136 x 134	13	$18^{Pc} + 2^{Po} + 2^{I1)}$
118x128	26	$29^{Pc} + 2^{Po}$	137x117	26	$19^{Pc} + 2^{Po}$
118x148	61	$17^{Pc} + 2^{Po} + 4^I$	137x118	65	21^{Pc}
121x117	92	$17^{Pc} + 2^{Po} + 4^I$	137x128	14	21^{Pc}
121x122	61	$20^{Pc} + 1^{Po}$	137x138	54	21^{Pc}
121x128	28	$18^{Pc} + 1^{Po} + 4^I$	138x117	32	21^{Pc}
121x146	47	$19^{Pc} + 2^{Po}$	138x118	42	$19^{Pc} + 2^{Po}$
121x148	53	21^{Pc}	139x128	36	$20^{Pc} + 1^{Po}$
122x139	24	$18^{Pc} + 2^{Po} + 2^I$	139x146	51	$17^{Pc} + 2^{Po} + 4^I$
122x148	34	21^{Pc}	140x138	41	$20^{Pc} + 1^{Po}$
126 x 144	29	$20^{Pc} + 1^{Po}$	140 x 136	44	$18^{Pc} + 1^{Po} + 4^I$
126 x 146	21	$18^{Pc} + 1^{Po} + 4^I$	140x146	34	$18^{Pc} + 1^{Po} + 4^I$
127x117	49	$20^{Pc} + 1^{Po}$	141 x 146	28	$17^{Pc} + 1^{Po} + 6^I$
127x132	26	$16^{Pc} + 3^{Po} + 4^I$	141 x 126	36	$20^{Pc} + 2^I$
128x138	59	$20^{Pc} + 1^{Po}$	141 x 142	34	$18^{Pc} + 2^{Po} + 2^I$
129 x 126	14	$20^{Pc} + 2^I$	142 x 126	71	$19^{Pc} + 2^{Po}$
129 x 143	36	$18^{Pc} + 2^{Po} + 2^I$	142 x 136	51	$18^{Pc} + 1^{Po} + 4^I$
130 x 122	44	$19^{Pc} + 4^I$	146x118	55	$18^{Pc} + 1^{Po} + 4^I$
132x117	38	$19^{Pc} + 4^I$	146x121	29	$20^{Pc} + 1^{Po}$
132x121	86	21^{Pc}	148x117	33	$17^{Pc} + 2^{Po} + 4^I$
132x122	36	$20^{Pc} + 1^{Po}$	148x128	41	$17^{Pc} + 2^{Po} + 4^I$
132x146	23	$20^{Pc} + 1^{Po}$	148x137	31	$17^{Pc} + 3^{Po} + 2^I$
134x127	33	$20^{Pc} + 1^{Po}$	148x146	46	21^{Pc}

4.1.3. Особливості перебігу мейозу у гібридах F_1 від схрещування інтрогресивних ліній – похідних Авродесу та Авролати. Вивчено 28 гібридів F_1 від схрещування інтрогресивних ліній з Аворою (табл. 4.4) та від таких

комбінацій схрещування ліній одна з одною, F_2 яких призначалося для генетичного аналізу ліній за низкою ознак (табл. 4.5).

Таблиця 4.4

Найвища асоціація хромосом у $M1$ МКП гібридів F_1 від схрещування інтрогресивних ліній – похідних Авродесу та Авролати з Аворою

Лінія res, яку схрестили з Аворою	Кількість МКП	Конфігурація у $M1$ при максимальній асоціації хромосом	Лінія res, яку схрестили з Аворою	Кількість МКП	Конфігурація у $M1$ при максимальній асоціації хромосом
12	63	21^{II_3}	196	72	$19^{II_3} + 2^{II_B}$
17	54	21^{II_3}	221	68	$19^{II_3} + 1^{II_B} + 2^I$
177	83	$20^{II_3} + 1^{II_B}$	207	56	$18^{II_B} + 1^{II_B} + 4^I$
206	36	$19^{II_3} + 1^{II_O} + 2^I$	7	52	$18^{II_3} + 1^{II_B} + 4^I$
211	46	21^{II_3}	226	63	$19^{II_3} + 1^{II_B} + 2^I$
221/1	38	$19^{II_3} + 1^{II_B} + 2^I$	237	46	$18^{II_3} + 2^{II_B} + 2^I$
215	67	$19^{II_3} + 1^{II_B} + 2^I$	53	23	$18^{II_3} + 2^{II_B} + 2^I$
217	44	$19^{II_3} + 1^{II_B} + 2^I$	19	51	$19^{II_3} + 4^I$
189	29	$19^{II_3} + 2^{II_B} + 2^I$	–	–	–

Таблиця 4.5

Картина асоціації хромосом у $M1$ МКП гібридів F_1 від схрещування інтрогресивних ліній різного походження одна з одною

Гібрид між лініями res	Кількість МКП	Конфігурація у $M1$ при максимальній асоціації хромосом	Гібрид між лініями res	Кількість МКП	Конфігурація у $M1$ при максимальній асоціації хромосом
177x221	39	$19^{II_C} + 1^{II_O} + 2^I$	7 x 207	68	$16^{II_C} + 2^{II_O} + 6^I$
211x215	46	$19^{II_C} + 1^{II_O} + 2^I$	189 x 221	19	$17^{II_C} + 2^{II_O} + 4^I$
196x143	73	$17^{II_C} + 2^{II_O} + 4^I$	226 x 237	54	$18^{II_C} + 2^{II_O} + 2^I$
211x206	18	$19^{II_C} + 1^{II_O} + 2^I$	189 x 221/1	26	21^{II_C}
142 x 206	38	$16^{II_C} + 3^{II_O} + 4^I$	53 x 19	63	$18^{II_3} + 1^{II_O} + 4^I$
142 x 207	44	$16^{II_C} + 2^{II_O} + 6^I$	–	–	–

Віддати перевагу одному з альтернативних варіантів будови геному інтрогресивних ліній, які висовуються при вивчення мейотичної конфігурації хромосом у МІ гібрида лінії з рекурентним генотипом м'якої пшениці, дає змогу вивчення ліній за морфологічними (підрозділ 4.2) та біохімічними ознаками (підрозділ 4.3), що контролюються генами з відомою хромосомною локалізацією, а також за хромосомно-специфічними молекулярно-генетичними маркерами, зокрема, мікросателітними локусами (підрозділ 4.4). Звичайно, наведені у розділі 4 відомості про структуру геному ліній ми намагались використовувати при спробах зрозуміти результати аналізу F_2 та тесткросів, наведених у розділі 6 дисертації.

4.2. Визначення гомеологічної належності чужинного хроматину за допомогою генів морфологічних ознак

4.2.1. Характеристика інтрогресивних ліній за морфологічними ознаками. Через певну модифікаційну мінливість, властиву виразу морфологічних ознак, а також, часто, немоногенне успадкування ці ознаки далеко не завжди можна використовувати як генетичні маркери певних чужинних хромосом. Тим не менш розвиток градацій ознак морфології, не властивих сорту Аврора, приймалися нами на користь припущення про наявність у геномі ліній чужинного генетичного матеріалу егілопсу (табл. 4.6). Теоретиками генетичного маркірування підкреслювалось, що морфологічна ознака може слугувати маркером, якщо вона контролюється невеликою кількістю генів із доброю експресією і повною пенетрантністю. В літературі є чимало прикладів ефективного використання морфологічних маркерів хромосом для встановлення гомеологічної належності хромосом видів *Triticinae* [121,591,645], ідентифікації чужинних хромосом у інтрогресивних лініях [11,47,290,645], створення пшенично-пшеничних заміщених ліній [26].

Лінія res	остистість ¹⁾ форма та	ціліність колосу ²⁾	вскова осуґа ³⁾	колір зрлого колосу ⁴⁾	олушення КОЛОСОВОЇ ЛУСКИ ⁵⁾	форма луски ⁶⁾	вдавленість ОСНОВИ ЛУСКИ ⁷⁾	КОЛОСОВОЇ ЛУСКИ ⁸⁾	колір пиляка ⁹⁾	стійкість до борошністої роси ¹⁰⁾
68	2	1	1	1	1	1	1	1	2	3
70	2	1	1	1	1	1	1	2	1	2-3
80	2	1	1	1	1	1	1	1	1	3
83	4	1	1	1	1	1	1	1	1	2-3
84	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
95	2	1	1	1	1	1	2	3	1	3
Лінії — похідні Аврозису										
118	2	4	2	1	1	1	1	1	1	2
121	2	4	2	1	3	1	3	1	1	2
122	2	4	2	1	3	2	1	2	1	2
146	2	4	2	1	3	2	1	1	1	2
115	2	1	1	1	2	1	1	1	1	2
117	2	1	2	1	1	1	1	2	1	2
128	2	1	1	1	2	1	1	2	1	2
131	2	1	1	1	3	1	1	2	2	2
132	2	1	2	1	3	1	2	2	1	2
137, 139	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2
138, 140	2	1	1	1	2	1	1	1	1	2
145	2	1	1	1	3	2	3	2	1	2
148	2	1	2	1	1	1	3	2	1	2
126	3	2	1	1	1	2	1	2	2	3
129	3	1	1	1	1	1	1	1	1	3
130	3	1	1	1	1	1	1	1	2	3
134	3	1	1	1	2	1	1	2	1	3
143	4	1	1	3	1	1	1	1	1	2
127	1	1	1	1	1	1	2	3	1	3
135	1	1	1	2	3	1	3	3	1	3
136	1	1	1	1	1	1	2	2	2	3
141, 142	4	3	1	1	1	1	1	1	2	2
143	1	3	1	3	1	1	2	2	1	2

Лінія res	остистість ¹⁾	форма та щільність колосу ²⁾	вскова осуга ³⁾	колір зрлого колосу ⁴⁾	опушення КОЛОСОВОЇ ЛУСКИ ⁵⁾	форма луски ⁶⁾	вдавленість ОСНОВИ ЛУСКИ ⁷⁾	КОЛОСОВОЇ ЛУСКИ ⁸⁾	колір пиляка ⁹⁾	стійкість до борошністої роси ¹⁰⁾
144	1	1	1	1	1	1	2	3	2	3
145	2	1	1	1	3	2	3	2	1	2
146	2	3	2	1	3	2	1	1	1	2
148	2	1	2	1	1	2	3	2	1	2
Лінії — похідні Аврорати										
166	2	1	3	1	1	1	1	1	1	3
189	4	3	1	4	2	1	1	1	2	3
190	2	1	1	1	1	1	3	2	1	3
193	4	3	1	3	1	1	1	1	1	3–2
195	2	1	1	1	1	1	1	1	1	3
206	2	1	1	4	2	1	1	1	1	3
207	2	1	1	4	6	1	1	2	1	3–2
212	2	1	1	4	3	1	1	1	1	3
216	2	1	3	3	1	1	2	2	1	3
217	4	1	3	2	1	1	3	2	1	3
219	4	4	1	3	1	1	2	3	1	3
221	4	4	3	3	1	2	1	1	1	3
222	4	1	1	3	1	1	1	2	1	3
223	4	1	1	2	1	1	1	2	1	3
243	4	1	1	1	1	1	2	3	1	3
254	2	1	3	1	1	1	3	2	1	3

Примітка: цифрами у таблиці позначено такі градації ознак: ¹⁾ 1 – безостий, 2 – остистий, 3 – напівостистий, 4 – остеподібні відростки; ²⁾ 1 – веретеноподібний, 2 – спельтоїдний, 3 – скверхедний, 4 – рихлий ³⁾ 1 – у наявності, 2 – відсутня, 3 – колос без осуги, листя з осугою; ⁴⁾ 1 – червоний; 2 – світло-коричневий; 3 – темно-коричневий; 4 – чорний; ⁵⁾ 1 – без опушення, 2 – густе суцільне, 3 – густе, нерівномірно розподілене за лускою, 4 – розріджене суцільне, 5 – розріджене, нерівномірно розподілене за лускою, 6 – щетинчасте; ⁶⁾ 1 – овальна, 2 – видовжена; ⁷⁾ 1 – у наявності, 2 – відсутня, 3 – виражена слабо; ⁸⁾ 1 – м'яка, 2 – жорстка, 3 – дуже жорстка; ⁹⁾ 1 – жовтий, 2 – червоно-

фіолетовий; ¹⁰⁾ 1 не стійка, 2 – резистентна до борошнистої роси, 3 – стійкість на рівні 7 балів. Сорту Аврора за всіма ознаками притаманна градація 1.

Темний колір зрілої колоскової луски пов'язують з геном егілопсу *Rg2*, локалізованому на хромосомі 1D [60,413]. Встановлено, що ортологічні гени у наявності на першій хромосомі інших геномів пшениці та, можливо, егілопсів [14,579,591]. Відомо, що розвиток воскової осуги на рослинах пшениці зумовлюється генами *W*, розташованими на коротких плечах хромосом 2B та 2D [579]. Відсутність воскової осуги пояснюється інгібуванням синтезу В-дикетонів, за що відповідає ген-інгібітор *W2*, ідентифікований на виді *Ae. tauschii* та розташований на плечі 2DS [133,821]. У сучасних сортів м'якої пшениці цей ген представлений рецесивним алелем *w2*, тому рослини вкриті восковою осугою. Логічно припустити, що інтрогресивні лінії без воскової осуги не мають цього алеля, отже хромосома 2D заміщена чужинним гомеологом. За спостереженнями [11,14,591], рихлий колос властивий рослинам, в геномі яких є заміщення хромосом 6-ої гомеологічної групи. Гени, що контролюють жорсткість колоскової луски та характерну вдавленість її основи (ознака властива м'якій пшениці), локалізовані на хромосомі 2D [60,417]. Наявність гену антоціанової пігментації, локалізованого на хромосомах 7-ої гомеологічної групи, легко спостерігається за появою червоно-фіолетових пиляків [579]. Стійкість рослин до борошнистої роси є ознакою фізіології, а не морфології. Проте у таблиці 4.6 ми наводимо характеристику ліній за цією ознакою, тому що, за нашими даними, ген стійкості маркує хромосоми третьої та сьомої гомеологічних груп егілопсів (пункти дисертації 4.3.3, 4.4.2, підрозділ 6.4). Тому дані таблиці 4.6 свідчать не лише про наявність чужинного хроматину у геномі досліджуваних ліній, а й дають деяку інформацію про гомеологічну належність цього хроматину. Наводимо дані лише про лінії *res* (пояснення у підрозділі 3.1).

З таблиці 4.6 видно, що серед 40 ліній *res* — похідних Авродесу, 29 *res* ліній — похідних Аврозису та 16 *res* ліній — похідних Авролати знайшлась лише одна (*res* 2), 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 групи. Фенотипна характеристика ліній разом з результатами вивчення хромосомних конфігурацій у M1 мейозу дає підстави для визначення гомеологічної належності чужинних хромосом та транслокацій, наявність яких у геномі ліній виявляється при цитологічному вивченні їхніх гібридів F_1 від схрещування з рекурентним генотипом Аврора.

4.2.2. Генетичний контроль ознаки опушення краю листкової піхви.

Генетичний контроль опушення краю листкової піхви було вивчено з метою зрозуміти, чи можна використовувати цю ознаку у якості маркера чужинної хромосоми. У дослідження було відібрано 27 інтрогресивних ліній – похідних Аврозису, в різній мірі сприйнятливих до збудника борошнистої роси. Частина з них мала жорстке щетинчасте опушення листкової піхви по краю (рис. 4.4). Лінії були досліджені нами на наявність чужинного генетичного матеріалу методом електрофорезу запасних білків та ізоферментів [9,10,12,38]. Отримано дані стосовно гомеологічної належності чужинних включень наведено в табл. 4.7. За даними [7,12,38] і результатами, представленими в пункті 4.3.1 цієї роботи, гени β -амілази та кислої фосфатази маркують хромосому $4S^{sh}$, а гени зернової естерази і пероксидази — хромосому $3S^{sh}$. З таблиці 4.7 видно, що більшість ліній із опушеною листковою піхвою характеризуються як носії заміщення $4D/4S^{sh}$, а також досить часто мають заміщення $3D/3S^{sh}$ або транслокацію $3S^{sh}$ хромосоми на хромосому пшениці.

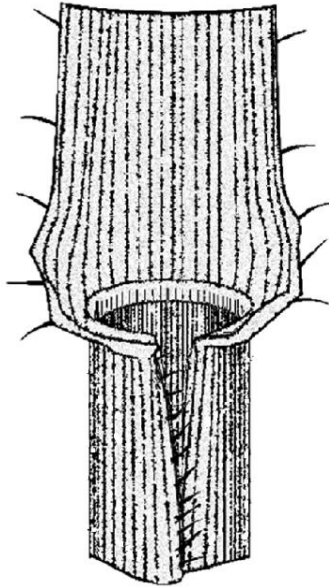


Рис. 4.4. Характер опушення листкової піхви у рослин інтрогресивних ліній пшениці м'якої.

Таблиця 4.7

Характеристика ліній – похідних Аврозису за ознакою опушення краю листкової піхви та наявністю маркерів хромосом S^{sh}

Лінії res	У наявності генетичні маркери хромосоми [16]	Опушення є (+) чи немає (-)
112, 115, 127, 134, 135, 138	$4S^{sh}$	+
117, 128, 136, 137, 139, 140	$3S^{sh} 4S^{sh}$	+
118	$3S^{sh} 4S^{sh} 7S^{sh}$	+
125	$3S^{sh}$	+
121, 122 123, 132, 146, 148	–	–
129, 130, 142, 143, 144	$3S^{sh}$	–
131	$7S^{sh}$	–

Статистична перевірка гіпотези про наявність зв'язку між ознакою опушення краю піхви з кожною з хромосом за точним критерієм Фішера підтвердила гіпотезу про розташування гена опушення на хромосомі 4S^{sh} (табл. 4.8). Ген позначено *Hs-S^{sh}* (hairy sheath) згідно з [579]. Всі досліджувані лінії об'єднувались однією ознакою — стійкістю до борошнистої роси. За даними [283] на хромосомі 3S¹ виду *Ae. longissima* локалізований ген стійкості до борошнистої роси *Pm13*. За нашими даними (табл. 4.6), стійкістю до борошнистої роси характеризуються всі інтрогресивні лінії з маркерними ознаками, які вказували на наявність хромосоми 3S^{sh} або її фрагментів. Саме цим слід пояснювати високу частоту наявності цієї хромосоми у ліній з опушенням краю листової піхви.

Таблиця 4.8

Результати точного тесту Фішера для хромосомної локалізації гена *Hs-S^{sh}*

Кількість ліній	в загальній популяції	з хромосомою 4S ^{sh}	з хромосомою 3S ^{sh}
З опушеною листовою піхвою	14	13	8
З неопушеною листовою піхвою	13	0	6
Загальна кількість ліній	27	13	14
<i>P</i> двобічного тесту		0,003	>0,99

Гібриди F₁ 24-х комбінацій схрещування між лініями з опушенням і лініями без опушення, а також із сортом Аврора мали опушену листову піхву, що вказує на домінуючий характер дії гена *Hs-S^{sh}*.

Гени опушення листової піхви локалізовані в інших представників злаків. Так, у видів *Hordeum vulgare* [436] та *H. bulbosum* [667] в дистальній частині довгого плеча хромосоми 4Н локалізовано гомеоалельні гени опушення листової піхви *Hs* і *Hs^b*, відповідно. Опушення листової піхви забезпечує також широко відомий ген жита (*Secale cereale* L.) *Hp1*, домінуючий алель

якого спричинює розвиток густого опушення стебла під колосом. Локалізація цього гена на дистальній частині довгого плеча 5-ої хромосоми жита, гомологічної довгому плечу 4 хромосоми інших представників *Triticinae* [437] може свідчити про гомеоалельність цього гена двом вже вказаним. Локалізація ідентифікованого нами гена опушення листкової піхви на хромосомі 4S^{sh} добре узгоджується з результатами згаданих досліджень та дозволяє припустити гомеоалельність гена *Hs-S^{sh}* та генів *Hs* і *Hs^b*, хоча в нашій роботі цього доведено не було.

Оцінка за ознакою наявності/відсутності опушення краю листкової піхви всіх ліній, наведених у табл. 4.6, виявила лінії з опушенням: 115, 117, 118, 127, 128, 129, 134–136, 131, 137–140. Лінії 121, 122, 123, 126, 130, 132, 141–146, 148 опушення не мали.

Хромосома 4S^{sh} *Ae. scharonensis* відома як гаметоцидна [589]. У рослин із гаметоцидною хромосомою функціонують переважно гаметофіти, що несуть її, тоді як позбавлені цієї хромосоми гамети в більшості гинуть через розриви хромосом, що відбуваються після мейотичного поділу. Ця обставина надзвичайно ускладнює створення чужинно-заміщених ліній пшениці із хромосомами, відмінними від гаметоцидної. При роботі із таким матеріалом дуже корисною виявилася б інформація про наявність у гаметоцидній хромосомі морфологічного домінантного гена-маркера. Це дало б можливість вибракувувати рослини-носії гаметоцидної хромосоми за фенотипом, скорочуючи тим самим обсяг вибірки, що аналізується, з метою добору носіїв чужинного заміщення за негаметоцидною хромосомою.

Матеріали даного підрозділу дають змогу стверджувати, що ознаки морфології рослин пшениці, також як і стійкість до певних захворювань, щодо них реципієнтний генотип був чутливим, можуть використовуватися не лише для добору рослин з інтрогресіями, а і для встановлення гомеологічної належності чужинного хроматину. З 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 листкової 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.

4.3. 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 гомологічної групи) [10], бета-амілази (хромосоми 4-ої групи) [12], зернової естерази (хромосоми 3-ої групи) [7], листкової естерази [7], листкової пероксидази (хромосоми 7-ої групи) [9]. В даному дослідженні з використанням геномно-заміщеного амфідиплоїда Аврозис до біохімічних маркерів було додано ген кислоти фосфатази, локалізований на хромосомах 4-ої гомеологічної групи *Triticinae* [38].

4.3.1. Перевірка хромосомо-специфічної компетентності гена *Acph-1*.

Кисла фосфатаза КФ (3.1.3.2) каталізує гідроліз складно-ефірного зв'язку більшості моноефірів ортофосфорної кислоти. Контролюється ортологічною серією генів *Acph-1*, розташованих у хромосомах 4-ої групи пшениці та жита [343]. Показано маркерне значення гена *Acph-1* для хромосом *S. cereale* [799], *Ae. searsii* [669], *T. timopheevii* [148], *T. araraticum* [83]. Чайніз Спринг та Аврора мають однаковий електрофоретичний спектр кислоти фосфатази (рис. 4.5, а та б), що дає можливість встановити хромосомну локалізацію генів, що контролюють окремі компоненти спектру Аврори за аналогією з такою, встановленою на нулі-тетрасомиках Чайніз Спринг. На спектрах ліній нулі-4D-тетра-4А та нулі-4D-тетра-4В (рис. 4.5, в та г), однакових, у порівнянні із спектром еуплоїда Чайніз Спринг, відсутні три верхні компоненти. Отже, саме вони контролюються хромосомою 4D та мають бути відсутні у Аврозису та хромосомно-заміщених ліній 4D/4S^{sh}. Порівняння спектрів ліній нулі-4А-тетра-4В та нулі-4В-тетра-4D показує, що компонент 5 контролюється

хромосоною 4В (рис. 4.5, д та е). Спектр кислій фосфатази однозернянки *T. boeoticum* (A^bA^b) (рис. 3.4, ж) представлений компонентами 6 (слабкий), 7 та 8. Спектр ферменту *Ae. longissima* (S^1S^1) (рис. 4.5, з), виду, який як представник секції *Sitopsis*, вважається близько спорідненим до вида-донора субгеному В м'якої пшениці (огляд [696]), має дуже слабкі зони активності 5 та 6. Отже, компонент 5 контролюється геном кислій фосфатази хромосоми 4В, а зони 6–8 — генами хромосом А та В, оскільки вони є на спектрах ліній, що не мають як А, так і В хромосоми.

Як і слід було очікувати, у спектрі кислій фосфатази Аврозису немає зон активності, пов'язаних з експресією гена *Acph-D1*, та є такі, що контролюються генами кислій фосфатази, розташованими на хромосомах 4А та 4В. Крім того, у спектрі Аврозису у порівнянні з таким Аврори, з'являється нова потужна зона активності 4 (рис. 4.5,з).

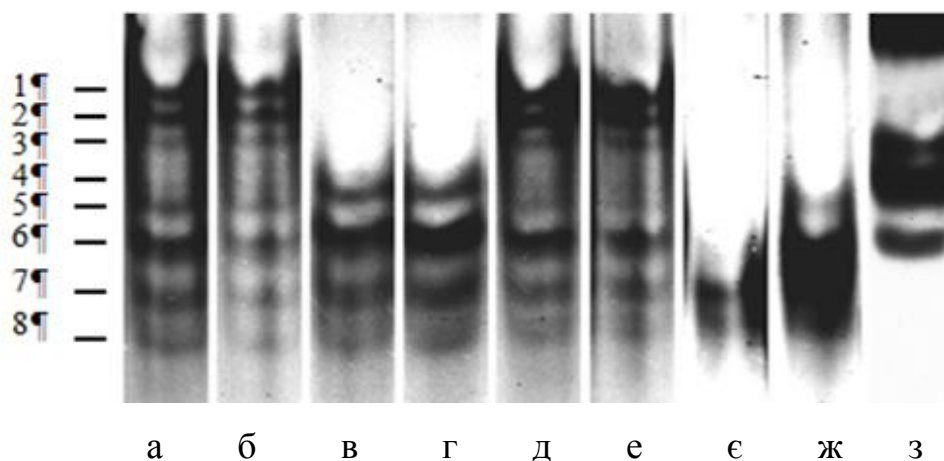


Рис. 4.5. Електрофоретичні спектри зернової кислій фосфатази: *а* – Аврора, *б* – Чайніз Сприн, *в* – нулі-4D-тетра-4А, *г* – нулі-4D-тетра-4В, *д* – нулі-4А-тетра-4В, *е* – нулі-4В-тетра-4D, *є* – *T. boeoticum*, *ж* – *Ae. longissima*, *з* – Аврозис.

Вивчення електрофоретичного спектру зернової кислій фосфатази інтрогресивних ліній надало можливість ідентифікації чужинних включень $4S^{sh}L$ від *Ae. sharonensis*. У розмаїтті інтрогресивних ліній – похідних Аврозису було знайдено 12 ліній, у електрофоретичному спектрі яких зона активності 4 була більш виражена у порівнянні з такою спектра Аврори. Спектри характеризувались відсутністю зон 1–3, отже лінії є чужинно-заміщеними

4S^{sh}L(4DL), що підтверджує інформацію, отриману при вивченні спектрів бета-амілази [16]. За даними [83], ген β -Аму-*S^{sh}1* розташований на довгому плечі хромосоми 4S^{sh}. Отже, ген *Acph-S^{sh}1* також розташований в хромосомі 4S^{sh}L, що відповідає розташуванню цього гена у геномі м'якої пшениці [343] і може використовуватися для ідентифікації деяких інтрогресій, специфічних до хромосом гомеологічної групи 4.

4.3.2. Скринування остистих інтрогресивних ліній на гомеологічну належність інтрогресій. Відомо, що в геномах споріднених пшениці видів, зокрема, видів роду *Aegilops*, у наявності ортологічні (гомеологічні) гени, які кодують ізоферменти та запасні білки [579]. Тому, за умов поліморфізму ізоферментів м'якої пшениці 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 вдовж 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. Хоча у підтрибі пшеницевих остистість зустрічається часто, досі не з'ясовано хромосомну локалізацію гена-промотора остистості. Нами було вивчено велику вибірку інтрогресивних ліній різного походження та різних за остистістю за генами, що кодують запасні білки та ферменти та були визнані нами як такі, що маркують хромосоми трьох видів егілопсу за гомеологічною належністю (табл. 4.9).

Спектр бета-амілази сорту Аврора представлений чотирма компонентами, позначеними за зменшенням електрофоретичної рухливості в гелі як 2, 3, 4 та 6 (рис. 4.6) Гени, що кодують відповідні ізоферменти, розташовані на 4D (компоненти 2 та 3), 5A (компонент 6) та 4A (компонент 4) хромосомах. Електрофоретичний спектр Авролати не має компонентів 2 та 3, що пояснюється відсутністю в цієї геномно-заміщеної форми субгеному D, а отже – гену β -Amy-D1, локалізованого на 4D хромосомі. Єдина зона активності, притаманна *Ae. umbellulata*, кодується геном β -Amy-U2, що розташований на 5U хромосомі, і за рухливістю збігається із компонентом 6 [12]. Спектр Аврозису утворений зонами активності 1, 4 та 6 (рис. 4.7). Компонент 1 є продуктом гену β -Amy-S^{sh}1, який локалізований на 4S^{sh} хромосомі *Ae. sharonensis* [12], тому може виступати маркером присутності цієї хромосоми в геномі досліджуваних ліній. Спектр Авродеса утворений зонами активності 0, 4 та 6 (рис. 4.7). Він відрізняється від спектру сорту Аврора наявністю компоненту 0 та відсутністю зон активності 2 та 3. Компонент 0 є продуктом гену β -Amy-S1, що розташований на 4S хромосомі *Ae. speltoides* [12]. Вивчення електрофоретичного спектру бета-амілази інтрогресивних ліній дає можливість ідентифікувати чужинні включення 4S хромосоми від *Ae. speltoides* та 4S S^{sh} – від *Ae. sharonensis*. У спектрі двох безостих ліній – похідних Аврозиса, спостерігали появу маркерної зони активності 1 (рис. 4.7д, е), тому ці лінії розглядали як такі, що містять включення 4S^{sh} хромосоми від *Ae. sharonensis*. Маркерний компонент 0 спектру Авродеса не спостерігали у жодній лінії. Відсутність маркерних зон активності у виду *Ae. umbellulata* не дозволяє встановити наявність чужинного матеріалу, в цьому випадку можна лише констатувати втрату 4DS хромосоми при відсутності характерних для Аврори компонентів. Таких ліній, без компонентів, що маркують наявність гена β -Amy-D1, було одна серед остистих (4±3,8%), сім серед ліній з остеподібними відростками (16±5,4%), дві серед безостих (50±25%). Немає підстав вважати, що остистість колосу асоційована з геном β -амілази, локалізованим у хромосомах 4-ої гомологічної групи (за точним критерієм Фішера, $P=0,082$).

Фермент альфа-амілаза є активним в зерні, що проростає. Електрофоретичний спектр цього ферменту складається із двох частин: на 2–3 день від початку проростання зерна з’являються ізоферменти так званої “malt” зони, це верхня частина спектру. На 5–9 день проростання набувають максимальної активності ферменти “green”, які мають більшу електрофоретичну рухливість ніж ізоферменти “malt” частини спектру [12].

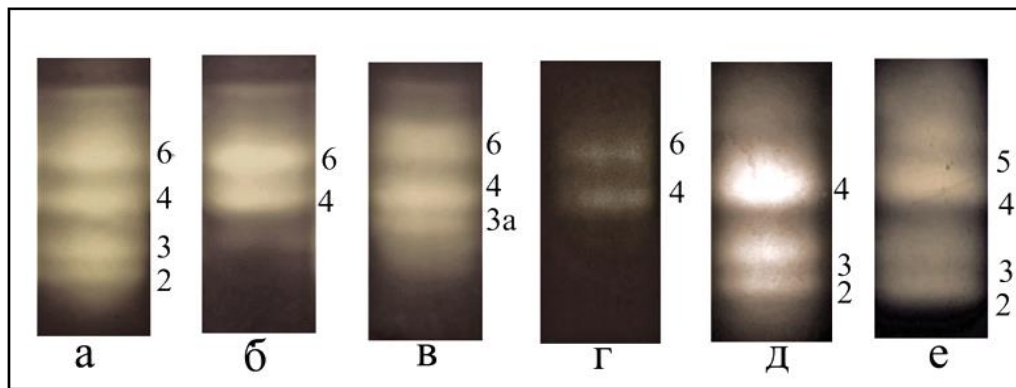


Рис. 4.6. Електрофоретичні спектри ізоферментів бета-амілази ліній – похідних Авролати та батьківських форм: а – Аврора; б – Авролати; в – лінія 57; г – лінія 17; д – лінія 13; е – лінія 14.

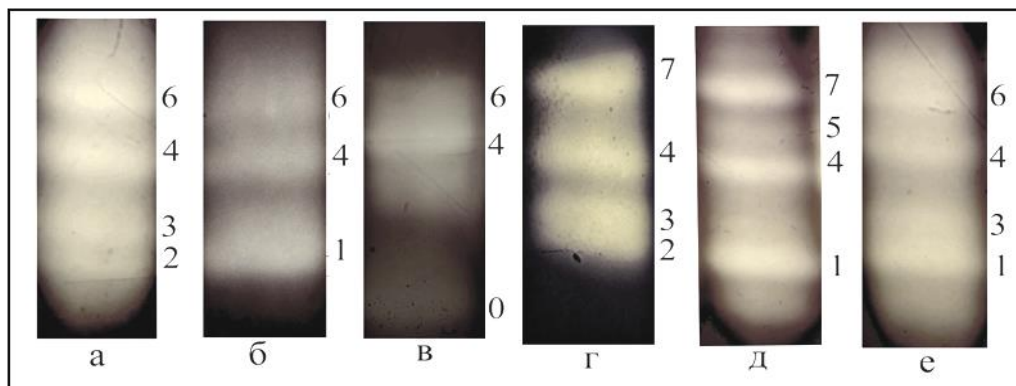


Рис. 4.7. Електрофоретичні спектри ізоферментів бета-амілази ліній – похідних Аврозиса та Авродеса і батьківських форм: а – Аврора; б – Аврозис; в – Авродес; г – лінія 87; д – лінія 110; е – лінія 109.

Локалізація генів – хромосомних маркерів пшениці (Аврора) та видів егілопсу

Ферменти, запасні білки	Хромосомна локалізація генів у видів			
	<i>T. aestivum</i>	<i>Ae. umbellulata</i>	<i>Ae. speltoides</i>	<i>Ae. sharonensis</i>
β-амілаза	<i>β-Amy-A1</i> (4AL), <i>β-Amy-A2</i> (5AL), <i>β-Amy-D1</i> (4DL) [82]	¹⁾ [12]	<i>β-Amy S1</i> (4S) [12]	<i>β-Amy S^{sh} 1</i> (4S ^{sh}) [12]
α-амілаза	<i>α--Amy-1</i> (група 6) [83]	<i>α-Amy-U1</i> (6U) [12]	¹⁾ [12]	<i>α-Amy-S^{sh} 1</i> (6S ^{sh}) [12]
	<i>α-Amy-2</i> (група 7) [83]	¹⁾ [12]	¹⁾ [12]	¹⁾ [12]
Пероксидаза	<i>Per-3</i> (група 3L) [143]	<i>Per-U3</i> (3U) [9]	¹⁾ [9]	¹⁾ [9]
	<i>Per-4</i> (група 7L) [143]	<i>Per-U4</i> (7U) [9]	<i>Per-S4</i> (7S) [9]	<i>Per-^{lsh} 4</i> (7S ^{sh}) [9]
Кисла фосфатаза	<i>Acph-1</i> (4AL, 4BS, 4DL)[343]	¹⁾ [38]	<i>Acph-S1</i> (4S)[38]	<i>Acph-S^{sh} 1</i> (4S ^{sh}) [38]
Зернова естераза	<i>Est-1</i> (група 3S) (за [579])	<i>Est-U1</i> (3U) [7]	¹⁾ [7]	<i>Est- S^{sh} 1</i> (3S ^{sh}) [7]
	<i>Est-3</i> (група 7S) [381]	<i>Est-U3</i> (7U) [7]	<i>Est- S3</i> (7S) [7]	<i>Est-S^{sh} 3</i> (7S ^{sh}) [7]
	<i>Est-5</i> (група 3L) [81]	<i>Est-U5</i> (3U) [7]	<i>Est- S</i> (3S) [7]	<i>Est-S^{sh} 5</i> (3S ^{sh}) [7]
Листкова естераза	<i>Est-2</i> (група 3L) [381]	<i>Est-U2</i> (3U) [7]	<i>Est- S2</i> (3S) [7]	<i>Est-S^{sh} 1</i> (3S ^{sh}) [7]
	<i>Est-4</i> (група 6L) [381]	<i>Est-U4</i> (6U) [7]	<i>Est- S4</i> (6S) [7]	—
	<i>Est-6</i> (група 3) (цит. за [579])	¹⁾ [7]	¹⁾ [7]	<i>Est-S^{sh} 3</i> (3S ^{sh}) [7]
Гліадини	<i>Gli-1</i> [761]	<i>Gli-U1</i> (1U) [10]	<i>Gli-S1</i> (1S) [10]	<i>Gli- S^{sh} (1S^{sh})</i> [10]
	<i>Gli-2</i> [761]	<i>Gli-U2</i> (6U) [10]	¹⁾ [10]	¹⁾ [10]

Примітка: ¹⁾ у спектрі геномно-заміщеного амфідиплоїда маркерний компонент відсутній

Для дослідження спектрів альфа-амілази брали зерно, що проростало 3–5 днів, довжина паростка становила близько 3 см.

Гени, що контролюють синтез ізоферментів альфа-амілази α -*Amy-1* та α -*Amy-2*— розташовані на хромосомах 6 та 7 [83] гомеологічних груп. “Malt” зона сорту Аврора (рис. 4.8а) складається із верхньої частини, утвореної компонентами 1 та 4, які є продуктами генів, розташованих на 6D та 6A хромосомах відповідно, та триплету, що знаходиться в середній частині спектру (компоненти 5, 7, 8) [12]. В більшості пшениць ця частина спектру є мономорфною, через що триплет має назву незмінного (Илличевский, цит за [12]). “Green” зона електрофоретичного спектру сорту Аврора утворена трьома компонентами, 9, 11 та 12, що контролюються генами 7D, 7A, 7B хромосом відповідно. Спектр ізоферментів альфа-амілази Авролати (рис. 4.8, б) відрізняється від такого в Аврори відсутністю компонентів 1 та 9 та наявністю компоненту 13, розташованого у “malt” зоні спектру. Отже, компонент маркує ген α -*Amy-U1* егілопсу зонтичного, від якого походить цей компонент спектру Авролати, хромосома 6U [12]. Спектр альфа-амілази Авродеса (рис. 4.8, в) відрізняється від спектру сорту Аврора відсутністю зон активності 1, 4 та 9, і наявністю компоненту 2 у “malt”-зоні. Цей компонент є маркерним для Авродесу, хоча у спектрі *Ae. speltoides* такого компоненту немає. Ігнорувати його появу не можна через те, що в останні роки переконливо доведено, що експресія генів у геномах гібридного походження не завжди носить адитивний характер (див. пункт огляду 1.1.2). Електрофоретичний спектр Аврозису (рис. 4.8, г) не відрізняється від спектру сорту Аврора у “green” зоні, проте у “malt” зоні характеризується наявністю лише 2-го та 3-го компонентів. Компонент 3 кодується геном α -*Amy-S^{sh}1*, розташованим на 6S^{sh} хромосомі *Ae. sharonensis* [12], тому, зона активності 3 може виступати маркером наявності 6 хромосоми егілопсу Шарона в геномі ліній м’якої пшениці.

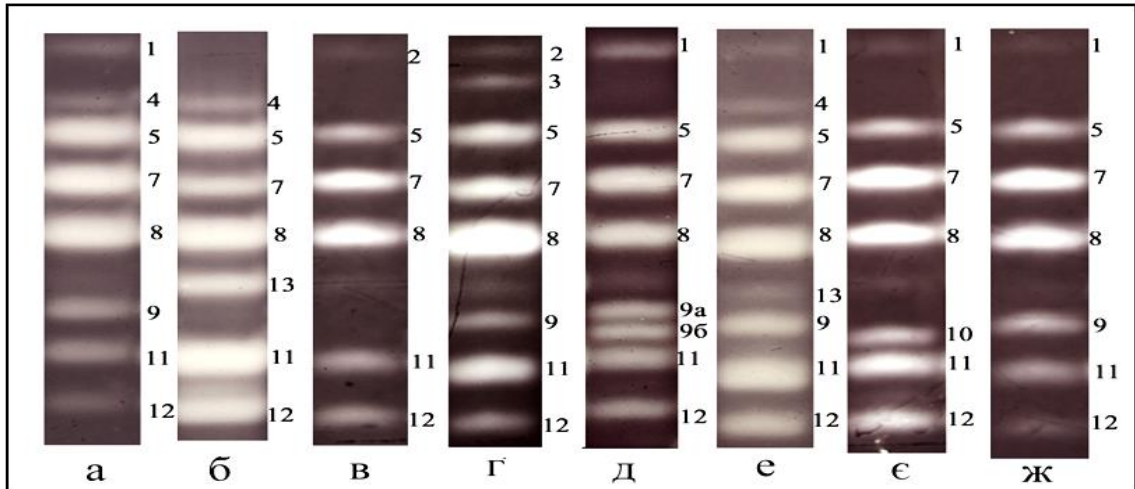


Рис. 4.8. Електрофоретичний спектр ізоферментів альфа-амілази сорту Аврора, геномно-заміщених амфідиплоїдів та інтрогресивних ліній м'якої пшениці: а – Аврора; б – Авролати; в – Авродес; г – Аврозис; д – лінія 50; е – лінія 34; є – лінія 76; ж – лінія 104.

Для ліній – похідних Авролати компонент спектру, що маркує хромосому 6U (*α-AmyUI*), спостерігали у спектрах шести остистих ($19 \pm 7,7\%$) та 21 ліній з остеподібними відростками ($47 \pm 7,4\%$). В спектрах безостистих 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. 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.

Спектр ізоферментів пероксидази контролюється двома групами ортологів: *Per-3* (група 3 довге плече), *Per-4* (7AS, 4BL, 7DS [143]). Електрофоретичні спектри сорту Аврора геномно-заміщених амфідиплоїдів та деяких ліній наведено на рис. 4.9. Спектр сорту Аврора відповідно до збільшення рухливості в гелі, представлений такими компонентами: 1 (3DL), 3 (3AL, 3BL), 4 (7AS), 5 (7AS), 6(4BL), 7(7DS). Спектр Авролати не містить компонентів 1 та 7, вони кодуються хромосомами D-геному, який в Авролати

заміщено [9]. Натомість з'являється компонент 2, ген якого розташований на 3U хромосомі. Це єдиний компонент, який може виступати маркером наявності чужинного матеріалу в геномі досліджуваних ліній. Електрофоретичний спектр Аврозису та Авродесу позбавлений компонентів 1 та 7, і не має притаманних егілопсами зон активності. Маркерні для хромосоми 3U компоненти з'явилися у спектрах пероксидази двох ліній Авролати, безостої та з остеподібними відростками. Отже, асоціації між чужинною хромосомою 3 та остистістю не прослідковується.

Із двох компонентів, що є продуктами гену *Per-4*, розташованого на 7A хромосомі, багато ліній мали лише один – 4 або 5, причому поява компоненту 5 спостерігалась значно частіше, ніж компоненту 4. За нашими даними [9], спектр *Ae. umbellulata* не містить компоненту 4, але має компонент 5. Тому можна припустити, що спектр без компонента 4 виникає в лініях з заміщенням 7D/7U. Таке заміщення має відбиватися і на спектрі альфа-амілази відсутністю компоненту 9. Ліній, які відповідають наведеній характеристиці, було виявлено одна серед остистих, одна серед безостих та одна лінія з остеподібними відростками серед похідних Авролати та по одній лінії на кожну з перелічених градацій за остистістю серед похідних Авродесу (табл. 4.10). Отже, не схоже, що хромосома 7D асоційована з ознакою остистість колосу.

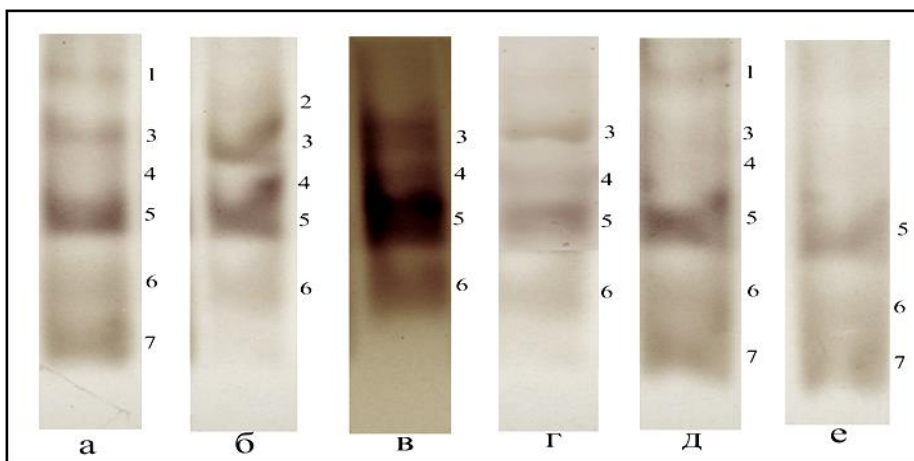


Рис. 4.9. Електрофоретичний спектр зернової пероксидази: а – Аврора; б – Авролати; в – Аврозис; г – Авродес; д – лінія 14; е – лінія 10.

Ізоферменти естерази, зернової та листкової, характеризуються тканинною та онтогенетичною специфічністю і контролюються кількома локусами (табл. 4.9). За результатами наших попередніх досліджень [7], для ліній – похідних Авролати, Авродесу та Аврозису маркерними властивостями характеризуються компоненти спектру, які контролюються трьома генами зернової та трьома – листкової естерази для Авролати, трьома генами зернової та двома – листкової для Авродесу, двома генами зернової та трьома – листкової для генів Аврозису (табл. 4.9).

Електрофоретичний спектр зернової естерази сорту Аврора, геномно-заміщених амідиплоїдів та інтрогресивних ліній представлено на рис. 4.10. Спектр Аврори відрізняється від такого Авролати за компонентами 10, 9, та 8.

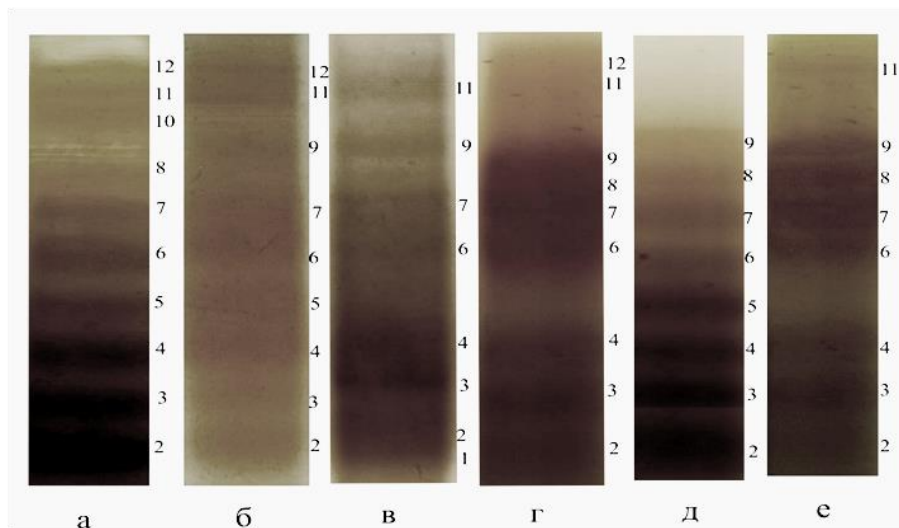


Рис. 4.10. Електрофоретичний спектр ізоферментів зернової естерази: а – Аврора; б – Авролата; в – Авродес; г – Аврозис; д – лінія 41; е – лінія 126.

Спектр Авродеса також не містить компоненту 8, крім того, позбавлений компонентів 12 та 5, має характерні для нього компоненти 9 та 1, причому для останнього невідома хромосомна локалізація. В спектрі Аврозису відсутній компонент 5, а компонент 9 може виступати маркером чужинного генетичного матеріалу. Таким чином, лише компонент 9, притаманний всім трьом геномно-заміщеним амідиплоїдам і він маркує ген *Est1*.

Електрофоретичний спектр листової естерази містить понад 25 компонентів [7], проте повного спектру у нашій роботі ми не отримали

(рис. 4.11). Тому аналіз ізоферментів листової естерази дозволяє нам лише ідентифікувати компоненти 6 та 7, діагностичні для гена *Est2* хромосоми 3S.

Потенційно маркованими за компонентами спектру естерази виявляються хромосоми 3, 6 та 7-ої гомеологічних груп. На практиці у нашому дослідженні було виявлено маркерні компоненти у спектрах досліджених ліній лише за генами *Est1* (зернова естераза), *Est2* (листова естераза), локалізованих на хромосомах 3-ої групи (табл. 4.10). Серед ліній – похідних Авролати одна остиста та одна безоста мали компонент спектру, що відповідає гену *EstU1*. Одна лінія з геном *EstS^{sh}1* була серед похідних Аврозису з остеподібними відростками. По одній лінії з геном *EstS2* було знайдено серед остистих, безостих та ліній з остеподібними відростками – похідними Авродесу. Отже, немає підстав вважати, що промотор остистості пов'язаний з хромосомами 3-ї гомеологічної групи.

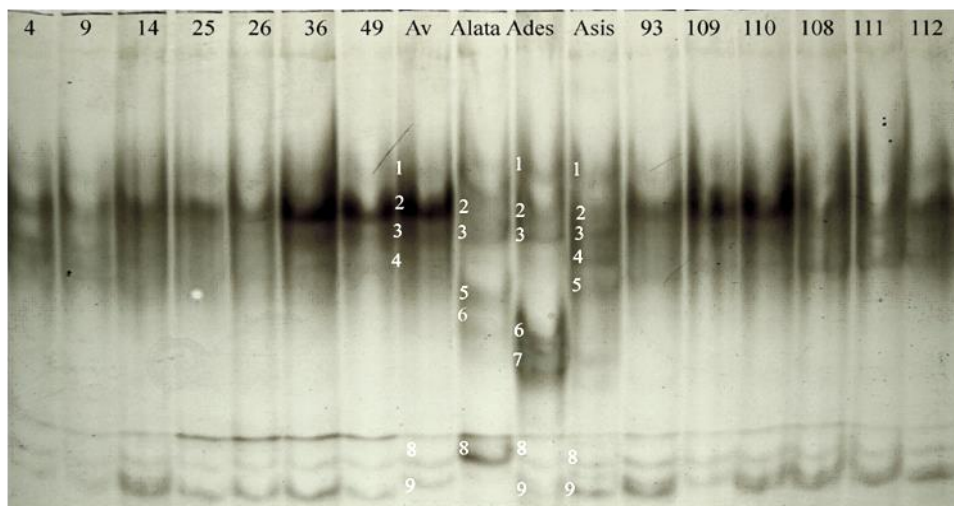


Рис. 4.11. Електрофоретичний спектр листової естерази батьківських форм та інтрогресивних ліній: Av – Аврора; Alata – Авролата; Ades – Авродес; Asis – Аврозис; номерами позначені лінії.

Генетичний контроль гліадинів здійснюється серіями ортологічних генів, кількість яких вже дійшла до шести, *Gli1–Gli-6* [579]. На нашому матеріалі ми вивчали лише *Gli1* та *Gli2*, це шість незчеплених генів, розташованих на хромосомах 1-ої та 6-ої гомеологічних груп (табл. 4.9). Гліадинкодуєчий ген є кластерним, тобто кодує поліпептиди, які утворюють блок електрофоретичних компонентів, всі компоненти якого успадковуються разом [169]. Рекомбінація

усередині кластера вважається рідкісною подією [469,762]. Гліадини характеризуються множинним поліморфізмом та володіють маркерними властивостями не тільки на видовому, а і на внутрішньовидовому рівні.

За зростанням електрофоретичної рухливості компонентів спектр гліадинів поділяють на 4 зони: ω , γ , β та α (рис. 4.12). Перші дві зони контролюються кластерами генів, що розташовані на коротких плечах хромосом першої групи, дві інші – кластерами, розташованими на коротких плечах хромосом 6 групи [721,762].

Раніше нами було показано, що компоненти 4, 6–9 та 16 ω -зони Авролати є маркерами хромосоми 1U, а компонент 1 α -зони є маркерним для хромосоми 6U. Компоненти 5, два дифузних під ним (6^a та 6^b) та 15 в ω -зоні Авродесу – маркери хромосоми 1S. Компонентів, що маркують хромосому 6S у спектрі Авродесу, також як $6S^{sh}$ Аврозису, немає. Спектр розділення гліадинів Аврозиса в ω -зоні має два маркерних компоненти для хромосоми $1S^{sh}$ – 5 та 6 [10]. Якщо у якості маркера використовувати не окремі компоненти спектру, властиві геномно-заміщеному амфідиплоїду, а блок у цілому, виявляється лише кілька ліній, у яких замість гена *GliD1* у наявності ортологічний ген відповідного егілопсу. Серед ліній – похідних Авролати шість остистих ліній ($23 \pm 8,3\%$), сім ліній з остеподібними відростками ($16 \pm 5,4\%$), дві безості лінії ($50 \pm 25\%$). Серед ліній – похідних Авродесу по одній лінії з геном *GliS^{sh}1* у кожному з трьох фенотипних класів за остистістю: $20 \pm 17,9\%$; $7 \pm 6,9\%$; $33 \pm 27,2\%$ серед остистих, ліній з остеподібними відростками та безостих ліній. Серед ліній – похідних Аврозису одна лінія серед остистих ($20 \pm 17,9\%$) та одна серед безостих ($25 \pm 22,6\%$). Отже, асоціації ознаки остистість колосу з хромосомами 1-ої гомеологічної групи не прослідковується.

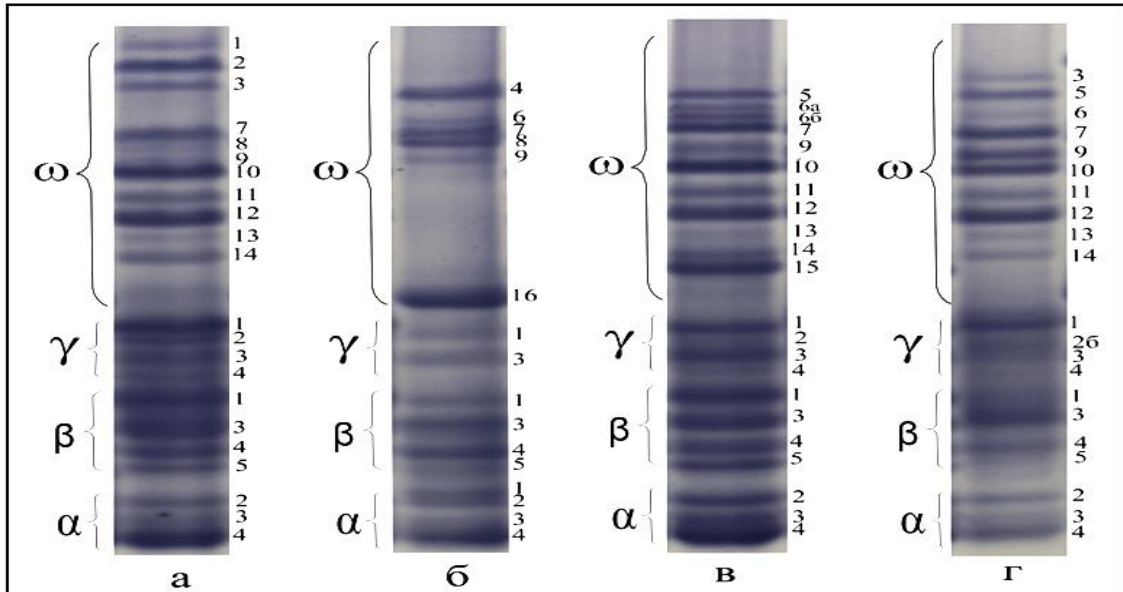


Рис. 4.12. Електрофоретичний спектр запасних білків гліадинів: а – сорт Аврора; б – Авролата; в - Авродес; г – Аврозис.

Щодо 6-ої хромосоми (ген *Gli2*), 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 $\alpha\text{-AmyD1}/\alpha\text{-AmyU1}$. 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 лінії, для яких показано заміщення $\alpha\text{-AmyD1}/\alpha\text{-AmyU1}$ (табл. 4.10). Отже, вивчення гліадинових спектрів ліній підтверджує наше припущення, що ген-промотор остистості принаймні у *Ae. umbellulata* знаходиться у хромосомі 6-ої гомеологічної групи.

Наявність маркерних компонентів спектру вивчених білків у спектрах ліній, різних за ознакою остистість колосу

Номери ліній з певним фенотипом ¹⁾	Номери ліній, що мають хромосому (транслокацію) зі вказаної гомеологічної групи, яка маркується компонентом спектру, специфічним для егілопеу				
	1	3	4	6	7 ²⁾
Лінії – похідні Авролати					
Остисті:1–17, 113–121	<i>GliU1</i> :1,2, 10,13,14,17	<i>EstU1</i> :11		<i>α-AmyU1</i> :13,14, 17, 115, 121; <i>GliU2</i> :115	0 <i>α-AmyD2</i> ; 0 <i>PerD2</i> :2
Ост. відростки:1 8–60, 122,123	<i>GliU1</i> :23, 37, 42,52,53,55, 60	<i>EstU1</i> :26, 41; <i>PerU3</i> :20, 27		<i>α-AmyU1</i> :18,19,23,24,25,28, 29,32,34,37,38,42, 43,45, 47,49,50, 51,57,58,59; <i>GliU2</i> :23,25,27, 28,29,32,34,37,38, 45,47,49,50, 57, 59	0 <i>α AmyD2</i> ; – <i>PerD2</i> : 51
Безості:124–127	<i>GliU1</i> :125, 126	<i>PerU3</i> , <i>EstU1</i> :126			0 <i>α AmyD2</i> ; – <i>PerD2</i> : 127
Лінії – похідні Авродесу					
Остисті:76–80	<i>GliS1</i> :76	<i>EstS2</i> :76, 79		<i>α-AmyS1</i> :76	
Ост. відростки: 81–93	<i>GliS1</i> :90	<i>EstS2</i> :82		<i>α-AmyS1</i> :92, 93;	
Безості:94–96	<i>GliS1</i> :95	<i>EstS2</i> :94			
Лінії – похідні Аврозису					
Остисті:99–103	<i>GliS^{sh}1</i> :100				
Ост. відростки:1 04–106		<i>EstS^{sh}1</i> :104			
Безості:107–110	<i>GliS^{sh}1</i> :108		<i>β-AmyS^{sh}1</i> : 109,110		

Примітка: ¹⁾ лінії 1–60 та 113–131 – похідні Авролати, 76–98 – Авродесу, 99–132 – Аврозису; ²⁾ «0» компоненту немає

4.3.3. Скринування ліній Авродесу, стійких до борошнистої роси, з застосуванням хромосомно-специфічних маркерів. Для перевірки 88 ліній – похідних Авродесу, стійких до борошнистої роси, на гомеологічну належність інтрогресій залучили гени відомої хромосомної локалізації, які кодують запасні білки та ферменти у пшениці та були визнані нами у попередніх дослідженнях [16] як придатні для вивчення ліній з інтрогресіями від *Ae. speltoides* [29]. Порівнюючи електрофоретичні спектри білків Аврори, Авродесу та цих ліній, планувалось з'ясувати два питання: яка чужинна хромосома чи її фрагмент з геном-маркером, знаходиться у геномі стійкої лінії та чи знаходиться чужинний хроматин у геномі замість гомеологічного чи негомеологічного хроматину пшениці. Таким чином планувалось, з одного боку, визначити хромосому локалізацію гена стійкості у *Ae. speltoides*, з іншого – хромосому, в якій знаходиться інтрогресований ген у геномі пшеничних ліній.

Генетичний контроль бета-амілази, альфа-амілази та гліадинів, характеристику та маркерні властивості відповідних спектрів Авродесу було викладено у пункті 4.3.2. Електрофоретичні спектри високомолекулярних глютенінів (HMW) складаються з білків, що контролюються генами *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*, локалізованими на довгих плечах хромосом першої гомеологічної групи [579]. Обидва спектри, Аврори та Авродеса, представлені чотирма компонентами: 5, 7, 9, 10 – спектр Аврори, 2, 6, 7, 9 – спектр Авродесу (рис. 4.13) [10]. За даними [10], у глютеніновому спектрі *Ae. speltoides* наявний лише компонент 6 і поява у спектрі Авродесу компоненту 2 порушує правило адитивності спектрів. Набагато пізніше було показано, що порушення адитивності у експресії генів новостворених гібридів та амфідиплоїдів рослин є скоріше правилом, ніж виключенням [74,144,348,350,597,672,845]. Тому на сьогодні ми вважаємо, що ортологічний локус *Glu-S1* маркують обидва компоненти, 2 та 6.

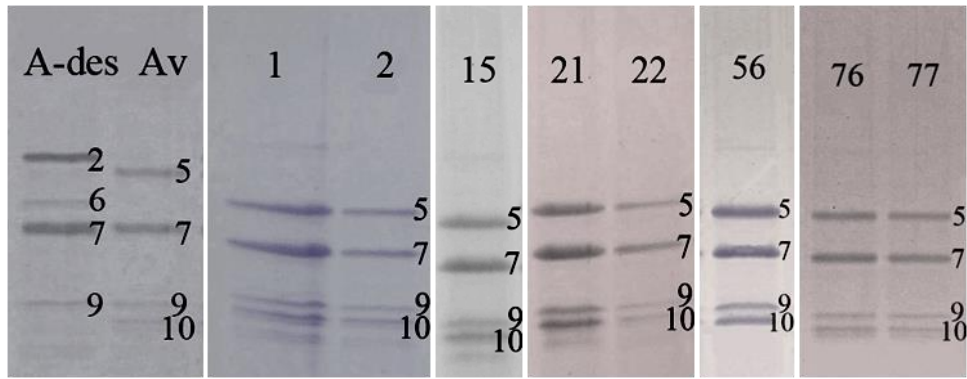


Рис. 4.13. Електрофоретичні спектри глютенінів: Av – сорт Аврора; A-des – геномно-заміщена форма Авродес; 1, 2, 15, 21, 22, 56, 76, 77 – лінії, 5, 7, 9, 10 – номери компонентів спектру.

За електрофоретичними спектрами згаданих білків, отриманими для кожної стійкої лінії, досліджувані лінії було поділено на три групи: лінії, спектр яких ідентичний спектру сорту Аврора; лінії зі спектром, ідентичним спектру Авродесу, лінії, в яких частина спектру ідентична спектру Аврори, частина – Авродесу (табл. 4.11). Крім того були лінії з неповним спектром Аврори (деякі компоненти сорту Аврора відсутні), та лінії, які мають у спектрі компоненти, які не властиві спектру Аврори, але це не є компонент, притаманний спектру Авродесу. Такі лінії розглядатимуться у підрозділі 5.3.

Ліній, спектр яких повторював спектр бета-амілази, властивий Авродесу, серед досліджених не було. Можна висловити припущення, що жодна з вивчених ліній не має у складі свого геному хромосоми 4S (або 5S), принаймні тієї її частини, що містить ген *β -Amy-S1*. На інших видах егілопсу вже було показано, що *β -Amy1* може локалізуватися на хромосомі як 4-ої (*Ae. sharonensis*), так і 5-ої (*Ae. umbellulata*) гомеологічних груп [83]. Нами хромосомну локалізацію гена *β -Amy-S1* встановлено не було.

За генами *α -Amy*, що кодують компоненти альфа-амілази, (див. рис. 4.8 та коментарі до нього) з 88 ліній вдалось оцінити лише 23 через погане проростання насіння. Спектр ліній 37, 42 та 80 виявився аналогічним спектру Аврори, спектри ліній 4, 13 та 50 – спектру Авродеса. Отже, в геномі останніх трьох ліній у наявності хромосома 6S, принаймні її коротке плече. Щодо хромосом 7-ої групи, можна припускати лише відсутність хромосоми 7D: для

хромосоми 7S специфічного компоненту спектру не виявлено. Спектри ліній 2, 5, 7, 23, 72, 76, 79, 87 повторюють спектр Авродеса у malt-зоні, але у green-зоні збігаються зі спектром Аврори. Це вказує на те, що зміна по хромосомі (або плечу) шостої групи відбулася, а по сьомій зміни немає. У спектрі ліній 6 і 11 відсутній компонент, якого немає у спектрі Авродеса. Було перевірено з використанням таблиць спряженості, чи можна співвідношення 11 із 23 та 5 із 23 вважати такими, що відхиляються від очікуваного 0 із 23. Для хромосоми 6S (11 випадків) значення точного критерію Фішера $P=0,0002$, для хромосоми 7S (гіпотетичне заміщення, 5 випадків) $P=0,05$. Отже, серед ліній – похідних Авродесу, стійких до борошністої раси, статистично забагато таких, в яких діагностується заміщення 6D/6S хромосоми, плеча або відповідного фрагмента хромосоми з геном $\alpha\text{-Amy}1$. Оскільки локус $\alpha\text{-Amy}1$ знаходиться у складі геному ліній у відсутності локусу $\alpha\text{-Amy}D1$, слід вважати, що чужинний хроматин увійшов до складу геному замість гомеологічного пшеничного хроматину.

Крім 24-х ліній, спектр яких за глютенінами повністю повторював спектр Аврори, була лише одна, спектр якої повторював спектр іншого прабатька, Авродесу (табл. 4.11). Співвідношення 1 до 87 статистично не відрізняється від 0 з 88 ($P>0,99$ за точним критерієм Фішера), отже, хромосома 1S егілопса не пов'язана зі стійкістю ліній до борошністої роси.

Гліадинові спектри п'яти ліній співпадали зі спектром Аврори. Не було виявлено жодної лінії з компонентами спектру, які б вказували на наявність у геномі гена $Gli\text{-}S1$. Всі інші лінії характеризувались спектром, який відрізняється від спектру Аврори наявністю не властивих йому компонентів та розглядаються у підрозділі 5.1.

Таблиця 4.11

Результати скринування ліній – похідних Авродесу за електрофоретичними спектрами деяких білків

Характеристика спектру лінії	Білки, що вивчалися				
	Бета-амілаза	Альфа-амілаза		Глютеніни	Гліадини
		Мальт-зона	Грін-зона		
Ідентичний спектру Аврори	¹⁾ 1–4, 13–23, 25, 27, 29–34, 36–43, 45, 50–56, 58, 59, 63–66, 69, 72–74, 77–80, 82, 83–88	6, 11, 38, 37, 41, 42, 80	2, 5, 7, 8, 23, 37, 40, 42, 72, 76, 79, 80 81, 84, 87	1, 2, 12, 15, 21–25, 26, 27, 33, 34, 42, 43, 45, 54, 56, 67, 68, 72, 73, 76, 77	1, 4, 11, 32, 58
Ідентичний спектру Авродесу		2,4,5, 7, 13, 23, 40 50, 72, 76, 79,87	4, 6, 11, 13, 50	35	
Частина спектру ідентична спектру Аврори, частина Авродесу –				3–5, 13, 16–20, 28, 36–40, 44, 49, 55, 60, 61, 66, 69, 80, 81, 82, 86, 87 (компонент 2 у наявності) 10, 57, 70 (компоненти 2 та 6 у наявності)	22, 23, 45, 54, 55, 57, 59, 63

Примітка: ¹⁾ в комірках таблиці – робочі номери вивчених ліній.

Із перевірених у даному дослідженні хромосом 1, 4 (або 5), 6 та 7 гомеологічних груп лише хромосома 6S (або її фрагмент) виявилася наявною у статистично значущій не випадковій кількості стійких ліній. Отже, можна припустити, що ген стійкості до борошнистої роси у *Ae. speltoides* локалізований у хромосомі 6S. Це збігається з раніше встановленим фактом, що в короткому плечі цієї хромосоми розташований ген *Pm12* [387]. Таким чином, лінії 2, 4, 5, 7, 13, 23, 40, 50, 72, 76, 79, 87 можна використовувати для подальшого дослідження їхньої геномної структури щодо обсягу чужинного хроматину з геном стійкості, характеру успадкування гена стійкості, його взаємодії з іншими генами стійкості до борошнистої роси.

Спираючись на результати, наведені у підрозділі 4.3, 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 генотипу, в нашому випадку – остистість колосу та стійкість до борошнистої роси. За допомогою білкових хромосомно-специфічних маркерів 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. Доведено хромосомно-специфічну компетентність гену кислої фосфатази *Asph-1* для інтрогресивного матеріалу, що застосовується в нашій роботі.

4.4. Використання мікросателітних маркерів хромосом для вивчення структури геному інтрогресивних ліній

4.4.1. Структура геному інтрогресивних ліній *Triticum aestivum*/*Aegilops sharonensis*. Весь комплекс можливостей вивчення геномної структури ліній, що походять від схрещування геномно-заміщеного амфідиплоїда з рекурентним генотипом Аврора, було застосовано нами на лініях – похідних

Аврозису. Лінії було проаналізовано стосовно наявності інтрогресій у геномі, їхньої кількості та гомеологічної належності з використанням всіх тих методів, придатність яких для визначення структури геному інтрогресивних ліній було нами показано у підрозділах 4.1 –4.3: порівняння хромосомних конфігурацій у М1 МКП ліній та їхніх гібридах один з одним та з рекурентним генотипом *T. aestivum* (Аврора), обстеження ліній на наявність у їхньому геномі біохімічних генів – маркерів хромосом різних гомеологічних груп *Triticinae*, та, в даному пункті дисертації, мікросателітний аналіз за хромосомно-специфічними локусами SSR [2].

Для вивчення геномної структури було відібрано 26 ліній, стійких до борошнистої роси. Лінії вивчались з метою встановити, чи мають вони хромосому 4S^{sh} або її частину, оскільки ця інформація є принциповою для вирішення питання про можливість використання цих ліній у якості джерела гена стійкості до борошнистої роси. У підрозділах 4.2 та 4.3 нами вже було наведено інформацію про відповідність між чужинними градаціями морфологічних ознак та електрофоретичних спектрів білків. У табл. 4.12 наведено характеристику вивчених ліній – похідних Аврозису щодо можливого включення чужинного хроматину певної гомеологічної групи хромосом.

Всі гени, що маркують хромосому 4S^{sh} (*Hs-S^{sh}*, *β-Amy-1*, *AcpH-1*), локалізовані на довгому плечі цієї хромосоми. Для маркування короткого плеча ми виконали мікросателітний аналіз за локусами, специфічними для хромосоми 4D. Праймери двох мікросателітних локусів, *Xcfd89* та *Xcfd106*, для довгого (L) та короткого (S) плечей хромосоми 4D, відповідно, були використані для скринування ліній (рис. 4.14). Праймери першого давали амплікон з ДНК лише Аврори, з ДНК Аврозису амплікон не формувався. ДНК ліній 121, 122, 126, 130, 141–146 та 148 формувала амплікон з цими праймерами. Листкова піхва цих ліній опушення не мала. Отже, перелічені лінії не мали жодного плеча хромосоми 4S^{sh}. Лінії 115, 117, 118, 127, 128, 129 131, 134, 135, 137–140 амплікону не мали, характеризувались опушеною листковою піхвою. Отже,

Характеристика ліній *T. aestivum*/*Ae. sharonensis* за хромосомно-специфічними маркерами: D-геном вказує на градацію ознаки, притаманну Аврорі, S^{sh} – Аврозису

Лінія res	<i>β-Amy-1</i>	<i>Acph-1</i>	<i>Est-1</i>	<i>Est-2</i>	<i>Est-3</i>	Воскова осуга	Жорсткість луски	Вдавленість луски	Опушення піхви	Колір пиляка
115	4S ^{sh}	4S ^{sh}	— ²⁾	—	7D	2D	2D	2D	4S ^{sh}	7D
117	4S ^{sh}	4S ^{sh}	3S ^{sh}	—	7D	2S ^{sh 1)}	2S ^{sh}	2D	4S ^{sh}	7D
118	4S ^{sh}	4S ^{sh}	3S ^{sh}	3D	7D	2S ^{sh}	2D	2D	4S ^{sh}	7D
121	4D	4D	—	3D	7D	2S ^{sh}	2D	2S ^{sh}	4D	7D
122	4D	4D	—	3D	7D	2S ^{sh}	2S ^{sh}	2D	4D	7D
126	4D	4D	—	3D	7D	2D	2S ^{sh}	2D	4D	7S ^{sh}
127	4D	4D	3D	3D	7S ^{sh}	2D	2S ^{sh}	2S ^{sh}	4S ^{sh}	7D
128	4S ^{sh}	4S ^{sh}	3S ^{sh}	3D	7D	2D	2S ^{sh}	2D	4S ^{sh}	7D
129	4S ^{sh}	4S ^{sh}	3S ^{sh}	3D	7D	2D	2D	2D	4D	7D
130	4D	4D	3S ^{sh}	3D	7D	2D	2D	2D	4D	7S ^{sh}
131	4S ^{sh}	4S ^{sh}	3S ^{sh}	—	7D	2D	2S ^{sh}	2D	4S ^{sh}	7S ^{sh}
132	4D	4D	—	3D	7D	2D	2S ^{sh}	2S ^{sh}	4D	7D
134	4S ^{sh}	4S ^{sh}	—	3D	7D	2D	2S ^{sh}	2D	4S ^{sh}	7D
135	4S ^{sh}	4S ^{sh}	—	3D	7D	2D	2S ^{sh}	2S ^{sh}	4S ^{sh}	7D

Продовження табл. 4.12

Лінія res	β -Amy-1	AcpH-1	Est-1	Est-2	Est-3	Воскова осуга	Жорсткість луски	Вдавленість луски	Опушення піхви	Колір пиляку
136	4S ^{sh}	4S ^{sh}	3S ^{sh}	3D	7S ^{sh}	2D	2S ^{sh}	2S ^{sh}	4S ^{sh}	7S ^{sh}
137	4S ^{sh}	4S ^{sh}	—	—	7D	2S ^{sh}	2S ^{sh}	2D	4S ^{sh}	7D
138	4S ^{sh}	4S ^{sh}	—	3D	7D	2D	2D	2D	4S ^{sh}	7D
139	4S ^{sh}	4S ^{sh}	3S ^{sh}	—	7D	2S ^{sh}	2S ^{sh}	2D	4S ^{sh}	7D
140	4S ^{sh}	4S ^{sh}	—	—	7D	2D	2D	2D	4S ^{sh}	7D
141	4D	4D	3S ^{sh}	3D	7S ^{sh}	2D	2D	2D	4D	7S ^{sh}
142	4D	4D	3D	3D	7S ^{sh}	2D	2D	2D	4D	7S ^{sh}
143	4D	4D	3S ^{sh}	3D	7D	2D	2D	2D	4D	7D
144	4D	4D	3D	3D	7S ^{sh}	2D	2S ^{sh}	2S ^{sh}	4D	7S ^{sh}
145	4D	4D	3D	3D	7S ^{sh}	2D	2S ^{sh}	2S ^{sh}	4D	7D
146	4D	4D	—	—	7D	2D	2D	2S ^{sh}	4D	7D
148	4D	4D	—	3D	7D	2S ^{sh}	2S ^{sh}	2D	4D	7D

Примітки: ¹⁾ відсутність воскової осуги притаманна виду *Ae. sharonensis*, хоча сучасний Аврозис воскову осугу має.

Ця невідповідність обговорюється далі.

²⁾ Прочерк показує, що не вдалось отримати білковий спектр, що дає однозначний висновок.

локус *Xcfd89* дійсно специфічний до хромосоми 4D, як це було вказано у [715], та може використовуватися для ідентифікації заміщення 4DL/4S^{sh}L.

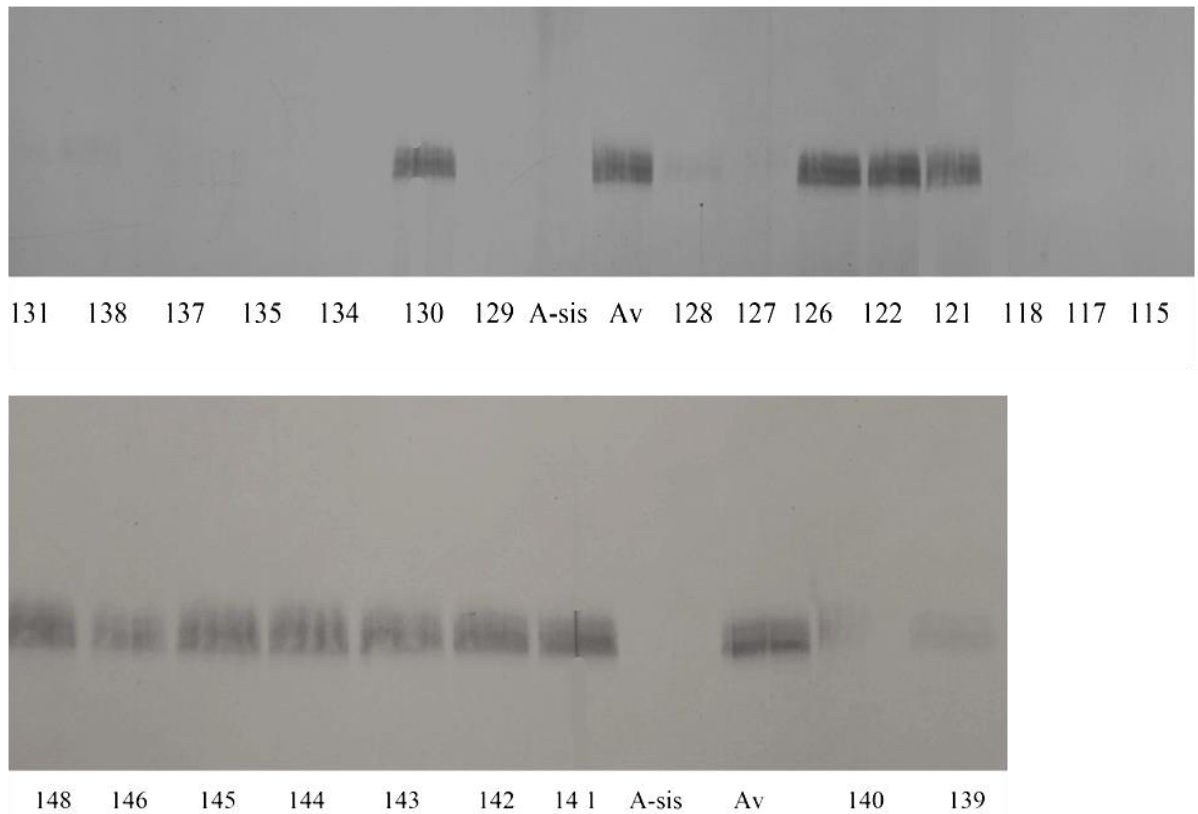


Рис. 4.14. Електрофоретичний спектр продуктів ПЛР з праймерами локусу *Xcfd89* на ДНК Аврори, Аврозису та інтрогресивних ліній: 115–148 інтрогресивні лінії, Av–Аврора, A-sis – Аврозис.

З праймерами локусу *Xcfd106* амплікони формуються на ДНК всіх досліджених зразків. Проте інтенсивність амплікону, який формується з ДНК Аврори, значно вища у порівнянні з такою Аврозису. Можна припустити що праймери локусу *Xcfd106* специфічні не лише для хромосоми 4D, а і для хромосом 4A та (або) 4B також. Така сама різниця спостерігається серед ліній: ті, що, за даними попередніх досліджень, несуть хромосому 4S^{sh} замість 4D, характеризуються менш інтенсивним ампліконом (рис. 4.15). Зіставляючи результати оцінки ДНК ліній за двома локусами та за морфологічними ознаками і спектрами білків (табл. 4.12), 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. Отримані результати узагальнені у таблиці 4. 13.

Таблиця 4.13

Структура геному інтрогресивних ліній ges за хромосоною 4S^{sh}

Без хромосоми 4S ^{sh}	З цілою хромосоною 4S ^{sh}	Тільки 4 ^{sh} L	Тільки 4S ^{sh} S
121,122,126,130,142–145	117,118,127–128,131,134,135,137–140	115	132,141,146,148

У підрозділі 4.1 було обґрунтовано, чому вивчення хромосомних конфігурацій у M1 мейозу гібридів досліджуваної лінії з рекурентним генотипом Аврора та іншими лініями, спорідненими за походженням, дає переконливу інформацію про геномну структуру лінії стосовно рекурентного генотипа та інших ліній. У таблицях 4.1 та 4.2 міститься відповідна інформація щодо ліній, взятих для всебічного дослідження щодо наявності гаметоцидної хромосоми. Порівняння даних, наведених в цих таблицях та зіставлення їх з інформацією, поданою у табл. 4.12, показує, що за геномною структурою стійкі до борошністої роси лінії можна розділити на шість груп (табл. 4.14): (1) лінії з однією заміщеною хромосоною, (2) лінії з однією заміщеною хромосоною та однією транслокацією, (3) лінії з однією заміщеною хромосоною та двома транслокаціями, (4) лінії з двома заміщеними хромосомами, (5) лінії з двома заміщеними хромосомами та однією транслокацією, (6) лінії з двома заміщеними хромосомами та двома транслокаціями. Таке групування можна виконати тільки за наявності даних про притаманні лініям маркерні ознаки (морфологічні, фізіологічні, біохімічні) та результатів вивчення мейозу у гібридах від схрещування інтрогресивних ліній одна з одною.

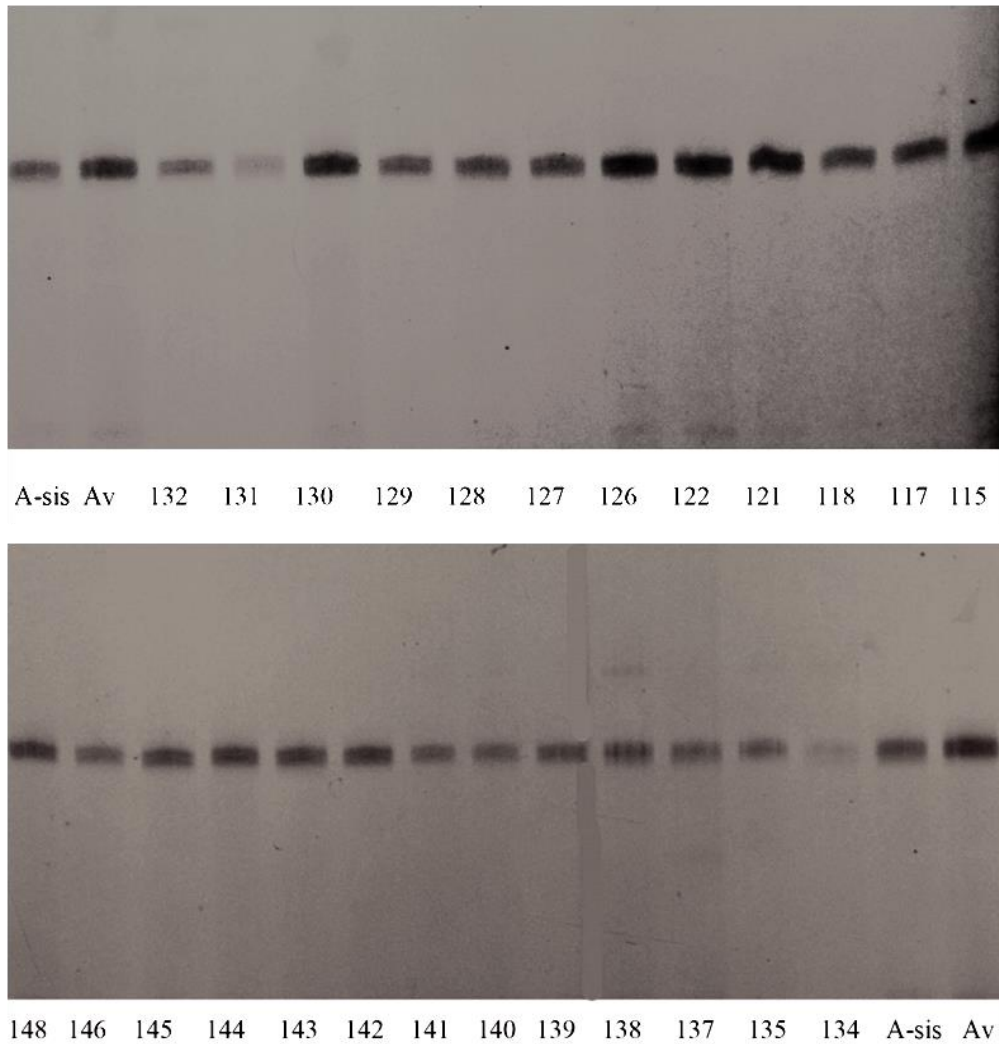


Рис. 4.15. Електрофоретичний спектр продуктів ПЛР з праймерами локусу *Xcfd106* на ДНК Аврори, Аврозису та інтрогресивних ліній: 115–148 інтрогресивні лінії “res”, Av–Аврора, A-sis – Аврозис.

Два уніваленти в М1 мейозу спостерігали у гібридах F_1 від схрещування з Аворою ліній 121, 122, 126, 130, 132, 134, 142–146 та 148 (табл. 4.1). Отже, в кожній з цих ліній якась хромосома настільки відрізнялась від однієї з семі хромосом геному D, що не формувала з нею бівалента. Тобто була або повністю чужинною (заміщеною), або сильно перебудованою стосовно гомолога з геному D Аврори. Беручи до уваги кількість відкритих бівалентів при максимальній асоціації хромосом у М1, можна стверджувати, що лінії 121, 122, 130, 132, 144, 145, 146, 148 мають по одній транслокації, лінії 134, 142, 143 – по дві. Вміст таблиці 4.14, сформованої за урахуванням результатів оцінки

**Геномна структура інтрогресивних ліній, стійких до борошнистої
роси**

Одна хромосома не утворює бівалент з пшеничним гомологом					
Хромосома	Лінія	Додається одна транс- локація		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 мультиваленти як три- так і квадрі.

²⁾ Збільшена кількість унівалентів на клітину.

ліній за морфологічними та біохімічними ознаками (табл. 4.12) не узгоджується з таким висновком лише для лінії 130. Чотири облігатних уніваленти були у М1 мейозу гібридів Аврори з лініями 115, 117, 118, 127, 129, 131, 136–141. Частина з цих ліній (табл. 4.2) демонструвала у мейозі облігатні відкриті біваленти, що вказує на неповну гомологію хромосом, що кон'югують, і наводить на думку про транслокації. З таблиці 4.12 видно, що лише 4 лінії з 26, 129, 141–143, судячи з морфологічних маркерів, не мають у складі свого геному хромосоми $2S^{sh}$ або значної перебудови пшеничної хромосоми за участю цієї хромосоми егілопса. Напевно, що отримані нами результати підтверджують інформацію про гаметоцидну природу хромосоми $2 S^{sh}$ егілопса Шарона [259].

Вивчення ліній – похідних Аврозису, стійких до борошнистої роси, за конфігурацією хромосом в М1 мейозу МКП гібридів F_1 від схрещування інтрогресивних ліній між собою та з сортом Аврора, а також результати їхньої оцінки за ознаками морфології колосу та електрофоретичним спектром білків вказують на те, що 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 хромосомою, що замістила пшеничну, була хромосома $2S^{sh}$. Гаметоцидну хромосому $4S^{sh}$, для ідентифікації якої було зроблено цю частину роботи, було знайдено у 13 лініях з 26.

4.4.2. Мікросателітний аналіз інтрогресивних ліній, стійких до борошнистої роси. Набір інтрогресивних ліній *res* – похідних Аврозису, Авродесу та Авролати, стійких до борошнистої роси, було скриновано за алелями мікросателітних локусів, локалізованих на хромосомах субгеному D пшениці кожної з семи гомеологічних груп (рис. 4.16). На хромосомах показано лише ті локуси із перевірених нами, які давали різні продукти ампліфікації для Аврори та геномно-заміщених амфідиплоїдів. Дослідження проведено з метою знайти лінії з таким сполучення алелів мікросателітних локусів, які б відповідали хромосомі певної гомеологічної групи чужинного геному [28,71,101,102].

Серед спектрів, отриманих з праймерами мікросателітних локусів, які було виявлено при дослідженні стійких інтрогресивних ліній м'якої пшениці, спостерігалися: 1) спектри, частково ідентичні до одного із батьків, проте із відсутнім одним або більше компонентами; 2) окремі спектри із новими компонентами, відмінними від обох батьківських спектрів, алель, що продукує такий компонент, ми називаємо «інший»; 3) нові гетерозиготні спектри, які включали компоненти, ідентичні одній із батьківських форм, та нові компоненти (продукуються «іншим» алелем); 4) нуль-алель або повна відсутність компоненту у спектрі.

1-шу хромосому субгеному D було вивчено лише за 3-ма SSR-локусами, локалізованими на короткому плечі. Найгірше було те, що два з трьох локусів вказані їхніми оригінаторами як специфічні не лише до хромосоми 1D, а і інших хромосом гомеологічної групи 1 (*Xgwm33*-1A, 1B, 1D, *Xgwm106* -1B, 1D) [779]. Для двох з трьох перевірених мікросателітних локусів всі геномно-заміщені амфідиплоїди мали на спектрі ДНК специфічні компоненти, не властиві ДНК Аврори. Отже, ампліфікація відбувається з ДНК хромосом 1-ої групи трьох видів егілопса також. Лocus *Xcfd92*-1D виявився неінформативним через відсутність у спектрах амфідиплоїдів специфічних компонентів: компонент, який є у спектрі амфідиплоїда, співпадає за рухливістю з одним з двох компонентів спектру, які продукує ДНК Аврори. Відсутність у спектрі лінії компоненту, притаманного ДНК Аврори, не можна розглядати як прямий доказ наявності чужинного хроматину у геномі лінії. Така відсутність може лише підтримувати висновок, отриманий за рахунок більш переконливих доказів.

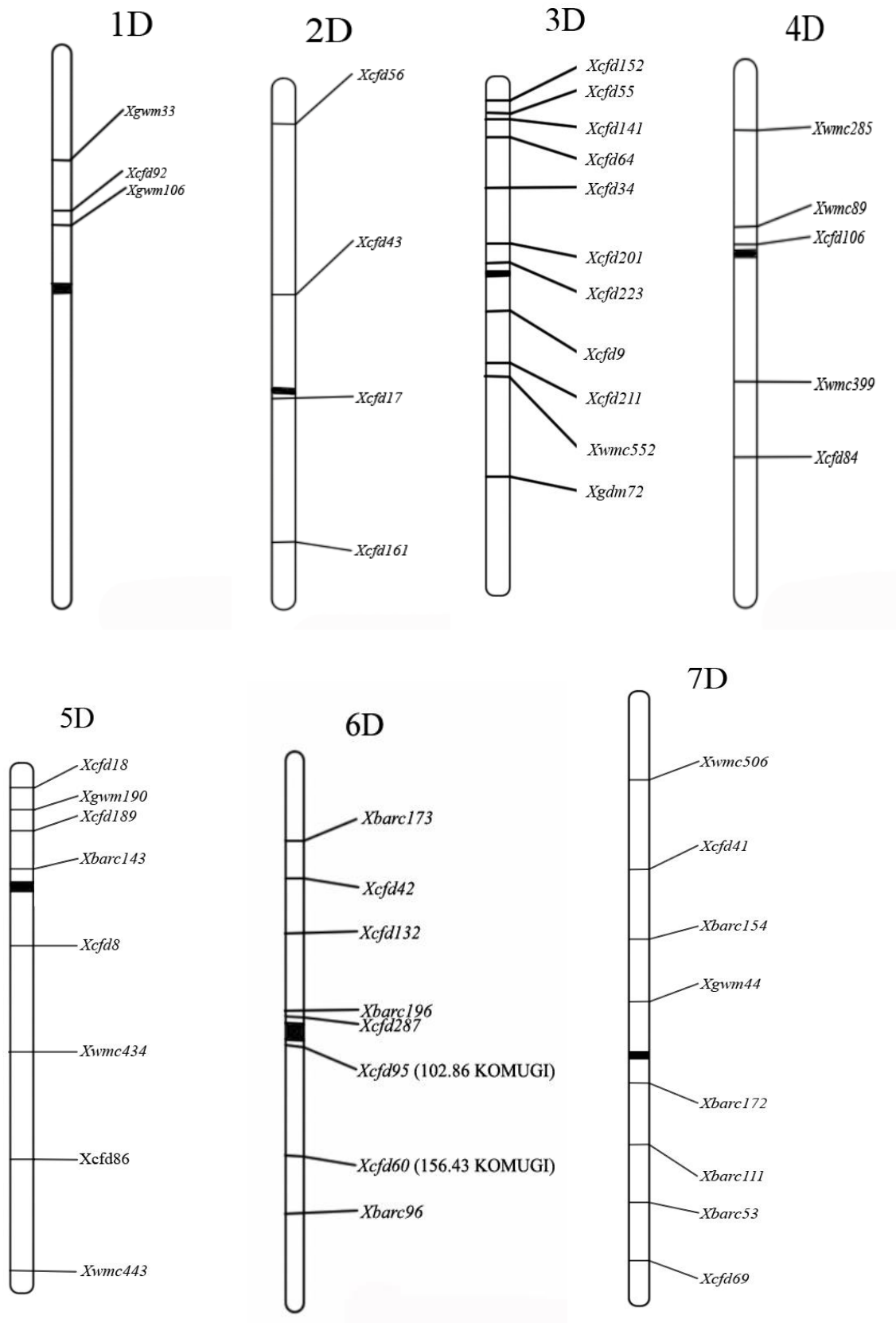


Рис. 4.16. Хромосомна локалізація досліджених мікросателітних маркерів [779].

За результатами, наведеними у таблицях 4.15–4.17, видно, що найхарактернішою рисою спектрів, отриманих з праймерами локусів,

специфічних до хромосом 1-ої гомеологічної групи, є поява помітної кількості компонентів у спектрах, які можуть продукуватися лише «іншими» алелями, тобто такими, які не були притаманні ні Аврорі, ні геномно-заміщеному амфідиплоїду. Ми не маємо жодної можливості обговорювати механізми утворення таких інших локусів, тому що не досліджували їх. Лише зауважимо, що короткі плечі хромосом 1-ої групи містять гліадинові гени, про які у розділі 5-му буде наведено докази їхньої високої мінливості у геномі інтрогресивних ліній. Можливо, це якимось пов'язано з результатами оцінки ліній за мікросателітами, специфічними до хромосом 1-ої групи. Серед морфологічних маркерів хромосом 1-ої групи егілопсів є дуже виразний: рослини, листя яких вкриті восковою осугою, мають зелений (без воскової осуги) колос. Вид рослин дуже характерний, такі рослини завжди відбирались для подальшої роботи при створенні інтрогресивних ліній. Можливо, це непрямим чином вплинуло на підвищення концентрації серед ліній перебудов, в яких бали участь хромосоми 1-ої гомологічної групи. Серед вивчених нами стійких до борошнистої роси ліній таку характеристику мали 141, 166, 216, 217, 221, 254, а лінія 4 була повністю позбавлена воскової осуги (табл. 4.6). Нами було показано при гібридологічному аналізі геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка, що у контролі ознаки «відсутність воскової осуги» беруть участь гени 1 та 2-ої хромосом егілопса [110]. Можливо, що вказані лінії містять у геномі хромосому 1-ої групи егілопса, проте не нативну, а перебудовану.

Серед чотирьох мікросателітних локусів, специфічних до хромосоми 2D, обмежену специфічність мав лише локус *Xcfd56-2B*, 2D і саме цей локус, а також локус *Xcfd161-2D*, були неінформативними для всіх амфідиплоїдів: з праймерами першого локусу амфідиплоїди взагалі не давали компонентів, другого – давали спектр, що збігається зі спектром Аврори. За локусом *Xcfd56-2B*, 2D лінії демонстрували або спектр Аврори, або спектр, що міг утворитися лише «іншими» алелями. З праймерами локусу *Xcfd161-2D* ДНК ліній майже завжди мали інший алель. З праймерами локусів *Xcfd43-2DS*, *Xcfd17-2DL* ДНК амфідиплоїдів дає специфічну картину ампліфікації з двома та трьома

компонентами, в той час як ДНК Аврори продукує лише один компонент. З таблиць 4.15–4.17 видно, що чужинними ампліконами за локусом *Xcfd17-2DL* характеризуються три лінії – похідні Аврозису. Колосся цих ліній не мають морфологічних маркерів хромосом 2-ої групи: жорстка луска без вдавненості у своїй основі. Скоріш за все, геноми ліній мають транслокацію, що включає локус *Xcfd17-2DL*. За локусом *Xcfd43-2DS* в спектрах цих ліній всі алелі інші. Три лінії – похідні Авролати характеризуються чужинним алелем за кожним із згаданих локусів, *Xcfd17* та *Xcfd43*: 216-3, 217, 222. Ті самі лінії мають жорстку луску без вдавненості (табл. 4.6). Схоже, що вказані лінії мають чужинне заміщення 2U/2D. Так саме характеризуються лінії 70 та 51 – похідні Авродеса, хоча для останньої ми не маємо характеристики луски. Переважна кількість ліній за цими двома локусами мають інші алелі, не ті, що властиві Аврорі або амфідиплоїду. Знову потрібно підкреслити, що наявність морфологічного маркера, що легко ідентифікується (жорстка луска без вдавненості), підвищує концентрацію лінії з відповідним гомеологічним хроматином серед розмаїття інтрогресивних ліній у порівнянні з лініями, для яких нами не було вчасно знайдено ефективного морфологічного маркеру.

Всі мікросателітні локуси хромосоми 3D, за даними оригінаторів, специфічні лише для цієї хромосоми, і практично всі не мають маркерного потенціалу для хромосом егілопсів. Спектри ДНК амфідиплоїдів або співпадають із спектром ДНК Аврори (*Xcfd223* для всіх трьох, *Xcfd55* для Аврозису, Авролати, *Xcfd64* та *Xcfd201* для Аврозиса, Авродеса), що робить їх повністю неінформативними, або амфідиплоїди характеризуються 0-алелями (*Xcfd152-3D*, *Xcfd9*, *Xgdm72* для трьох амфідиплоїдів, *Xcfd141*, *Xwmc552* для Аврозису, Авродеса, *Xcfd34* для Аврозису, Авролати, *Xcfd55* для Авродесу). Цінність таких спектрів також обмежена, адже повноцінним доказом наявності чужинного хроматину у геномі має слугувати наявність відповідного, специфічного компоненту у спектрі. Таких компонентів для хромосом 3-ої групи лише три: *Xcfd211* для Авролати, *Xcfd211* для Авролати та Авродесу. Всі три лінії – похідні Аврозису, схоже, мають хромосому 3D, можливо з деякими змінами у порівнянні з 3D Аврори, але без жодного доказу наявності

чужинного хроматину. Серед похідних Авролати є лінії, що мають у спектрах ДНК по одному (166, 207, 212, 215, 221-2) чи два (лінії 221-1, 254, 2599) маркери U, проте переважно цим маркером є відсутність компонентів у спектрі, а такий доказ наявності чужинного хроматину є лише непрямим. Можна припустити, що хромосома 3D згаданих ліній має транслокацію чужинного гомеолога, але потрібні додаткові докази. Серед ліній – похідних Авродеса, маркерні компоненти його спектру з'являються частіше. Можливо, що лінії 4, 38, 39, 83, 1112 є чужинним заміщенням 3S/3D, тому що жодного компонента спектру, притаманного спектру Аврори, ДНК цих ліній не утворює. Наявність неінформативних компонентів картину не прояснює. Деякі лінії, схоже, мають рекомбінантну хромосому, в якій прицентромерна ділянка складається з хроматину Аврори, а дистальні частини хромосоми представлені хроматином егілопсу. Серед 24 ліній лише три (3-1, 55, 70) не мають у спектрі ДНК маркерів (прямих чи непрямих) егілопсу, але і спектру Аврори вони не відповідають: мають або інші алелі, або неінформативні компоненти спектру, наявність яких можна розглядати на користь наявності хроматину як Аврори, так і егілопсу. За результатами мікросателітного аналізу схоже, що ген стійкості до борошнистої роси міститься у хроматині хромосоми 3S Авродесу.

Серед п'яти мікросателітних локусів, вивчених для ідентифікації хроматину 4-ої гомологічної групи, один був специфічний до хромосом всіх трьох геномів м'якої пшениці та виявився неінформативним для амфідиплоїдів, оскільки давав електрофоретичний продукт такий самий, як і з ДНК Аврори (*Xwmc89*). Для ДНК Аврозису неінформативними виявилися ще три локуси, *Xcfd106*, *Xwmc399*, *Xcfd84* через збіг спектрів Аврозису та Аврори. Локус *Xwmc285* мав обмежену інформативність, оскільки ампліфікація з ДНК Аврозису не відбувалася. Отже, лінії – похідні Аврозису охарактеризувати щодо наявності чужинних включень хроматину 4S^{sh} хромосоми не вдалось. Те саме стосується ліній – похідних Авролати, тільки інший локус не дає ампліфікації з ДНК Авролати, це *Xcfd106*. ДНК двох ліній, 216-3 та 254, не ампліфікується з праймерами цього локусу, що непрямим вказує на можливу інтрогресію хроматину 4U в цих лініях. Для лінії 254 це підтверджується

фенотипом електрофоретичного спектру β -амілази (див. табл. 5.9). Для ліній – похідних Авродесу неінформативними виявилися всі досліджені локуси. Деякі лінії (табл. 4.17) містять інші компоненти спектру стосовно батьківських. Хоча таких компонентів було зареєстровано помітно менше, ніж для локусів, специфічних до хромосом 1 та 3 гомеологічних груп, вони реєструються в одних і тих самих лініях для різних досліджених мікросателітних локусів. Це може вказувати на перебудову хромосоми 4D ліній у порівнянні з такою сорту Аврора.

З семи мікросателітних локусів, специфічних до хромосоми 5D, два, *Xcfd8* та *Xwmc434*, були неінформативними для Аврозису, оскільки спектри його ДНК збігалися зі спектрами ДНК Аврори. За локусами *Xgwm190* та *Xcfd86* ДНК Аврозису компонентів не давала, а праймери локусів *Xcfd18*, *Xcfd189*, *Xbarc143*, *Xwmc443* давали специфічний компонент з ДНК Аврозису та є інформативними. Інші, у порівнянні з батьківськими, компоненти продукували праймери локусів *Xcfd189*, *Xwmc443* (інформативні) та *Xwmc434* (неінформативний). Специфічний для Аврозису спектр мала лише лінія 113 за локусом *Xwmc443*, дистальним на довгому плечі хромосоми. Можна припустити наявність чужинної транслокації на плечі 5DL. Інші алелі в локусах *Xcfd189* та *Xwmc434* можуть розглядатися як припущення про наявність внутрішньохромосомних перебудов у хромосомі 5D Аврори. Для Авролати неінформативним був локус *Xcfd18*, а за локусами *Xgwm190*, *Xbarc143*, *Xcfd8* ДНК Авролати компонентів не утворює. За інформативними локусами спектри ДНК ліній не мали компонентів, властивих Авролаті, за виключенням лінії 166, яка за локусом *Xcfd189* відповідала Авролаті і, як Авролата, мала 0-алель за локусом *Xbarc143*. Можливо, лінія має транслокацію 5DS/5US. Локус *Xcfd18* характеризується високою частотою утворення нових алелів. ДНК 10 ліній з 13 демонструє три нові алелі. Нуль-алель також є новим, якщо жоден з батьків не характеризувався таким алелем. Отже, алелі деяких ліній за локусами *Xcfd86* та *Xwmc443* також є новими і у цілому хромосом 5D у інтрогресивних лініях – похідних Авролати показує ознаки неідентичності хромосома 5D Аврори. Для ДНК Авродесу неінформативними є локуси *Xwmc434* та *Xcfd86*. Специфічні для

Авродесу компоненти спектру утворюються з праймерами локусів *Xcfd18* та *Xcfd189*. Чотири локуси, *Xgwm190*, *Xbarc143*, *Xcfd8*, *Xwmc443*, характеризуються 0-алелями з ДНК Авродесу. За дистальним локусом короткого плеча чужинним алелем характеризуються лінії 53, 1105, 1092, 1112, 16, 53, що дає підстави припустити транслокацію. Для ліній 1112 та 16 це підтверджується 0-алелем за наступним маркером. Зміну на чужинні алелі знайдено у ДНК лінії 3-2 за локусами *Xcfd189* та *Xbarc143*, розташованими поруч на короткому плечі ближче до центромери. Частою появою нового алеля в лініях – похідних Авродесу характеризується локус *Xbarc143*. 0-алель характеризує не лише ті локуси, за якими він властивий Авродесу, але з'являється у якості нового алеля для неінформативних локусів. В цьому випадку ми його розглядаємо як новий, поява якого дає підстави припустити наявність якихось змін у хромосомі 5D Аврори. Нові алелі спостерігали за 6-ма локусами з восьми вивчених (табл. 4.19).

Більшість локусів, специфічних до хромосоми 6D, виявились напівінформативними через 0-алель, властивий геномно-заіщеному амфідиплоїду. Це локус, *Xcfd60* для трьох амфідиплоїдів, *Xbarc173*, *Xcfd132*, *Xbarc196*, *Xcfd95* для Аврозису та Авролати, *Xcfd42* для Авролати та Авродесу та *Xbarc96* для Авролати. Спектри Аврори та амфідиплоїдів збігалися для локусів *Xcfd42* (Аврозис), *Xbarc173*, *Xcfd132*, *Xbarc196*, *Xbarc96* (Авродес), *Xcfd287* – 0-алель у всіх випадках. Специфічність до чужинного хроматину виявлено лише для двох локусів: *Xcfd95* для Авродеса та *Xbarc96* для Аврозису. Жодну з ліній – похідних Авролати не можна характеризувати як таку, що містить чужинний хроматин від амфідиплоїда, судячи за даними мікросателітного аналізу (табл. 4.17, 4.18). Одна з ліній Аврозису, 143, характеризується специфічним для Аврозису алелем за локусом *Xbarc96*. Алелі за іншими локусами або нові, або властиві ДНК Аврори. Половина з вивчених ліній – похідних Авродесу характеризуються за інформативним локусом *Xcfd95* алелем, властивим Авродесу. Цей локус розташований на довгому плечі 6D близько до центромери. П'ять локусів цієї хромосоми для Авродесу неінформативні, тобто не можна стверджувати, що хромосома 6D ліній

аналогічна нативній хромосомі Аврори і не містить хроматину хромосоми 6S. 12 ліній із 24 перевірених, стійких до борошнистої роси, мають специфічний для Авродесу алель прицентромерного SSR-локусу (табл. 4.19). Можна припустити, що хромосома 6S містить ген (гени), що забезпечують стійкість до борошнистої роси та запровадити дослідження з перевірки цього припущення. Інші алелі було знайдено для всіх локусів, крім найближчих до центромери. Можливо, досліджена хромосома є рекомбінантною, проте рекомбінація здійснювалась не на хромосомі 6D, а на хромосомі 6S.

Локуси хромосоми 7D, дають специфічні продукти ампліфікації з Аврозисом (*Xgwm44*, *Xcfd69*), Авролатою (*Xbarc154*, *Xbarc172*), Авродесом (*Xbarc154*, *Xgwm44*, *Xbarc172*). Неінформативних локусів відносно мало, це *Xwmc506* та *Xgwm44* для Авролати, *Xwmc506* та *Xcfd41* для Авродесу. Всі інші сполучення локус-амфідиплоїд – це відсутність продукту ампліфікації, тобто 0-алель. Три лінії – похідні Аврозису демонструють повну подібність Аврорі за мікросателітними локусами хромосоми 7D за єдиним винятком, коли з ДНК двох ліній з праймерами локусу *Xbarc172* утворюється інший компонент спектру. Серед ліній – похідних Авролати за жодним локусом в лініях не було виявлено подібності до Авролати. В лініях переважали алелі, властиві Аврорі, траплялись інші алелі, в тому числі 0-алелі. Серед ліній – похідних Авродесу алелі, специфічні для цього амфідиплоїда, є для кожного з трьох інформативних локусів. Лінія 1112 має або заміщення 7D/7D або значно перебудовану хромосому. За кількома локусами відрізняються від 7D хромосоми ліній 4, 38, 55, 83, за одним-двома локусами – ліній 3-2, 12-1, 25, 70, 3. Отже, 10 ліній з 24 стійких до борошнистої роси виявилися носіями неінтактної хромосоми 7D. Слід перевіряти припущення, що ця хромосома несе ген стійкості до борошнистої роси, отриманий від *Ae. speltoides*.

Порівняльний мікросателітний аналіз ДНК інтрогресивних ліній, стійких до борошнистої роси, показав поліморфізм електрофоретичних спектрів, який виходить за межі батьківських форм ініціальних гібридів [3,17,18,70]. 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 компоненти у спектрі. Враховуючи, що жодна із досліджуваних ліній за своїм набором мікросателітних локусів за всіма 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.

На підставі отриманих результатів мікросателітного аналізу висунуті 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 борошнистої 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.

Характеристика ліній *res* – похідних Аврозиса за мікросателітними спектрами

Лінія <i>res</i>	Алелі ліній за вказаними локусами ¹⁾																							
	<i>Xgwm33-1DS</i>	<i>Xcfd92-1DS</i>	<i>Xgwm106-1DS</i>	<i>Xcfd56-2DS</i>	<i>Xcfd43-2DS</i>	<i>Xcfd17-2DL</i>	<i>Xcfd161-2DL</i>	<i>Xcfd152-3D</i>	<i>Xcfd55-3D</i>	<i>Xcfd141-3D</i>	<i>Xcfd64-3D</i>	<i>Xcfd34-3D</i>	<i>Xcfd201-3D</i>	<i>Xcfd223-3D</i>	<i>Xcfd9-3D</i>	<i>Xcfd211-3D</i>	<i>Xwmc552-3D</i>	<i>Xgdm72-3D</i>	<i>Xwmc285-4DS</i>	<i>Xwmc89-4DS</i>	<i>Xcfd106-4DS</i>	<i>Xwmc399-4DL</i>	<i>Xcfd84-4DL</i>	
113	I1	N	I2	I1	I1	S	I1	D	I1	D	N	I1	N	N	D	D	D	D	D	N	N	N	N	
141	I2	N	I2	I1	I1	S	I1	I1	N	D	N	D	0	N	D	D	D	I1	I1	N	N	N	N	
143	S	N	S	I2	I2	S	I1	I2	I2	D	N	D	N	N	D	D	D	D	I1	N	N	N	N	
Лінія <i>res</i>	Алелі ліній за вказаними локусами ¹⁾																							
	<i>Xcfd18-5DS</i>	<i>Xgwm190-5DS</i>	<i>Xcfd189-5D</i>	<i>Xbarc143-5DS</i>	<i>Xcfd8-5DL</i>	<i>Xwmc434-5DL</i>	<i>Xcfd86-5DL</i>	<i>Xwmc443-5DL</i>	<i>Xbarc173-6D</i>	<i>Xcfd42-6D</i>	<i>Xcfd132-6D</i>	<i>Xbarc196-6D</i>	<i>Xcfd287-6D</i>	<i>Xcfd95-6D</i>	<i>Xcfd60-6D</i>	<i>Xbarc96-6D</i>	<i>Xwmc506-7D</i>	<i>Xcfd41-7D</i>	<i>Xbarc154-7D</i>	<i>Xgwm44-7D</i>	<i>Xbarc172-7D</i>	<i>Xbarc111-7D</i>	<i>Xbarc53-7D</i>	<i>Xcfd69-7D</i>
113	D	D	D	D	N	I1	D	S	D	0	D	D	I1	D	D	I1	D	D	D	D	I1	D	D	D
141	D	D	I1	D	N	N	D	I1	I1	0	D	D	0(S ^{sh})	D	I1	D	D	D	D	D	I1	D	D	D
143	D	D	I1	D	N	N	0(S ^{sh})	I2	D	I1	I1	I1	I2	D	D	S ^{sh}	D	D	D	D	D	D	D	D

Примітка: ¹⁾ у табл. 4.15–4.17 алель репрезентує геном: D – Аврори, S – *Ae. speltoides*, S^{sh} – *Ae. sharonensis*, U – *Ae. umbellulata*. N – алель неінформативний, I та 0 – нові алелі стосовно батьківських.

Характеристика ліній res – похідних Авролати за мікросателітними спектрами

Лінія res	Алелі ліній за вказаними локусами ¹⁾																							
	Xgwm33-1DS	Xcfd92-1DS	Xgwm106-1DS	Xcfd56-2DS	Xcfd43-2DS	Xcfd17-2DL	Xcfd161-2DL	Xcfd152-3D	Xcfd55-3D	Xcfd141-3D	Xcfd64-3D	Xcfd34-3D	Xcfd201-3D	Xcfd223-3D	Xcfd9-3D	Xcfd211-3D	Xwmc552-3D	Xgdm72-3D	Xwmc285-4DS	Xwmc89-4DS	Xcfd106-4DS	Xwmc399-4DL	Xcfd84-4DL	
166	U	N	U	N	I1	I1	I1	I1	I1	N	D	D	D	N	D	U	I1	I1	0	N	N	N	N	N
190	I1	N	U	N	I1	I1	I1	D	N	N	D	I1	D	N	D	I1	D	I1	N	N	N	N	N	N
206	I2	N	I1	N	I1	I1	I1	D	I2	N	D	I1	D	N	D	U	D	D	N	N	N	N	N	N
207	I2	N	I1	N	I2	I2	I1	D	N	N	D	I2	U(0)	N	D	D	I1	D	N	N	N	N	N	N
212	I3	N	U	N	I1	I1	I1	I2	I1	N	D	U(0)	D	N	D	I1	D	D	N	N	N	N	N	N
215	I1	N	U	N	I1	I1	I1	D	N	N	D	D	D	N	D	U	D	I2	N	N	N	N	N	N
216-3	U	N	U	N	U	U	I1	D	I1	N	D	I1	D	N	D	D	I2	D	N	N	0	N	N	N
217	U	N	U	N	U	U	I1	D	N	N	D	D	D	N	D	U	D	I2	N	N	N	N	N	N
221-1	U	N	U	N	U	D	I1	D	I1	N	D	U(0)	D	N	U(0)	D	I3	D	N	N	N	N	N	N
221-2	I4	N	U	N	I1	I1	D	D	I1	N	D	I1	D	N	U(0)	D	I3	D	N	N	N	N	N	N
222	I1	N	U	N	U	U	I1	D	I1	N	I1	D	D	N	D	D	I3	D	N	N	N	N	N	N
254	U	U	I1	N	I1	I1	I1	D	0	N	I2	I3	U(0)	N	D	U	D	I2	N	N	0	N	N	N
2599	I3	N	U	N	I1	I1	I1	I2	I1	N	D	U(0)	D	N	U(0)	D	D	D	N	N	N	N	N	N

Лінія res	Алелі ліній за вказаними локусами ¹⁾																							
	Xcfd18-5DS	Xgwm190-5DS	Xcfd189-5D	Xbarc143-5DS	Xcfd18-5DL	Xwmc434-5DL	Xcfd186-5DL	Xwmc443-5DL	Xbarc173-6D	Xcfd42-6D	Xcfd132-6D	Xbarc196-6D	Xcfd287-6D	Xcfd95-6D	Xcfd60-6D	Xbarc96-6D	Xwmc506-7D	Xcfd41-7D	Xbarc154-7D	Xgwm44-7D	Xbarc172-7D	Xbarc111-7D	Xbarc53-7D	Xcfd69-7D
166	I1	D	U	0(U)	D	D	D	D	I1	0(U)	D	D	0(U)	D	D	D	N	N	I1	D	D	D	D	D
190	I1	D	D	D	D	D	D	D	D	0(U)	D	D	0(U)	D	D	D	N	N	D	0	D	D	0(U)	D
206	I1	N1	D	D	D	D	D	D	I1	0(U)	D	I1	0(U)	D	D	D	N	N	D	I1	D	D	I1	D
207	I1	N2	D	D	D	D	D	D	D	0(U)	I1	I2	0(U)	D	D	I1	N	N	D	D	D	I1	I2	D
212	I2	D	D	D	D	D	D	0	I1	0(U)	D	D	0(U)	D	D	D	N	N	D	0	D	D	D	D
215	I1	D	D	D	D	D	N1	D	D	D	D	D	0(U)	D	D	D	N	N	D	I2	D	D	D	D
216-3	N	D	D	N1	D	D	0	D	D	I1	I1	I2	0(U)	D	D	I1	N	N	D	D	D	D	0(U)	D
217	I1	D	D	N1	D	D	0	D	D	D	I1	I2	0(U)	D	D	D	N	N	I2	D	D	D	D	D
221-1	I1	D	D	D	D	D	0	0	D	0(U)	0(U)	I2	0(U)	D	D	I1	N	N	I2	D	D	0(U)	0(U)	D
221-2	N	D	D	D	D	D	D	0	I1	I2	D	D	0(U)	D	D	D	N	N	D	I2	I1	D	D	D
222	I1	D	D	N1	D	D	0	D	D	I1	I1	I1	0(U)	D	D	I1	N	N	D	D	D	D	D	D
254	N	D	D	D	D	D	D	0	0(U)	0(U)	D	D	0(U)	D	0(U)	I1	0	0(U)	0	0	0	0(U)	0(U)	D
2599	I3	D	D	D	D	D	D	D	I2	I2	D	D	0(U)	D	D	I2	N	N	D	D	I2	D	D	D

Характеристика ліній *res* – похідних Авродеса за мікросателітними спектрами

Лінія <i>res</i>	Алелі ліній за вказаними локусами ¹⁾																						
	<i>Xgwm33-1DS</i>	<i>Xcfd92-1DS</i>	<i>Xgwm106-1DS</i>	<i>Xcfd56-2DS</i>	<i>Xcfd43-2DS</i>	<i>Xcfd17-2DL</i>	<i>Xcfd161-2DL</i>	<i>Xcfd152-3D</i>	<i>Xcfd55-3D</i>	<i>Xcfd141-3D</i>	<i>Xcfd64-3D</i>	<i>Xcfd34-3D</i>	<i>Xcfd201-3D</i>	<i>Xcfd223-3D</i>	<i>Xcfd9-3D</i>	<i>Xcfd211-3D</i>	<i>Xwmc552-3D</i>	<i>Xgdm72-3D</i>	<i>Xwmc285-4DS</i>	<i>Xwmc89-4DS</i>	<i>Xcfd106-4DS</i>	<i>Xwmc399-4DL</i>	<i>Xcfd84-4DL</i>
3-1	D	N	I1	D	S	I1	I1	I1	I1	D	I1	D	N	N	N	D	I1	D	I1	N	N	N	N
3-2	D	N	I2	D	S	I2	I1	I2	0	D	N	D	N	N	S(0)	S	I1	D	I2	I1	N	N	N
4	D	S	I1	D	S	I1	I1	S(0)	0	S(0)	N	S(0)	N	N	S(0)	S	S(0)	S(0)	N	N	N	N	N
7	D	N	I1	I1	S	I1	I1	D	D	S(0)	I2	S	N	N	N	D	I2	I1	N	N	N	N	I1
12-2	S	N	I1	D	S	I1	I1	D	I1	D	N	I1	N	N	S(0)	D	I1	D	N	N	N	N	N
25	I1	N	I2	I1	S	I1	I1	D	0	D	I2	D	N	N	S(0)	S	I1	S(0)	N	N	N	N	I1
33-2	I2	N	D	D	S	I1	I1	D	D	D	N	S(0)	N	S(0)	N	D	I1	D	N	N	N	N	N
38	D	N	I1	I1	S	I1	I1	I2	0	S(0)	N	I1	N	N	N	S	S(0)	D	N	N	I1	N	N
39	I1	N	I1	D	S	I1	I1	S(0)	D	S(0)	N	S(0)	N	N	S(0)	S	S(0)	S(0)	N	N	N	N	N
53	D	N	I1	I2	I1	I1	D	D	D	D	N	S	N	N	N	S	I1	D	N	N	N	N	N
55	D	N	I3	D	S	I1	D	D	D	D	N	D	N	N	N	D	I2	I2	N	I1	N	N	I1

Лінія res	Алелі ліній за вказаними локусами ¹⁾																							
	<i>Xcfd18-5DS</i>	<i>Xgwm190-5DS</i>	<i>Xcfd189-5D</i>	<i>Xbarc143-5DS</i>	<i>Xcfd8-5DL</i>	<i>Xwmc434-5DL</i>	<i>Xcfd86-5DL</i>	<i>Xwmc443-5DL</i>	<i>Xbarc173-6D</i>	<i>Xcfd42-6D</i>	<i>Xcfd132-6D</i>	<i>Xbarc196-6D</i>	<i>Xcfd287-6D</i>	<i>Xcfd95-6D</i>	<i>Xcfd60-6D</i>	<i>Xbarc96-6D</i>	<i>Xwmc506-7D</i>	<i>Xcfd41-7D</i>	<i>Xbarc154-7D</i>	<i>Xgwm44-7D</i>	<i>Xbarc172-7D</i>	<i>Xbarc111-7D</i>	<i>Xbarc53-7D</i>	<i>Xcfd69-7D</i>
70	I2	N	D	D	S	S	I1	D	D	D	N	I2	N	N	N	D	I2	D	I1	N	N	N	N	N
83	D	S	I1	I!	S	I2	I1	I2	S(0)	S(0)	N	S	N	N	N	D	S(0)	S(0)	I1	N	I1	N	N	N
1105	D	N	I1	D	S	I4	I1	D	D	S(0)	N	D	N	N	N	S	I2	D	N	N	N	N	N	N
1092	I2	N	I4	D	I2	I4	I1	S(0)	D	D	N	S	N	N	N	S	I1	D	I1	I1	N	N	N	N
1106	I1	N	I5	I1	S	I4	I1	D	D	D	I3	I1	N	N	N	S	I2	S(0)	I1	I1	N	N	N	N
1112	I1	S	I2	D	S	I1	I1	S(0)	S(0)	S(0)	N	S	N	N	N	S	S(0)	S(0)	N	N	N	N	N	I1
1114	S	N	I2	D	S	I1	I1	I3	I1	D	N	S(0)	N	N	N	I1	I3	D	N	N	N	N	N	I1
3-3	I3	N	D	D	S	I1	I1	D	D	D	N	S(0)	N	I1	N	D	S(0)	D	I1	N	N	N	N	N
12-1	S	N	I1	I2	S	I1	I1	D	D	D	N	S(0)	N	N	N	D	S(0)	D	N	N	N	N	N	N
16	D	N	D	0	S	I1	0	D	S(0)	S(0)	N	I2	N	N	N	D	S(0)	D	N	N	N	N	N	N
19	D	N	D	I1	S	I1	D	D	D	D	N	S(0)	N	N	N	D	S(0)	D	I1	N	N	N	N	N
51	I3	N	D	D	S	S	I1	D	I1	D	N	D	N	N	N	D	S(0)	D	N	N	N	N	N	N
42	D	N	I2	D	I2	I1	I1	D	D	D	N	D	N	N	N	D	S(0)	D	I1	I1	N	N	N	I1

Лінія res	Алелі ліній за вказаними локусами ¹⁾																							
	<i>Xcfd18-5DS</i>	<i>Xgwm190-5DS</i>	<i>Xcfd189-5D</i>	<i>Xbarc143-5DS</i>	<i>Xcfd18-5DL</i>	<i>Xwmc434-5DL</i>	<i>Xcfd186-5DL</i>	<i>Xwmc443-5DL</i>	<i>Xbarc173-6D</i>	<i>Xcfd142-6D</i>	<i>Xcfd132-6D</i>	<i>Xbarc196-6D</i>	<i>Xcfd287-6D</i>	<i>Xcfd195-6D</i>	<i>Xcfd160-6D</i>	<i>Xbarc96-6D</i>	<i>Xwmc506-7D</i>	<i>Xcfd141-7D</i>	<i>Xbarc154-7D</i>	<i>Xgwm44-7D</i>	<i>Xbarc172-7D</i>	<i>Xbarc111-7D</i>	<i>Xbarc53-7D</i>	<i>Xcfd69-7D</i>
3-1	D	N1	D	N1	D	N	N	D	I1	D	N	N	0(S)	S	D	N	N	N	D	D	I1	I1	D	D
3-2	N1	N2	S	0(S)	D	N	N	D	I1	D	N	N	0(S)	D	D	N	N	N	S	I1	D	0(S)	D	D
4	D	0(S)	D	D	D	N	N	0(S)	0	D	N	N	0(S)	D	D	0	N	0	S	I2	D	0(S)	D	D
7	N1	D	D	D	D	N	N	D	I2	D	N	I1	0(S)	S	D	N	I1	N	D	I3	I2	I2	D	D
12-2	D	N1	D	D	D	N	N	D	N	D	N	I1	0(S)	S	D	N	N	N	^s	I1	D	D	D	D
25	D	D	D	N1	D	N	N	D	N	D	N	I1	0(S)	S	D	N	I2	0	S	D	I1	I2	D	D
33-2	D	D	D	N1	D	N	N	D	N	D	N	N	0(S)	S	D	N	I1	N	D	I1	D	I1	D	D
38	D	D	D	N1	D	N	N	D	I3	D	N	N	0(S)	D	I1	N	N	N	D	I1	I3	I3	D	D
39	D	D	D	0(S)	0(S)	N	0	D	0	D	N	N	0(S)	D	D	0	N	N	D	I4	D	I2	D	D
53	S	D	D	N1	D	N	0	D	0	D	N	N	0(S)	D	D	0	N	N	D	I5	D	D	D	D
55	D	D	D	N1	D	N	N	D	N	D	N	N	0(S)	S	D	N	I1	0	S	I1	0	0(S)	D	D
70	D	D	D	A	D	N	N	D	N	D	N	N	0(S)	S	D	N	N	N	D	I1	U	D	D	D
83	D	D	D	N1	D	N	N	0(S)	0	D	N	N	0(S)	S	D	0	N	N	S	I2	I1	D	D	0(S)

Лінія res	Алелі ліній за вказаними локусами ¹⁾																							
	<i>Xcfd18-5DS</i>	<i>Xgwm190-5DS</i>	<i>Xcfd189-5D</i>	<i>Xbarc143-5DS</i>	<i>Xcfd18-5DL</i>	<i>Xwmc434-5DL</i>	<i>Xcfd186-5DL</i>	<i>Xwmc443-5DL</i>	<i>Xbarc173-6D</i>	<i>Xcfd142-6D</i>	<i>Xcfd132-6D</i>	<i>Xbarc196-6D</i>	<i>Xcfd287-6D</i>	<i>Xcfd195-6D</i>	<i>Xcfd160-6D</i>	<i>Xbarc96-6D</i>	<i>Xwmc506-7D</i>	<i>Xcfd141-7D</i>	<i>Xbarc154-7D</i>	<i>Xgwm44-7D</i>	<i>Xbarc172-7D</i>	<i>Xbarc111-7D</i>	<i>Xbarc53-7D</i>	<i>Xcfd69-7D</i>
1105	S	D	D	N1	D	N	N1	D	N	D	N	I1	0(S)	S	D	N	N	N	D	D	I4	D	D	D
1092	S	D	D	N1	D	D	D	D	I3	D	N	I1	0(S)	S	D	N	N	N	D	I6	D	D	D	D
1106	A	D	D	N1	D	D	N2	D	N	D	N	I1	0(S)	S	D	N	N	N	D	I4	I4	I3	0(S)	I1
1112	S	0(S)	D	D	D	D	D	0(S)	N	D	0	I2	0(S)	D	0(S)	I1	N	0	S	I6	0	0(S)	0(S)	0
1114	A	N1	D	N1	D	D	D	0(S)	I2	D	I1	I3	0(S)	D	I2	I2	I1	N	D	I1	D	0(S)	D	D
3-3	A	N2	D	D	D	D	D	D	I1	D	N	N	0(S)	D	D	N	0	N	S	D	0	I1	D	D
12-1	0	N2	D	D	D	0	D	D	N	D	N	N	0(S)	D	0(S)	N	N	0	D	0	0	D	0(S)	D
16	S	0(S)	0	D	0(S)	0	D	D	N	D	0	N	0(S)	D	0(S)	N	N	0	D	D	0	0(S)	0(S)	D
19	N2	D	0	D	D	0	D	D	I1	D	0	N	0(S)	D	D	N	I2	0	D	D	D	0(S)	0(S)	D
51	S	D	0	0(S)	0(S)	0	D	D	N	D	N	N	0(S)	D	D	N	I3	N	D	D	D	D	D	0(S)
42	0	D	S	N2	0(S)	D	0	D	I3	D	N	N	0(S)	S	D	I1	N	N	D	D	I4	D	D	D

Зіставлення результатів мікросателітного аналізу з морфологічною характеристикою вивчених ліній (табл. 4.6, 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 здавленість основи луски для 2-ої групи, наявність остей для хромосом 6-ої групи), непрямым чином підтверджує зроблений висновок про мозаїчну будову хромосом у геномах досліджених ліній з 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 похідних, перш за все через генетичну мінливість усередині геномів гібридного походження, яка знижує діагностичні компетентності алелів мікросателітних маркерів, властивих вихідним компонентам схрещування.

Загальним висновком з представленого розділу є наше сформоване переконання в необхідності комплексного підходу у спробах встановлення геномної структури інтрогресивних ліній щодо наявності, обсягу (хромосома – плече – інтрогресивний сегмент) та гомеологічної належності наявних в них інтрогресій. До переліку аналітичних заходів у такому дослідженні на першому місці має стояти вивчення кон'югації хромосом у гібрида F_1 між лінією, що вивчається, та генотипом, стосовно геному якого шукаємо зміни. Ідентифікація гомеологічної належності має визначатися за допомогою перш за все морфологічних та біохімічних маркерів, тому що фенотип за такими ознаками свідчить про функціональне збереження переданого гена, отже – про наявність у геномі певного обсягу чинного хроматину. Висновок про розмір цього обсягу робиться при зіставленні даних вивчення мейозу та даних про наявність маркерних для хромосоми певної гомологічної групи ознак морфології та біохімії. Щодо мікросателітів, їхня роздільна здатність як маркерів гомеологічних груп значно зменшується через високу чутливість фенотипу (спектр ампліконів, отриманий з певною парою праймерів) до навіть незначних генетичних змін, які можуть виникати як усередині переданого чужинного

хроматину, так і у самому резидентному геномі.

Список публікацій, оприлюднених за результатами досліджень, викладених у розділі 4

Антонюк МЗ, Терновская ТК. Признаки морфологии растений как маркеры гомеологических групп хромосом Triticeae. Цитология и генетика. 1997;31(4):105-12.

Злацкая АВ, Антонюк МЗ, Вдовичеко ЖВ, Терновская ТК. Зерновая кислая фосфатаза как генетический маркер хромосом четвертой гомеологической группы хромосом у эгилопсов и пшеницы. Цитология и генетика. 1999;33(5):42-6.

Antonyuk MZ, Bodylyova MV, Ternovskaya TK. Genome structure of introgressive lines *Triticum aestivum/Aegilops sharonensis*. Tsitol Genet. 2009;43(6):58-67.

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.

Антонюк МЗ, Бодильова МВ, Терновська ТК. Умови використання мікросателітних локусів як маркерів при інтрогресії генів *Rm* до м'якої пшениці. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць. Київ: Логос, 2010;9:3-7.

Терновська ТК, Єфіменко ТС, Антонюк МЗ, Мартиненко ВС. Генетичний контроль морфологічних ознак колосу в інтрогресивних лініях м'якої пшениці. В кн.: Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. Зб. наукових праць ІХ з'їзду УТГіС. Київ: Логос, 2012;3:175-80.

Антонюк МЗ, Штефюк ТВ, Терновська ТК. Поліморфізм інтрогресивних ліній м'якої пшениці за алелями мікросателітних локусів. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць. Київ: Логос, 2013;12:97-101.

Штефюк ТВ, Антонюк МЗ. Мікросателітний аналіз хромосом 6D та 7D інтрогресивних ліній пшениці, стійких до борошнистої роси. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць. Київ: Логос, 2014;14:86-91.

Antonyuk M, Bodylyova M, Vdovychenko Zh, Ternovskaya T. SSR-markers of gene for resistance to powdery mildew in the common wheat introgressive lines. Conference for Young Scientists, PhD Students and Students and Molecular Biology and Genetics; September 25–27, 2003; Kiev, Ukraine. Abstract Book, 2003:3.

Antonyuk M., Bodylyova M., Ternovska T. Polymorphism of 3D chromosome SSR-loci 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; 24-27 April 2010; Bologna, Italy. Abstract book, 2010, p.23.

Єфіменко Т, Антонюк М, Терновська Т. Успадкування морфологічних ознак луски у інтрогресивних ліній м'якої пшениці. Перша конференція молодих вчених «Біологія рослин та біотехнологія»; 5–7 жовтня 2011; Біла Церква, Україна. Тези доповідей, 2011, с.52.

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”; Kyiv. Abstract book, 2011, p.88.

РОЗДІЛ 5

ГЕНЕТИЧНА НЕСТАБІЛЬНІСТЬ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ

5.1. Результати вивчення ліній за ознаками морфології колоса

Хоча всі досліджувані інтрогресивні лінії були цитологічно стабільними (підрозділ 3.1), деякі з них були нестабільними за ознаками морфології, а саме за остистістю колосу, його формою, забарвленню зрілої колоскової луски, опушенням колоскової луски, вдавленістю у основі колоскової луски, жорсткістю колоскової луски, розподілу пігменту на колосковій лусці (табл. 5.1). Серед 72 ліній – похідних Авродесу, 42 ліній – похідних Аврозису та 53 лінії – похідних Авролати нестабільність хоча б за однією із перелічених ознак було зареєстровано, відповідно, в 40, 19 та 16 лініях, що склало у відсотках $55,6 \pm 5,87$, $45,2 \pm 7,68$ та $30,2 \pm 6,31$. Незважаючи на позірну різницю між наведеними числами, статистично значущою при порівнянні обсягів класів стабільних та нестабільних ліній методом χ^2 для чотирьохпольних таблиць різниця виявилась лише для пари лінії Авродесу – лінії Авролати. Величина χ^2 , розрахована з поправкою Єйтса для цієї пари, становила 6,95, $\chi^2_{0,05} = 5,92$ з урахуванням поправки Бонферроні для трьох порівнянь (див. підрозділ 2.2.6). Не можна виключити, що ця різниця є наслідком більш великого розміру групи ліній – похідних Авродесу у порівнянні з двома іншими групами.

У всіх випадках нестабільність у прояву 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 (див. підрозділ 2.2.2) замінювалась градацією ознаки, притаманної генотипу Аврора, отже властивої м'якій пшениці. Змін у зворотному напрямку ми не спостерігали. З таблиці 5.1 видно, що різні лінії виявляють нестабільність за різною кількістю ознак, які оцінювалися, від однієї до п'яти.

Таблиця 5.1

Стабільність інтрогресивних ліній res за морфологічними ознаками

Лінії res, які розщеплюються за вказаною ознакою								Лінії res, які не розщеплюються
Остистість	Колір стиглого колосу	Опушення колоскової луски	Вдавленість на колосковій лусці	Жорсткість колоскової луски	Розподіл пігменту на колосковій лусці	Форма колосу		
Похідні Авродесу								
4, 7, 12, 13, 16, 21, 22, 31, 32-1, 37, 39, 47, 48, 50, 55, 60, 62, 63, 64, 67, 68, 70, 80, 87, 95	3, 12, 13, 23, 31, 44, 53, 55, 56-2, 57, 93, 94		3, 7, 8, 12, 21, 47, 50, 53, 55, 57, 62, 63, 87, 88, 94, 95	3, 7, 8, 12, 21, 47, 50, 55, 62, 63, 70, 87, 88, 94, 95	21, 31, 42, 50, 95	8, 42, 47, 50, 54, 69, 86	2, 15, 17, 20, 24, 25, 26, 27, 30, 32-2, 33-1, 33-2, 34, 38, 39, 45, 51, 52, 56-1, 59, 65, 66, 72, 75, 76, 77, 78, 79, 82, 83, 84, 92	
Похідні Аврозису								
102, 105-2, 106, 107, 110, 113, 114, 120, 135	105-2, 110, 126, 135, 139-1	135	102, 103, 104, 106, 107, 110, 113, 114, 122, 126, 132, 135, 139-1, 139-2, 145, 147	102, 103, 104, 106, 107, 110, 113, 114, 118, 126, 132, 135, 145	102, 107, 110, 113, 114, 122, 126, 132, 139-1, 139-2	102, 103, 105-2, 107, 113, 122	97, 101, 105-1, 109, 110, 114, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 128, 129, 130, 133-1, 138, 140-1, 140-2, 141, 142, 143, 144, 146	

<i>Продовження табл. 5.1</i>							
Лінії res, які розщеплюються за вказаною ознакою							Лінії res, які не розщеплюються
Остистість	Колір стиглого колосу	Опушення колоскової луски	Вдавненість на колосковій лусці	Жорсткість колоскової луски	Розподіл пігменту на колосковій лусці	Форма колосу	
Похідні Авролати							
178, 182, 190, 193, 195-2, 216, 219	176, 178, 193, 214, 216, 219, 226	176, 178, 193	182, 190, 216, 219, 244	190, 214, 216, 219, 244, 253	182, 190, 244	176, 187, 219, 239	151, 155, 159, 164, 165, 166, 172, 173, 177, 188, 189, 191, 196, 199, 201, 202, 206, 207, 211, 212, 217, 218, 222, 225, 230, 232, 233-1, 233-2, 236, 237, 240, 243, 245, 246, 250

Перманентна мінливість за ознаками морфології колоса у інтрогресивних ліній відбувається на тлі повної цитологічної стабільності, що докладно показано у підрозділі 3.1.

Ознаки морфології частіше за все характеризуються як такі з різним ступенем експресивності, тобто не є дуже надійними свідками змін на генетичному рівні при деяких змінах на рівні фенотипу. Більш придатними ознаками є продукти експресії генів, що кодують ензими та запасні білки, які надійно та безпомилково візуалізуються на треках електрофоретичних спектрів. Тому лінії було вивчено за мінливістю їхніх білкових спектрів.

5.2. Мінливість інтрогресивних ліній за електрофоретичними спектрами деяких білків

У підрозділі 4.3 наведено результати скринування інтрогресивних ліній, остистих (підрозділ 4.3.2) та стійких до борошнистої роси (підрозділ 4.3.3) із застосуванням хромосомно-специфічних маркерів, які потенційно придатні для діагностування наявності у геномах лінії чужинного хроматину, що належить до хромосом 1, 3, 4, 5, 6 та 7 гомеологічних груп. Увагу було зосереджено на лініях, електрофоретичний спектр яких відповідав такому геномно-заміщеного амфідиплоїда. Саме така подібність розглядалась як доказ того, що певна лінія несе інтрогресію хромосоми, на яку вказував маркерний ген. Одночасно намагалися ідентифікувати чужинну хромосому, яка забезпечує розвиток градації ознаки, не притаманний Аврорі (наявність остей, стійкість до борошнистої роси). Лінії, які не виявили повну подібність до одного з батьків, склали дві інші групи (табл. 5.2, 5.3): 1) лінії, спектр яких відрізняється від спектру Аврори відсутністю певних компонентів, властивих останньому (рис. 5.1–5.4); 2) лінії, в спектрі яких було виявлено нові компоненти, не властиві спектрам жодному з прабатьківських генотипів (рис. 5.1–5.4). Для запасних білків було виявлено змішані спектри, де частина компонентів спектру відповідає спектру Аврори, частина – Авродесу.

Таблиця 5.2

Лінії – похідні Аврорати, охарактеризовані за ознакою остистість колосу (див. табл. 4.10), електрофоретичні спектри яких відрізняються від батьківських спектрів

Характеристика спектру ліній	Номери та відсоток ліній з вказаною характеристикою спектру для різних білків та генів								
	Гліадини		Естераза		Пероксидаза		β-амілаза	α-амілаза	
	<i>Gli-1</i>	<i>Gli-2</i>	<i>Est-1</i>	<i>Est-2</i>	<i>Per-1</i>	<i>Per-2</i>	<i>β-Amy-1</i>	<i>α-Amy-1</i>	<i>α-Amy-2</i>
Спектр, неповний у порівнянні зі спектром Аврори	6-9, 11, 12, 16, 17, 113-116, 119, 22, 30, 31, 33-35, 38-43	2, 6-10, 12, 14, 17, 40, 48, 1, 116, 117, 31, 35, 36, 41	7, 50	9, 115	2, 51, 127		17, 118-120, 21, 57	117, 30, 36, 39, 41, 44, 46, 52, 55, 127	2, 51, 127
	33±5,4	24±4,9	3±1,9	3±1,9	4±2,2	0	8±3,1	13±3,9	4±2,3
Спектр має нові компоненти у порівнянні зі спектром Аврори	7, 8, 16, 17, 114, 115, 31, 33, 39-42	120, 52, 53, 123, 125, 126, 1, 116, 117, 31, 35, 36, 41	45		115, 116, 117		118-120, 20, 21, 23, 24, 57, 124-127		50
	16±4,2	17±4,4	1±1,3	0	4±2,2	0	16±4,2	0	1±1,3

Таблиця 5.3

Лінії– похідні Авродесу, стійкі до борошністої роси, спектр яких відрізняється від батьківських спектрів

Характеристика спектру лінії	Номери та відсоток ліній з вказаною характеристикою спектру для різних білків				
	β-амілаза	α-амілаза		глютеніни	гліадини
		Мальт-зона	Грін-зона		
Спектр, неповний порівнянні зі спектром Аврори	6, 10, 12, 46, 48, 57, 62, 75, 76	8, 57, 81, 82, 84	10, 17, 20, 21, 24, 31, 34,	36, 40, 48, 52,	62, 65, 66, 68–71, 74
	10±3,2	22±8,6	30±9,6	5±2,2	9±3,1
Спектр має нові компоненти порівнянні зі спектром Аврори	7–9, 11, 24, 26, 28, 35, 44, 47, 60, 61, 67, 68, 70, 71, 75, 81, 89.	38, 41, 82		6–9, 11, 14, 29–32, 41, 46–48, 50–53, 58, 59, 62–65, 71, 75, 78, 79, 83–85, 88	2, 3, 5–9, 12–16, 18, 19, 25–30, 33, 35, 37–39, 41–44, 46, 47, 49–51, 53, 56, 60, 61, 64, 67, 72, 73, 75–88
	22±4,4	13±7,0	0	36±5,1	64±5,1

Напрошується таке пояснення: спектр гексаплоїдного генотипу контролюється трьома генами *Glu1* та трьома генами *Gli1*. Зважаючи на геномну структуру Аврори та Авродеса, в яких частина геному АВ має бути однаковою, ми очікували можливість лише такого заміщення: *GluD1* на *GluS1* та *GliD1* на *GliS1*. Судячи з отриманих спектрів ліній останньої групи, не можна виключити, що ген егілопса замінив пшеничний ортолог іншого геному, А чи В. Проте доказів такому поясненню ми не маємо.

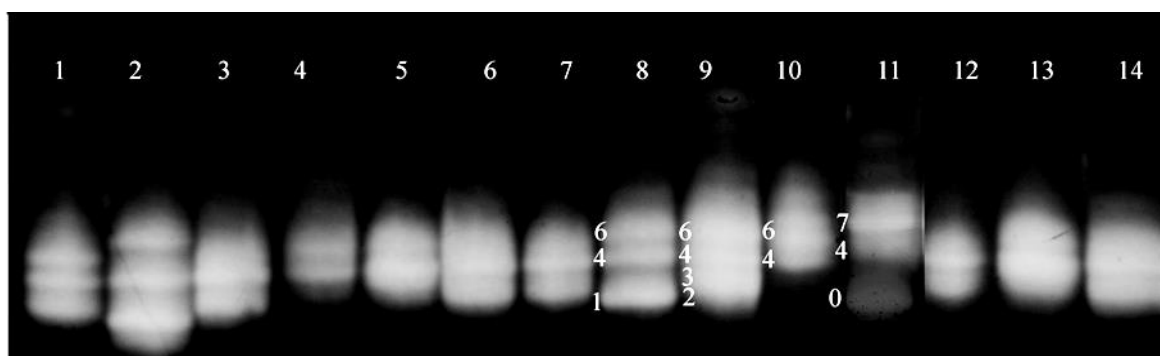


Рис. 5.1. Електрофоретичний спектр ізоферментів бета-амілази сорту Аврора, геномно-заміщених форм та інтрогресивних ліній м'якої пшениці. 1-7, 12-14 - інтрогресивні лінії, 8 – Аврозис, 9 – Аврора, 10 – Авролата, 11 – Авродес.

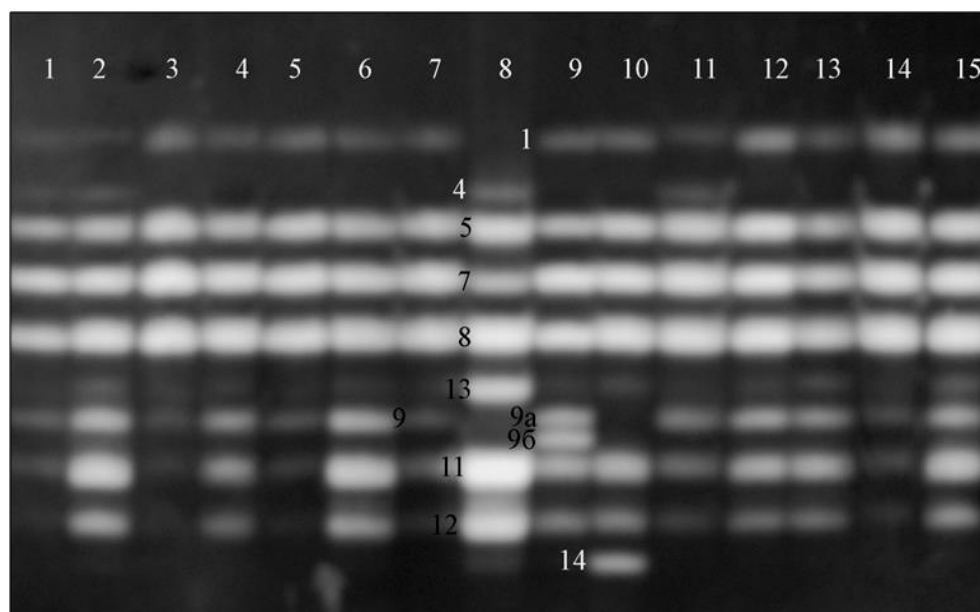


Рис. 5.2. Електрофоретичні спектри альфа-амілази. 1-7, 9-10, 12-15 – інтрогресивні лінії на основ сорту Аврора, 11 – Аврора, 8 – Авролата.

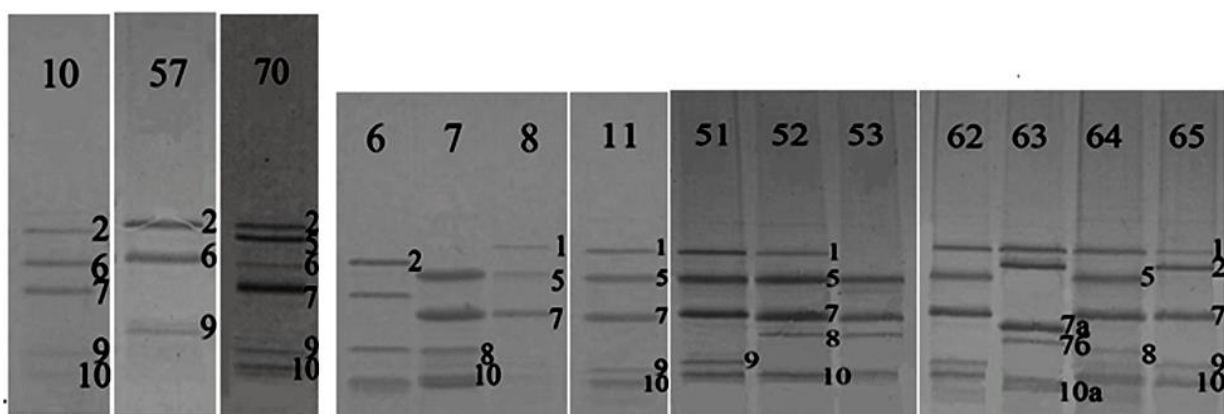


Рис. 5.3. Електрофоретичні спектри глютенінів: зверху – номери ліній; на спектрах позначені номери компонентів.

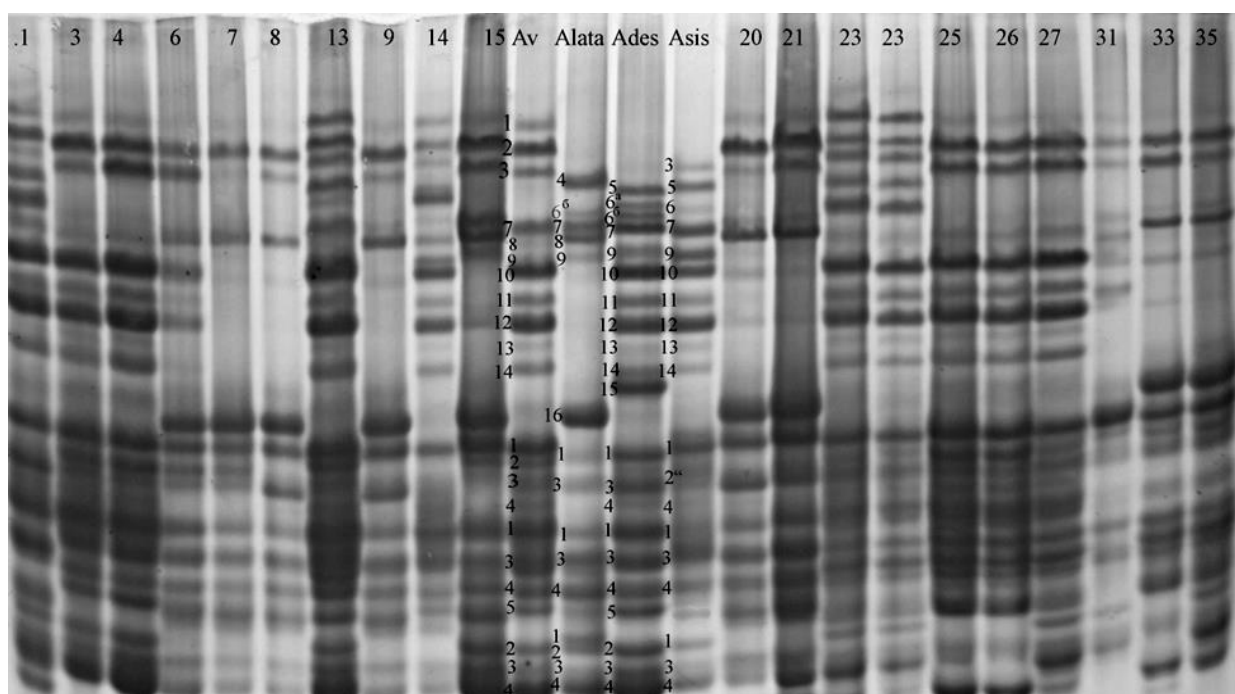


Рис. 5.4. Електрофоретичний спектр гліадинів інтрогресивних ліній із вказаними номерами та батьківських форм: Av – Аврора, Alata – Авролата, Ades – Авродес, Asis – Аврозис. Номерами показані компоненти спектру.

Електрофоретичні спектри ізоферментів бета-амілази більшості досліджуваних ліній демонстрували ідентичність відповідному спектру сорту Аврора. У 22 із 79 проаналізованих ліній – похідних Авролати спектри відрізнялися від відповідного спектру сорту Аврора. У них спостерігали такі характерні особливості розділення ізоферментів:

електрофоретичні спектри 12 ліній не містили 2 та 3 компонентів (рис. 5.1, 5), при цьому в 11 із цих зразків з'являвся непритаманний батьківським формам компонент, позначений як 3а, що має трохи нижчу електрофоретичну рухливість, ніж компонент 3 спектру сорту Аврора;

спектри ізоферментів 10 ліній показали відсутність 6 компоненту (рис. 5.1, 2), при цьому у 7 з них візуалізували компонент, непритаманний батьківським формам, позначений як 5, що знаходиться між компонентами 4 та 6 спектру сорту Аврора;

Серед похідних Авродесу спектр бета-амілази відрізняється від спектру Аврори у 10 ліній. З них в трьох з'явився компонент 7.

Електрофоретичні спектри альфа-амілази відрізнялись від такого у Аврори для більшості ліній – похідних Авролати. Із 42 проаналізованих ліній, що походять від Авролати, 26 мали в спектрі альфа-амілази компонент (зона активності) 13, який вказує на наявність в них чужинної хромосоми 6U (рис. 5.2) [12]. Поява компоненту 13 не завжди супроводжувалась зникненням компоненту 1, як має бути при заміщенні 6D хромосоми на 6U. Тому у цьому випадку припускаємо наявність транслокації між хромосомами пшениці та егілопсу, перенесення лише фрагменту чужинної хромосоми із цим алелем. Спектр деяких ліній, що походять від Авролати, містив зону активності 2, при цьому майже у всіх цих ліній зникала зона 1. Таку картину можна спостерігати при заміщенні хромосоми 6D на хромосому чужинного походження. Проте у нашому випадку ми не можемо ідентифікувати гомеологічну належність чужинної хромосоми, адже компонент 2 не візуалізується у спектрі Авролати. Як вже було зазначено, в спектрі ліній інколи не виявлялись компоненти 1 або 4, що притаманні Аврорі, при цьому вони не щезали одночасно, майже завжди був наявний той чи інший компонент. Якби зерно було надто пророщене, в результаті чого у спектрі зникає верхня частина “malt”-зони, то у “malt”-зоні не виявлявся би жоден із компонентів. Отже, відсутність певних зон активності може засвідчувати відсутність принаймні відповідних фрагментів хромосом сорту Аврора

внаслідок делецій або заміщення хромосомами егілопсу. В “green”-зоні практично всі лінії мали продукти генів, розташованих на 7D та 7A хромосомах (компоненти спектру 9 та 11), проте деякі лінії не містили в своєму спектрі компоненту 12, що є продуктом гену на 7B хромосомі. Заслуговує на увагу поява непритаманних батьківським формам компонентів, наприклад, 9a та 9b, 10 (див. рис. 5.2), походження та хромосомна належність яких не встановлена.

Серед 10 ліній, що походять від Авродесу, лише чотири містили у спектрі компонент 4, ген якого розташований на хромосомі 6A, із них дві лінії мали компонент 1 – продукт гену хромосоми 6D. Тому відсутність верхньої частини “malt”-зони у похідних Авродесу пояснюється скоріш за все надто пізньою стадією проростання зерна. Три лінії, в тому числі й ті, що мали компоненти 1 та 4, містили в спектрі компонент 2 – властивий Авродесу Ці зразки ми оцінювали як лінії з хромосомою 6S. Деякі спектри містили зовсім неочікувані компоненти – 3, 13 та 10, які не характерні для батьківських форм цих ліній. Лише одна лінія не мала компоненту 9, що є продуктом 7D хромосоми (рис. 5.2).

З 16 ліній, що походять від Аврозису, проросло лише 9. Жодна з них не виявила в спектрі притаманних цій геномно-заміщеній формі компонентів. Верхня частина “malt”-зони (компоненти 1, 4) візуалізувалась лише в 5 з них: в спектрі чотирьох ліній був компонент 1 (6D хромосома), в спектрі лише однієї лінії спостерігали компонент 4 (6A хромосома). Відсутність 4 компоненту на спектрі ліній із вираженою “malt”-зоною, можна вважати результатом втрати алелю, розташованого на хромосомі 6A. В “green” зоні спектру дві лінії не мали компонентів, що є продуктами 7A та 7B хромосом (11, 12 компоненти, відповідно), одна лінія не мала лише 12 компоненту. Наявність чужинного фрагменту 6S^{sh} чи заміщення 6D хромосоми не розглядали, зважаючи на відсутність маркерного компоненту 3, у ліній – похідних Аврозису.

Важливим є те, що на спектрі геномно-заміщених форм, бачимо різницю в інтенсивності та дифузності компонентів однакової рухливості, у порівнянні із компонентами спектру сорту Аврора. Для прикладу, компоненти 4 та 6 на спектрі Аврозису вирізняються високою інтенсивністю прояву, а 3 та 5 компоненти більш мажорні, четвертий компонент дуже важко ідентифікувати на спектрі Аврори та Авролати. Скоріш за все, таке явище обумовлене накладанням пшеничних та чужинних смуг. Проте таку специфіку ми не враховуємо, через велику ймовірність неадекватної оцінки. Тому при аналізі похідних ліній ми можемо лише констатувати відсутність відповідного хромосомного плеча Аврори у випадку, якщо лінія не має цих зон у своєму спектрі. Інші компоненти спектру перекриваються, і ми не можемо встановити, чи походять вони від Аврори, чи від іншого компоненту схрещування, й інформація щодо присутності чужинного матеріалу в геномі багатьох ліній втрачається.

Із даних, наведених у табл. 4.10, 4.11 та 5.2, 5.3, здається очевидним, що для генів запасних білків поява генотипів з новими, проти батьківських, спектрами (відсутність компонентів або поява нових) спостерігається частіше, ніж для генів альфа- та бета-амілази, естерази, пероксидази. Ми не робили статистичної перевірки такої різниці через те, що бачимо забагато факторів, які могли б впливати на таку різницю: лінії, що досліджувались, є різними, спектри різних білків дуже різні за кількістю компонентів, вони також різні за рівнем поліморфізму. Тому навряд чи просте порівняння відсотків змінених спектрів дасть нам певну інформацію для формулювання гіпотези про те, яким чином відбуваються ті зміни генотипу в інтрогресивних лініях, про котрі свідчать змінені електрофоретичні спектри. Проте сумніву, що питання має бути досліджено на придатному для цього матеріалі, в нас не виникло.

5.3. Вивчення мінливості гліадинових спектрів

5.3.1. Результати вивчення гліадинових спектрів інтрогресивних ліній різних генерацій. Оскільки всі геномно-заміщені форми отримано шляхом об'єднання тетраплоїдного компоненту AABV геному Аврори з диплоїдним геномом одного з видів егілопсу, *Aegilops speltoides*, *Aegilops sharonensis* та *Aegilops umbellulata*, електрофоретичні спектри Авродесу, Авролати та Аврозису мають складатися з компонентів, які контролюються генами хромосом 1A, 1B, 6A, 6B 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 [16], що пояснюється їхнім походженням від ініціального схрещування AABVDD x AABVXX, де X – геном егілопса [37]. 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'являються компоненти чужинного походження, притаманні спектру відповідного егілопса. У підрозділах 4.3 та 5.2 було показано, що електрофоретичні спектри запасних білків зовсім 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 (табл. 5.2, 5.3). У даному підрозділі наведено результати систематичного вивчення гліадинових спектрів інтрогресивних ліній «ges», вирощених спеціально для цього в одному році, 2009, із насіння, отриманого у різні роки, яке репрезентує різні генерації однієї і тієї самої лінії. Тобто різні генерації однієї і тієї самої лінії означають, що лінію у 2009 році було вирощено кількома рядками, кожен з яких висівався насінням цієї лінії, отриманим в 2002, 2004,

2007 та 2008 роках. Запис, наприклад, генерація res34 п07 407-п09 527-28 означає, що лінію res34 у 2009 році було вирощено у польових рядках № 527-28 з насіння, отриманого від лінії res34, вирощеної у 2007 році у рядку 407.

За електрофоретичними спектрами гліадинів було вивчено 19 ліній – похідних Авродесу, 12 ліній, похідних Аврозису та 18 ліній, похідних Авролати. Для вивчення було відібрано лінії, що демонстрували нестабільність за ознаками морфології, описану у підрозділі 5.1. Кількість генерацій для кожної лінії варіювала від двох до чотирьох з кількома випадками, коли вивчалась лише одна генерація. Кожна рослина генерації була представлена чотирма зернівками.

Порівнюючи спектри інтрогресивних ліній, послідовно відповідали на такі питання: 1) чи характеризується лінія внутрішньогенераційною мінливістю (рис. 5.5, 5.6); 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 (рис. 5.7, 5.8, а), чи у наявності нові компоненти незрозумілого походження (рис. 5.8).

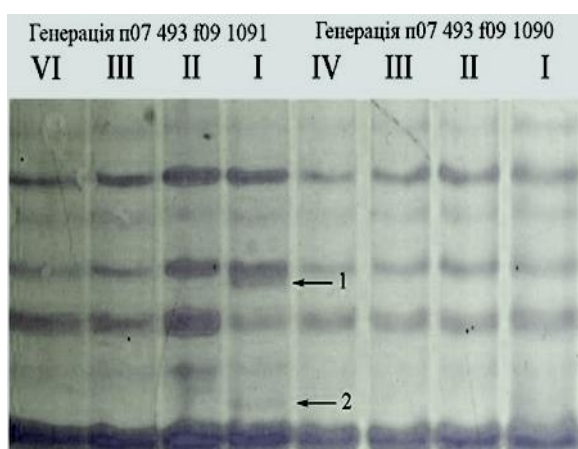
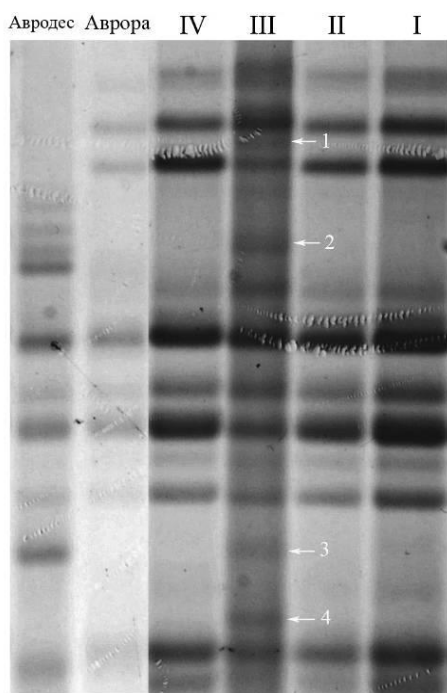
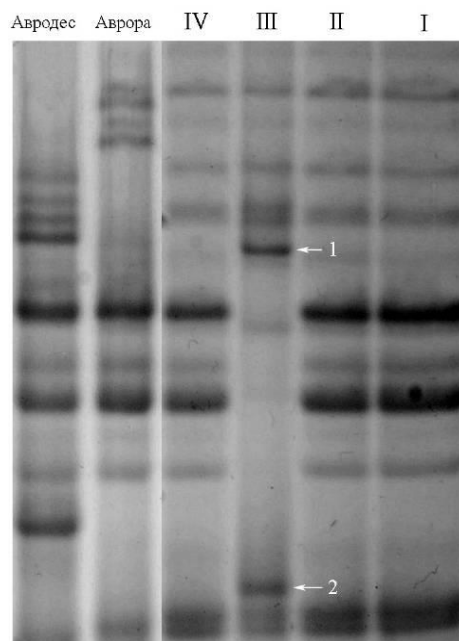


Рис. 5.5. Внутрішньогенераційна мінливість лінії res 217. Електрофоретичні спектри ω -зони гліадинів чотирьох зернівок однієї генерації. Стрілками позначено компоненти, за якими відрізняються спектри.



а)



б)

Рис. 5.6. Электрофоретичні спектри γ - та ω - зон гліадинів чотирьох зернівок (I–IV) лінії res 2, генерація п08 501 п09 386 (а) та лінії res 13, генерація п07 388/1 п09 428/2 (б). Стрілками вказано компоненти, за якими відрізняються спектри різних зернівок однієї і тієї ж самої генерації.

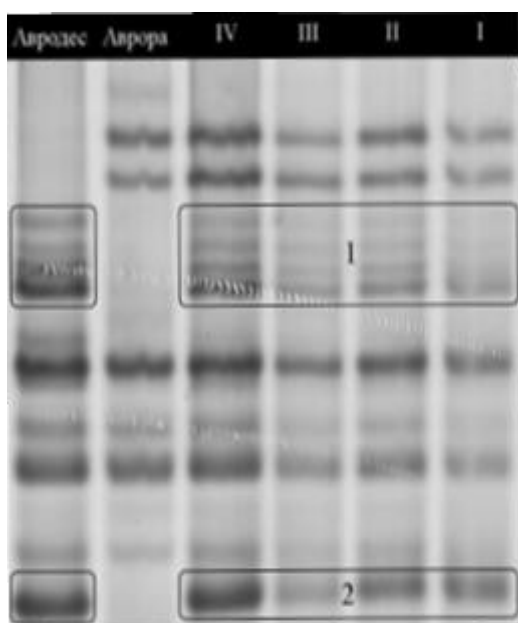


Рис. 5.7. Электрофоретичні спектри ω -зони гліадинів різних зернівок (I–IV) генерації п07 403 п09 510 лінії res 32-1. 1 – блок компонентів та 2 – компонент, що походять від Авродесу.

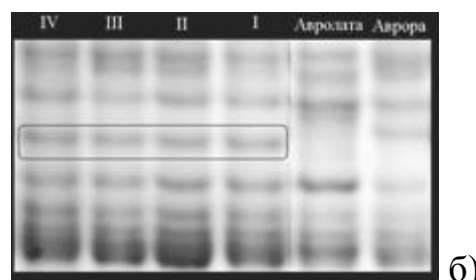
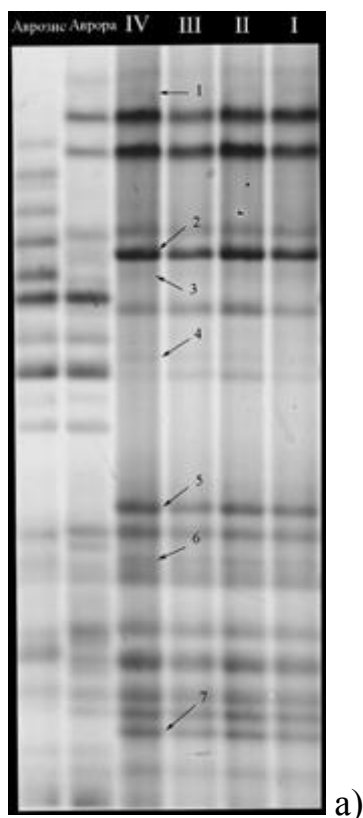


Рис. 5.8. Електрофоретичні спектри: а) – ω -, γ -, β - та α -зон гліадинів різних зернівок (I-IV) генерації п04 2664 п09 877/1 лінії res 139-2, 1, 2, 4, 5, 7 – нові компоненти, 3, 6 — компоненти, що походять від Аврозису); б) – β -зони гліадинів генерацій п04 202 п09 1055 лінії res 202, (прямокутником виділено нові компоненти).

Відсоток нестабільних ліній серед похідних Авродеса, Аврозиса та Авролати склав, відповідно, $68 \pm 10,7$, $33 \pm 13,6$ та $22 \pm 9,8$ (табл. 5.4). За точним критерієм Фішера ($P_{\text{ініц.}} = 0,2$, $P_{\text{заг.}} = 0,676$), похідні Аврозису та Авролати не відрізняються за співвідношенням стабільних та нестабільних ліній. Якщо об'єднати ці дві групи, підвищеною кількістю нестабільних ліній від них відрізняється група похідних Авродесу (за чотирьохпольним критерієм, $\chi^2 = 8,78$ при $\chi^2_{0,01} = 6,63$ для $df = 1$). Маємо такий самий результат, який вже обговорювали у підрозділі 5.1.

19 проаналізованих ліній-похідних Авродесу були представлені у 63 генераціях, 32 генерації ($51 \pm 6,3\%$) мали внутрішньогенераційну мінливість за компонентами гліадинового спектру. З 33 генерацій ліній-похідних Аврозису лише 5 ($15,2 \pm 6,24\%$) мали внутрішньогенераційну мінливість. У Авролати з 34 генерацій 6 ($17,6 \pm 6,54\%$) мали внутрішньогенераційну мінливість за компонентами гліадинового спектру. При порівнянні кількості нестабільних

генерацій групи похідних Аврозиса та Авролати як і раніше не відрізняються одна від одної та кожна з них значуще відрізнялась від групи похідних Авродесу: $\chi^2 = 10,16$ та $8,83$, відповідно, при $\chi^2_{0,05} = 5,92$ при кількості порівнянь 3. Отже, найчастіше внутрішньогенераційна мінливість спостерігалася серед похідних Авродесу. Можливо це пов'язано з наявністю у складі геному Авродеса, що слугував компонентом ініціального схрещування при створенні інтрогресивних ліній, субгенома S від диплоїдного *Aegilops speltoides* з геном-супресором *Ph1*-системи, що наявний у хромосомі 5В Аврори. Субгеном S може виступати промотором гомеологічної кон'югації, і підвищену мінливість усередині ліній можна пояснити як рекомбінаційну [239].

Таблиця 5.4

Стабільність інтрогресивних ліній за спектром гліадинів

Характеристика лінії	Лінії res, що пішли 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		

Зі 130 проаналізованих генерацій ліній – похідних Авродесу, Аврозису та Авролати тих, що повністю повторювали спектр Аврори, виявилось лише 8: res13 п07 388/2- п09 429; res 34 п07 407- п09 527-28; res 102 п08 102-п09 736; res 114 од02- п09 791; res 114-п04 101 п09 782; res 114 п07 450-п09 783; res 177 п07 475-п09 991 та res 177 п08 1779-п09 992. 122 генерації мали у гліадиновому спектрі своїх зернівок компоненти, які відрізняються від компонентів спектру Аврори.

Лінії, різні генерації яких вивчаються у нашій роботі, було створено як 42-хромосомні, цитологічно стабільні нащадки від схрещувань геномно-заміщених амфідиплоїдів з генотипом Аврора. Лінії було визнано як такі, що мають деякі обсяги інтрогресивного хроматину, за результатами досліджень із застосуванням біохімічних хромосомних маркерів та вивчення мейозу у рослин F_1 між лінією та генотипом Аврора [11,16,33,35,62,54,55,812]. Як 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. Ми не спостерігали жодного поліморфізму гліадинових компонентів усередині лінії. Якщо констатовувалася 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 [16]. На той період лінії можна було б характеризувати як знову створені, «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 [37]. У період з 1990 по 2008 рік лінії пройшли як мінімум 15 генерацій у польових умовах під ізоляторами, проте ми не контролювали їхню цитологічну стабільність.

За кілька років (генерацій) після завершення роботи з ідентифікації чужинного хроматину у інтрогресивних ліній стало очевидно, що частина з них характеризується перманентною мінливістю за ознаками колосу (див. підрозділ 5.1), за якими ми маємо можливість спостерігати, тобто такими, що характеризуються різними градаціями у Аврорі та геномно-заміщеної форми. Крім того, скринуючи вибірки ліній, об'єднаних за певною ознакою (остистість колосу, підрозділ 4.3.2, стійкість до борошнистої роси, підрозділ 4.3.3) 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 (розділ 3). 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 відбуваються якісь процеси, що про їхні механізми ще слід дізнаватися, які є джерелом генетичної мінливості в межах інтрогресивного геному, 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 тієї частини такої мінливості, яка відбувається з гліадиновими генами.

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. Так, на α -зону, у середньому, припадає від трьох до п'яти компонентів [10]. Для того, щоб конструктивно обговорювати наші результати, які свідчать про аномально високу мінливість усередині гліадинових спектрів ліній, потрібно навести інформацію про структуру гліадинових генів, яка наявна у сучасній літературі.

5.3.2. Молекулярна структура гліадинових генів за даними літератури. Гліадини є спирторозчинною фракцією клейковини зерна пшениці та представлені мономерними білками [309,762]. 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 [98,762]. 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 [95,304,761,786]. Вважають, що локус *Gli-2* утворився дуже давно як

міжхромосомна транслокація генів гама-гліадинів з 1-ї гомеогрупи хромосом до 6-ї гомеогрупи [354,762]. Сукупність електрофоретичних компонентів, що кодуються генами одного кластера, називається блоком.

Гени локусів *Gli* характеризуються певною структурою, яка може бути залучена для пояснення як великої кількості генів у кластерах, так і того, що серед них переважають псевдогени. Гліадинові гени кодують запасні білки, надзвичайно збагачені на залишки амінокислот пролін та глутамін, чим пояснюється їхня висока цінність як запасних білків, придатних для розвитку зародка зернівки [98,762]. До складу генів, що кодують гліадини, входить повторювальний домен, консенсусна послідовність якого подібна у різних генів та містить велику кількість тринуклеотидів, що кодують глутамін, САА. Це послідовність, що кодує Pro-(Phe/Tyr)-Pro-Gln-Gln-Gln-(Gln)(Gln) в генах α -зони. Довжина саме цього домену зумовлює різницю в молекулярній масі α -гліадинів від 30 до 34 кДа [97]. Хоча існує припущення, що довжина поліглутамінових доменів 1 та 2 (рис. 5.9 а) також може впливати на масу білка [94]. Повтори САА, що кодують глутамін, відомі як елементи мікросетелітних локусів. Послідовність, що кодує Pro-Phe-Pro-Gln-Gln-(Gln)-Pro-Gln-Gln-(Pro-Gln-Gln), є консенсусною у повторювальному домені генів γ -гліадинів. Довжина цього домену впливає на масу поліпептидів: 26,000–36,000 Да [94,97]. Поліглутамінова ділянка є також у домені IV (рис. 5.9, б), і він також характеризується високою варіабельністю. Кодони всіх не глутамінових амінокислотних залишків в четвертому домені відрізняються від кодонів глутаміну лише на один нуклеотид. Ймовірно, вони утворилися за рахунок одонуклеотидних транзицій в кодонах, що відповідають глутаміну [95]. Консенсусна послідовність повторювального домена ω -гліадинів — Pro-Phe-Pro-Gln-(Gln)-(Gln)-Pro-Gln-(Gln)-(Gln)-(Gln), дуже схожа на таку в γ -гліадинових генах [96,98].

Наявність у складі гена повторів таких нуклеотидів підвищує їхню поліморфність, яка може виникати за двома механізмами: через помилки при рекомбіногенезі, які спричиняються численними повторами, та через відомий

механізм утворення нових алелів мікросателітних локусів при проковзуванні полімерази при реплікації ДНК [94,95]. В обох випадках це забезпечує загальновідомий [786] поліморфізм кластерів, у які зібрані численні гени різних гліадинів. З іншого боку, висока подібність повторювальних послідовностей генів γ та ω гліадинів дає всі підстави вважати, що повторювальні консенсусні домени є основою того першого гену, чия ампліфікація, створила кластери гліадинових генів, у середині яких рекомбінація за звичайних умов відбувається рідко [469]. За нашими даними, мінливістю характеризуються саме кластери генів, що свідчить про активізацію у гібридному геномі інтрогресивних ліній якихось механізмів, які ініціюють внутрішньокластерну мінливість за одним з двох вказаних механізмів.

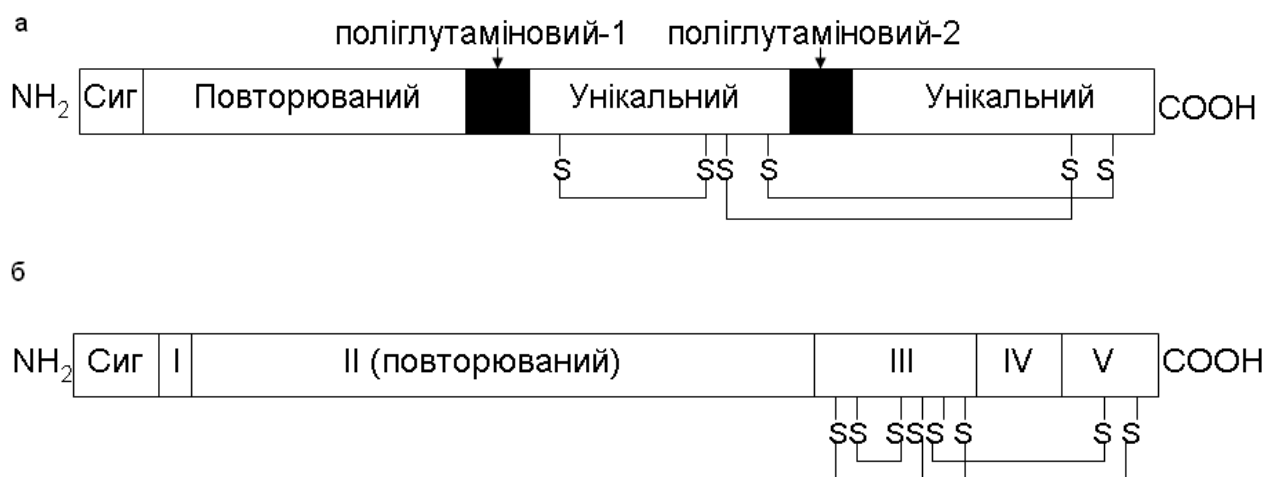


Рис. 5.9. а) Структура білку α -гліадину [94]. б) Структура білку γ -гліадину [95,685]. S – цистеїнові залишки, Сиг – двадцятизалишковий сигнальний пептид. I – короткий N-термінальний домен. II – високоваріабельний повторюваний домен. III – домен, що не повторюється та містить більшість цистеїнових залишків. IV – багатий на глутамінові залишки домен. V – C-термінальний домен, що містить останні два консервативні цистеїнові залишки.

На сьогодні встановлено, що до складу гліадинових кластерів входить дуже багато генів. Наприклад, геном пшениці містить приблизно 150 генів α -гліадинів, проте білкових продуктів цих генів на сьогодні ідентифіковано лише 16 [94,96]. Справді, інші гліадини мають значно менше генів у своїх кластерах.

γ- та ω-гліадини містять, відповідно, 16-39 та 15-18 копій [304]. Це пов'язано з тим, що велика родина генів α-гліадинів складається переважно з псевдогенів. Псевдогени або містять щонайменше один стоп-кодон у своїй нуклеотидній послідовності, або позбавлені 3'UTR послідовності, що забезпечують поліаденілювання мРНК білку [94,469]. Дослідження сиквенсів α-гліадинів показали, що переважна кількість стоп-кодонів утворюється в межах поліглютамінових ділянок, які кодуються кодонами САА та САG. Вони стають стоп-кодонами при С – Т транзиції [94,881]. Крім того, ДНК-полімераза може спричинити однуклеотидні помилки у послідовності мікросателітів [881,323]. Мутагенна активність поліглютамінових сайтів підвищується також через нерівний кросинговер та проковзування полімерази при реплікації ДНК, що є характерним для мікросателітних повторів [443].

Гени кластерів *Gli* різних субгеномів пшениці демонструють високу подібність у своїй структурі. Виходить, що гени можуть мутувати тільки у межах кількості повторів, що кодують глютамінові залишки, але не в інших деталях своєї будови. Що ж до міжгенних проміжків, то для них показана значна різниця для хромосом різних субгеномів. Крім того, показано, що ці проміжки надзвичайно насичені транспозонами, які можуть сприяти підвищенню внутрішньогеномної мінливості, якщо переходять до активного стану [327]. Причиною активації транспозонів може стати інтрогресивна природа генома ліній, які ми вивчаємо та які демонструють відсутність стабільності електрофоретичних спектрів за продуктами гліадинових генів.

Міжгенні ділянки, розташовані між окремими генами, що складають кластер гліадинових генів, утворені із повторів [304], містять ретроелементи та не є колінеарними в різних субгеномах м'якої пшениці. Це примушує припустити, що активність ретроелементів мала місце вже після диференціації геномів видів, прабатьків субгеномів м'якої пшениці [326]. Для субгеному А показано, що ретротранспозони з родин *Sabrina*, *Fatima* та *Wis* складають до 70% послідовностей гліадинових кластерів [327]. Вивчення структури гліадинових кластерів дало змогу припустити, що зростання кількості генів

усередині кластера є наслідком нерівного кросинговера між гомологічними хромосомами, гетерозиготними за певним гліадиновим кластером (рис. 5.10) [304]. З рисунку добре видно, що майже однаковість повторів D є матеріальною основою нерівного кросинговера, який обов'язково буде призводити до зростання кількості гліадинових генів усередині кластера, якщо тільки проти цього збільшення не діє якийсь добір.

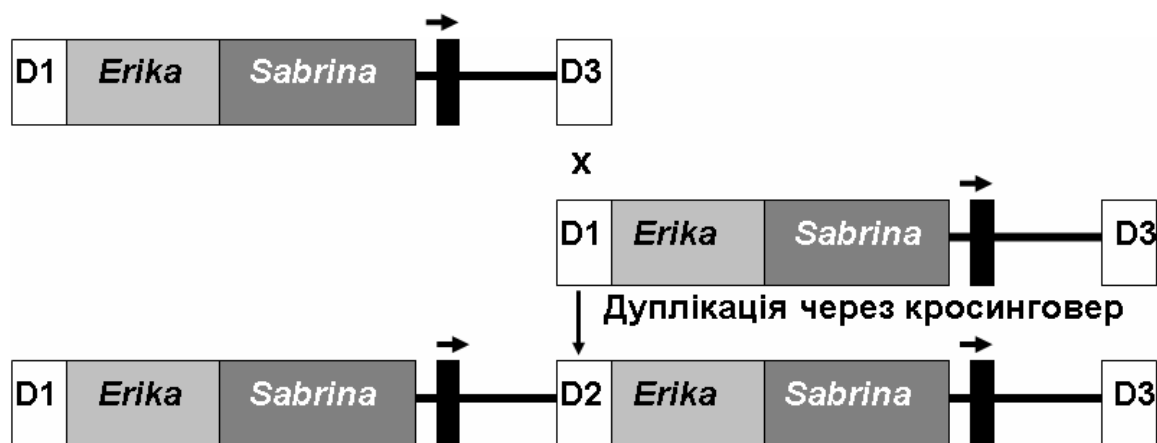


Рис. 5.10. Модель дуплікації регіону кластера γ -гліадинового гена шляхом нерівного кросинговеру [304]. D1, D2 та D3 – повтори з 95% схожості за нуклеотидною послідовністю. Чорний прямокутник – ген γ -гліадину (стрілкою вказано напрямок транскрипції). *Erika* та *Sabrina* – LTR-ретротранспозони.

Завдяки отриманій у останні кілька років інформації про структуру кластерів гліадинових генів стають зрозумілими одразу кілька прикмет, якими ці гени характеризуються на рівні їхнього генотипного прояву. По-перше, стає зрозумілим механізм виникнення великої кількості генів усередині кластера. По-друге, очевидною стає консервативність гліадинових кластерів, адже рекомбінування між окремими складовими частинами кластерів з утворенням продуктів, які будуть ідентифікуватися як батьківські та небатьківські, ускладнене через малу відстань між генами та наявністю повторів між ним. Наявність повторів призводить до нерівного кросинговера, нерівний кросинговер не дає можливості ідентифікувати серед нащадків рекомбінантні та нерекомбінантні сполучення генів кластера. По-третє, наявність у складі гліадинових генів глутамінових повторів перетворює сайти накопичення таких повторів на мутагенні ділянки через транзиції С—Т (утворення псевдогенів

через формування стоп-кодонів) та ампліфікацію тринуклеотидів, яка в гені, що транслюється, призводить до утворення білка з іншою молекулярною масою. По-четверте, насиченість міжгенних просторів гліадинових кластерів ретротранспозонами відкриває можливість до утворення додаткових копій гліадинових генів усередині кластера за рахунок рекомбінації, мутації, кросинговеру, а отже – до створення нових алелів кластера, яких не було в батьківській рослині.

Спираючись на характеристики молекулярної структури гліадинових кластерів, появу компонентів спектру, які за рухливістю відрізняються від компонентів прабатьківських геномів, можна пояснити геномними перебудовами, які супроводжували процес створення інтрогресивних ліній. Ми не вважаємо, що саме геномні перебудови дають нові алелі гліадинових генів. Проте можна припустити, що у нестабільному геномі гібридного походження у міжгенному просторі гліадинових кластерів активуються ретротранспозони, в тому числі згадані нами, і це може призводити до мутацій. [327]. В свою чергу, активація ретроелементів може призводити до нерівного кросинговеру, що проявляється, власне, у збільшенні копій самих ретротранспозонів та, певною мірою, генів, між якими вони знаходяться. Однак збільшення копій без зміни структури вкрай важко ідентифікувати на електрофореграмах, оскільки маса білку залишається сталою, змінюється (якщо змінюється) лише кількість самого білку. Здатність гліадинових генів ставати гарячими точками мутагенезу та рекомбіногенезу легко пояснюється особливостями їхньої структури. Ймовірно саме ретротранспозони та наявність повторюваних мотивів у генах гліадинів можуть слугувати джерелом нових алелів при реплікації, рекомбінації та мутагенезі. Більше того, через велику ймовірність проковзування полімерази саме на повторюваних ділянках ДНК, зокрема на ділянках, що містять мікросателіти, можливе варіювання продуктів генів гліадинів за молекулярною масою, що відображається на електрофоретичному спектрі у вигляді нових компонентів [97,443].

Для того, щоб з'ясувати, чи дійсно відбуваються зміни у молекулярній структурі гліадинових генів в досліджуваних рослинах, був проведений мікросателітний аналіз генів з застосуванням внутрішньогенних праймерів.

5.3.3. Порівняння спектрів ампліфікації мікросателітних компонентів гліадинових генів інтрогресивних ліній. За мікросателітними локусами, локалізованими у фрагментах різних гліадинових генів, скринували 19 інтрогресивних ліній, похідних Авродесу, представлених у 49-ти генераціях. Мали за мету перевірити, чи варіюють генні мікросателіти цих генів за довжиною серед різних рослин усередині досліджуваних ліній. Якщо так, таке варіювання могло б слугувати для пояснення мінливості гліадинових генів серед інтрогресивних ліній. Наявність таких змін у довжині мікросателітних ділянок ідентифікували за різницею у швидкості руху компонентів при електрофорезі ДНК у гелі: компоненти, що демонстрували меншу рухливість у агарозному гелі, свідчили про збільшення розміру амплікону, а отже про збільшення розміру мікросателіту. Водночас, компоненти, що демонстрували більшу рухливість, свідчили, відповідно, про менший розмір повтору мікросателіту від очікуваного.

До мікросателітних ділянок п'яти гліадинових генів (по одному для β -, γ - та ω -омега гліадинів та два для α - гліадинів) були підібрані та синтезовані 9 пар праймерів (табл. 5.5). Для чотирьох генів з п'яти підбирали дві пари праймерів до певної мікросателітної ділянки, за допомогою різних програм. Це було зроблено для збільшення шансів ампліфікації цільової (target) ділянки: за умови коли одна пара праймерів не забезпечує ефективної ампліфікації або буде демонструвати компоненти низької якості, її можна замінити іншою парою, що її було розроблено з використанням іншого програмного забезпечення.

Реакція ампліфікації з використанням праймерів wggm-P3-a1-L/R, що є специфічними до поліглутамінового повтору α -гліадину AJ133604.1, продукувала на електрофоретичному спектрі від 2 до 3 компонентів. Розмір більшості компонентів був очікуваний, 164 п.н. Однак у спектрі ампліконів

зернівки 2 генерації res32-1 f07 403-f09 510 з'явився новий компонент з розміром 230 п.н. (рис. 5.11).

Таблиця 5.5

**Праймери, підібрані до мікросателітних п
овторів гліадинових генів (послідовності праймерів див. додаток 1)**

Ген	Артикул	Пара праймерів	Використана програма
α -гліадин	DQ140351.1	wggm-P3-a2-L/R	Primer-3
α -гліадин	AJ133604.1	wggm-P3-a1-L/R	Primer-3
		wggm-N-a1-L/R	Primer-BLAST
β -гліадин	AF419254.1	wggm-P3-b1-L/R	Primer-3
		wggm-N-b1-L/R	Primer-BLAST
γ -гліадин	AJ389689.1	wggm-P3-g1-L/R	Primer-3
		wggm-N-g1-L/R	Primer-BLAST
ω -гліадин	DQ861428.1	wggm-P3-o1-L/R	Primer-3
		wggm-N-o1-L/R	Primer-BLAST

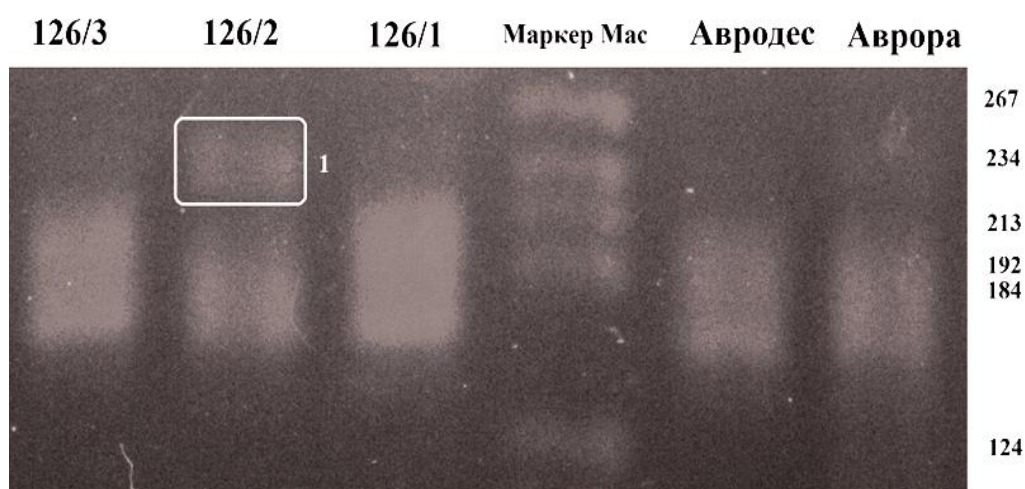


Рис. 5.11. Електрофоретичний спектр продуктів ампліфікації з праймерами wggm-P3-a1-L/R. 126 – генерація res32-1 f07 403-f09 510. 1 – додатковий компонент. Маркер: pBR 322+ BsuR1

Наявність нових компонентів було виявлено при аналізі мікросателітного повтору гену ω -гліадину DQ861428.1 з використанням праймерів wggm-N-o1-L/R. У спектрі ампліконів однієї зернівки генерацій res7 f04 5-f09 409 був

компонент, важчий від інших компонентів, отриманих з використанням вказаного праймера, 220 п.н. В зернівках цієї ж лінії двох інших генерацій, res7 f07 385-f09 410/2 та res7f08 492 f09 411/1, з'явився компонент масою 230 п.н. (рис. 5.12). Крім того, компонент масою 220 п.н. виявився у спектрі тієї самої зернівки генерації res32-1 f07 403-f09 510, в якій був нетиповий спектр з праймерами до повтору α -гліадину AJ133604.1. Одна з зернівок лінії res 12 мала додатковий компонент з розміром близько 300 нуклеотидів. Більш важкий додатковий компонент спектру було знайдено також у спектрах ліній res 39, res 67, res 70 різних генерацій.

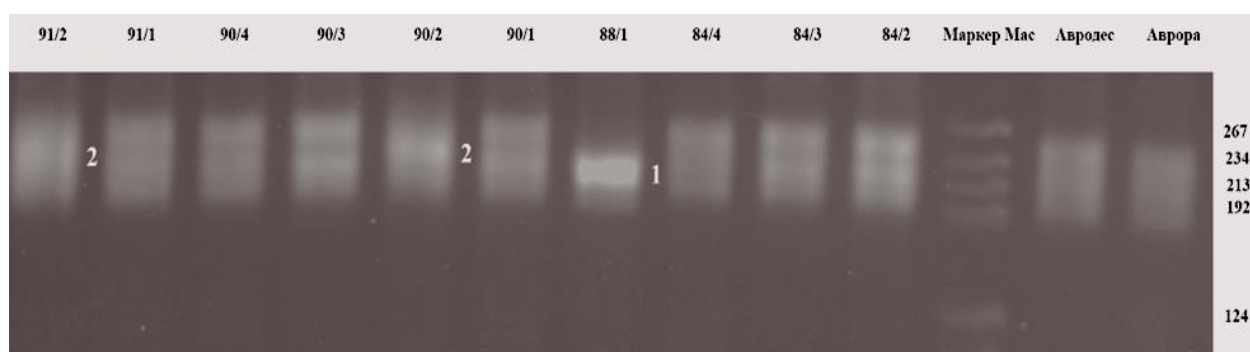


Рис. 5.12. Електрофоретичний спектр продуктів ампліфікації з парою праймерів wggm-N-o1-L/R. 84 – res2 f08 1618-f09 387, 88 – res7 f04 5-f09 409, 90 – res7 f07 385-f09 410/2, 91 – res7 f08 492-f09 411/1. 1 та 2 — компоненти, що відрізнялися за масою від очікуваного продукту. Маркер: pBR 322+ BsuR1

Використання пари праймерів P3-b1-L/R, специфічних до поліглютамінового регіону гену β -гліадину AF419254.1, також виявило поліморфізм компонентів ПЛР спектру. Спектри усіх зернівок можна поділити на два типи: ті, що у своєму спектрі мали два компоненти, та ті, що мали один. Така відмінність у спектрі очевидно вказує на перебудови, що відбулися у поліглютамінових регіонах β -гліадину AF419254.1.

Неефективним виявилось вивчення мікросателітного повтору гену γ -гліадину AJ389689.1. Не всі лінії мали продукти ампліфікації у спектрі та спостерігалась внутрішньолінійна мінливість. Можливо у гені AJ389689 відбулась делеція чи ще якась перебудова, що торкнулась мікросателітного

локуса, і ми спостерігаємо серед нащадків наслідки розщеплення за цією аберацією. Використання праймерів wggm-P3-a2-L/R до мікросателітного повтору гену α -гліадину DQ140351.1 також виявилось неефективним, оскільки компоненти були дифузними.

Таким чином, мікросателітний аналіз виявив поліморфізм у спектрі поліглютамінових мікросателітів інтрогресивних ліній м'якої пшениці – похідних Авродесу. Зокрема, праймери wggm-P3-a1-L/R до гена α -гліадину номер AJ133604.1 та праймери wggm-P3-a1-L/R до гена ω -гліадину номер DQ861428.1 продукували нові компонент у спектрі ДНК окремих зернівок в певних генераціях деяких ліній. Маса нових компонентів спектру була на 14–70 п.н. більше за масу очікуваних продуктів. Молекулярну природу змін, які відбулися, було з'ясовано через сиквенс поліморфних фрагментів.

5.3.4. Порівняння сиквенсів фрагментів ДНК, отриманих з поліморфних ампліконів. Для секвенування було відібрано 5 зразків: компоненти спектру розміром 164 п.н. та 230 п.н., отримані в реакції ампліфікації з праймерами P3-a1-L/R мікросателіту α -гліадинового гена AJ133604.1 геному зернівки 2 генерації res32-1 f07 403-f09 510, та компоненти спектру розміром 220, 230, 230 п.н., отримані в реакції ампліфікації з праймером N-o1-R/L мікросателіту ω -гліадину DQ861428.1 геномної ДНК генерацій/зернівок res7/1 f04 5-f09 409, res 7/2 f07 385-f09 410 та res70/1 f07 430-1-f09 644, відповідно. Порівняння сиквенсів проводилося з використанням програмного забезпечення Sequence Alignment Programs [86,190] наступним чином: ділянку ампліфікації, що була очікуваною для даної пари праймерів, порівнювали з послідовністю, отриманою при секвенуванні фрагменту, який відповідав новому компоненту спектру ампліфікації з даною парою праймерів. Таке порівняння показує, які саме зміни відбулися у послідовності, яка дала неочікуваний (новий) компонент ампліфікації.

Компонент 230 п.н. був важчим за масою від очікуваного продукту 164 п.н. приблизно на 70 нуклеотидів, однак сиквенс встановив лише 155 перших нуклеотидів. Загалом ідентичність послідовностей, що порівнювалися,

складала 57,3 % (рис. 5.13). Секвенована послідовність мала 5 делецій від 2-х нуклеотидів до 6-ти і загалом була на 9 нуклеотидів коротша за очікувану. Знайдено дві вставки: перша – з 7-го по 12-й нуклеотиди, друга – з 20-го по 32-й нуклеотид. Встановлено наявність великої кількості точкових мутацій, як транзицій, так і трансверсій. Природу збільшення продукту проти очікуваного не встановлено, можливо, і через те, що продукт секвенований не повністю.

Сиквенс продукту масою 164 н. встановив 134 перших нуклеотиди та показав ідентичність очікуваній послідовності на 56,4 % (рис. 5.14). Отримана послідовність мала три делеції та одну інсерцію з шести нуклеотидів в кінці послідовності. Найбільша делеція в 31 нуклеотиді розташовувалася на початку послідовності. Отримана послідовність мала коротший мікросателітний повтор у порівнянні з очікуваним через одонуклеотидну інсерцію цитозину після 31 нуклеотиду, що розбиває мікросателітну послідовність на дві частини. Встановлено наявність великої кількості транзицій та трансверсій.

```

      10   20   30   40   50
exp. ACAGCCG---CAACCACAGTATTGCGA-ACCACAACAACCAATTTGCGAGCAGCAGC
   ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::
rec. CCACCCAATTTCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCACCACAACAACAAA---CAACA-AAC
      10   20   30   40   50

      60   70   80   90   100  110
exp. AGCAGCAGCAACAACAACAACAACAACAACAATCCTACAACAATTTGCAACAACAAC
   ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::
rec. AACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAAGCAAGAA---CAACAACAAG
      60   70   80   90   100

      120  130  140  150  160
exp. TGATTCCATGCAGGGATGTTGTATTGCAACAACAACAACAATAGCGCATGGAA
   ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::
rec. GGA-CGACGGCGGGGGCCGGCGGGGAAGGAGACGGGGAGGGGGAGG-A
      110  120  130  140  150

```

Рис. 5.13. Послідовності очікувана (exp) та отримана (rec) в реакції ампліфікації ДНК зернівки res32-1/2 f07 403-f09 510 з використанням праймерів P3-a1-L/R. Тут та на рис. 5.14–5.17 цифрами позначено порядковий номер нуклеотидів у даній послідовності.

Послідовність, очікувана у реакції з праймерами N-01-L/R, була завдовжки 206 нуклеотидів (генерація res7/1 f04 5-f09 409), секвенована послідовність мала розмір у 179 нуклеотидів. Ідентичність послідовностей становила 69,9 % (рис. 5.15). Секвенована послідовність мала одну тринуклеотидну інсерцію та одну делецію 29 нуклеотидів довжиною на початку та одонуклеотидну делецію у 45-му положенні. Сайти нагромадження кодонів глутаміну CAA та CAG майже не зазнали змін, а ділянки, що їх оточують, мають велику кількість транзицій та трансверсій (рис. 5.15).

```

      10  20  30  40  50  60
exp. ACAGCCGCAACCACAGTATTGCAACCACAACAACCAATTTGCGCAGCAGCAGCAGCAGCA
   ::
res. GCATC-----AAATTC-CAGCAGCAGCAGCAGCA
      10  20

      70  80  90  100  110
exp. GCA-ACAACAACAACAACAACAACAATCCTACAACAATTTTGCAACAACAACCTG-ATT
   ::
res. GCACACAACAACAACAACAACAACA-----CAACAACCTTCAACAACCTACTACTACATT
      30  40  50  60  70  80

      120  130  140  150  160
exp. CCAATGCAGGGATGTTGTATTGCAACAACACAACATAGCGCATGGAA-----
   ::
res. TGCTGCAAGGGAGTTGTATTGGAAGGGAAGAGCTATTCCAATGGAAAGGAAT
      90  100  110  120  130

```

Рис. 5.14. Послідовності очікувана (exp) та отримана (res) в реакції ампліфікації ДНК зернівки res32-1/2 f07 403-f09 510 з використанням праймерів P3-a1-L/R.

Послідовність розміром 165 п.н. (генерація res7/2 f04 5-f09 409) ідентична очікуваній від праймерів N-01-L/R, 206 п.н., на 67,0 % (рис. 5.16). Секвенована послідовність мала одну тринуклеотидну інсерцію, 7 делецій довжиною від 20-ти нуклеотидів до 1-го. Переважна більшість делецій розташовані на початку та в кінці секвенованої послідовності. Секвенована послідовність має мікросателітну ділянку на 7 CAA повторів довшу у порівнянні з очікуваною. Встановлено також велику кількість одонуклеотидних мутацій у послідовностях, що фланкують сам мікросателіт.

```

      10   20   30   40   50   60
exp. CAGCCACAACCATTTCGACCACAACAACCATATCCACAACCGCAACCACAGTATTCGCAA
  ::      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
rec. CAT-----TCCCCAACCGCA-CCACAGTATTCGCAA
      10   20   30

      70   80   90   100  110  120
exp. CCACAACAACCAATTTACAGCAGCAGCAACAGCAGCAACAACAACAACAACAACAACA
  :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
rec. CCACAACAACCAATTTACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAACAACAACAACAACAACA
      40   50   60   70   80   90

      130  140  150  160  170  180
exp. GAACAACAATCCTTCAACAATTTTGCAACAACAACCTGATTCCATGCATGGATGTTGTA
  :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
rec. CAACAACCTGCTACTTCTTCTGATTCTGCAACTGCTGCTGAGGAGGTGGGTGGATGTTGTA
      100  110  120  130  140  150

      190  200
exp. TTGCAGCAACACAACATAGCGCATGG--
  :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
rec. GTGCAGCACCAAAACATAGGGGGTGGTGG
      160  170

```

Рис. 5.15. Послідовності очікувана (exp) та отримана (rec) в реакції ампліфікації ДНК генерації res7/1 f04 5-f09 409 з використанням праймерів N-01-L/R. Exp.

```

      10   20   30   40   50   60
exp. CAGCCACAACCATTTCGACCACAACAACCATATCCACAACCGCAACCACAGTATTCGCAA
  ::      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
rec. CA-----TTC-----CAGCCGCA-CCACAGTATTCGCAA
      10   20

      70   80   90   100  110  120
exp. CCACAACAACCAATTTACAGCAGCAGCAACAGCAGCAACAACAACAACAACAACAACA
  :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
rec. CCACAACAACCAATTTACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAACAACAACAACAACAACA
      30   40   50   60   70   80

      130  140  150  160  170  180
exp. GAACAACAATCCTTCAACAATTTTGCAACAACAACCTGATTCCATGCATGGATGTTGTA
  :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
rec. CAACAACA--CAACAACA--CAACAACAACAACCTC-TGCAAGTTTGTCTGA
      90   100  110  120  130

      190  200
exp. TTGCAGCAACACAACATAGCGCATGG--
  :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
rec. TTGCATGAATGCAAG-TAGGGTGTGGGAT
      140  150  160

```

Рис. 5.16. Послідовності очікувана (exp) та отримана (rec) в реакції ампліфікації ДНК генерації res7/2 f04 5-f09 409 з використанням праймерів N-01-L/R.

Третій компонент ампліфікації з тими самими праймерами розміром 179 п.н. було отримано з електрофореграми продуктів ампліфікації ДНК зернівки з генерації res70/1 f07 430-f09 644. Ідентичність з очікуваною послідовністю масою 206 п.н. становила 71,8 %. Секвенована послідовність мала одну тринуклеотидну інсерцію в кінці послідовності, як і у попередніх зразках, дві делеції довжиною 11 та 19 нуклеотидів. В районі 60-го нуклеотиду секвенованої послідовності встановлено наявність сайленс мутації: кодон, що кодує глутамін САА, став глутаміновим кодоном САГ. Сайти нагромадження кодонів глутаміну САА та САГ майже не зазнали змін, в той час як ділянки, що їх оточують, мають велику кількість транзицій та трансверсій.

```

      10   20   30   40   50   60
exp. CAGCCACAACCATTTCGACCCACAACAACCCATATCCACAACCGCAACCACAGTATTCGCAA
    ::   :::  ::   ::::::::::::::::::::
rec. CA-----TTCAAC-----ACCGCAACCACAGTATTCGCAA
          10   20   30

      70   80   90  100  110  120
exp. CCACAACAACCAATTTACAGCAGCAGCAACAGCAGCAACAACAACAACAACAACAACA
    :::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::
rec. CCACAACAACCAATTTACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAACAACAACAACAACAACA
      40   50   60   70   80   90

      130  140  150  160  170  180
exp. GAACAACAATCSTTCAACAATTTTGCAACAACAACCTGATTCCATGCATGGATGTTGTA
    :::: : : :::: : : :::: : : :::: : :
rec. CAACAACATACTACTTCATCTGCTTCTGCAACAGCTGCTGAGTAGGGTGGGTGGATGTTGTG
      100  110  120  130  140  150

      190  200
exp. TTGCAGCAACACAACATAGCGCATGG---
    :::: : :::: : : ::
rec. CTGCAGCACCAACAACATAGGGGGTGGTGG
      160  170
      |

```

Рис. 5.17. Послідовності очікувана (exp) та отримана (rec) в реакції ампліфікації ДНК генерація res70/1 f07 430-f09 644 з використанням праймерів N-o1-L/R

Розгляд результатів секвенсу показує, що для всіх секвенованих послідовностей мала місце одна і та сама особливість профілю піків секвенатора: для всіх зразків у ділянках гена, які розташовані між сайтами

гібридизації праймерів та мікросателітною послідовністю, піки ставали слабо вираженими. Так буває у випадках, коли ДНК не характеризується мономорфністю, тобто гомологічні ділянки різних молекул мають певну кількість однонуклеотидних замін, SNP. Це змушує нас припустити, що ампліфікації піддається ДНК не лише того конкретного гена, до якого були підібрані праймери, а й ще інших генів з того самого кластера, адже гліадинові гени в межах кластера характеризуються близькою молекулярною структурою та можуть мати однакові послідовності для зв'язування з праймером. Крім того, кількість нуклеотидів, виявлена сиквенсом, завжди була меншою за таку, що визначали для компоненту ампліфікації, використовуючи маркери молекулярних мас. У всіх випадках не вдавалось встановити останні нуклеотиди фрагменту, що пояснюється особливостям роботи секвенатора. Отже порівняння очікуваних та отриманих послідовностей не є повним.

Сиквенси нетипових послідовностей, отриманих з використанням одної і тієї самої пари праймерів та ДНК різних ліній, порівнювали за допомогою програмного забезпечення Clustal 2.1 (Cluster alignment) [768]. Для пари праймерів P3-a1-L/R це послідовності розміром 134 п.н (Seq- α -1) та 155 п.н. (Seq- α -2) (рис. 5.18). Вони були ідентичними на 63,3 %, тобто виявилися більш подібними одна до одної, ніж кожна з них до очікуваної послідовності для тієї самої пари праймерів. Послідовність у 155 п.н. має значно довшу мікросателітну ділянку у порівнянні з послідовністю 134 н. Отже, формування більш важкого продукту можна пояснити збільшенням кількості повторів у мікросателітному локусі. Коротша послідовність має ще кілька невеликих делецій від одного нуклеотиду до восьми. Є певна кількість однонуклеотидних мутацій, як транзицій, так і трансверсій.

Порівняння послідовностей – результатів сиквенсу продуктів ампліфікації, отриманих з використанням праймерів N-o1-L/R (продукт 179 н. лінії f04 5 f09 409 res 7/1 –Seq- ω -1, продукт 165 н. лінії f07 385 f09 410/2 res 7/2 – Seq- ω -2, продукт 179 н. лінії f07 430 f09 644 res 70/1 –Seq- ω -3) показано на рисунку 5.19. Послідовності Seq- ω -1 та Seq- ω -2 демонстрували ідентичність у

Дані сиквенсу продуктів ампліфікації, отриманих з використанням праймерів P3-a1-L/R та N-o1-L/R, свідчать про значні відмінності у секвенованих послідовностях стосовно до послідовностей очікуваних, що отримані з баз даних сиквенсів. В основі такої відмінності лежить велика кількість делецій та зрідка інсерцій у секвенованих послідовностях, часті випадки однонуклеотидних мутацій, як транзицій так і трансверсій. Подовження САА повторів у секвенованій послідовності встановлено лише у продукті ампліфікації ДНК зернівки res7/2 f04 5-f09 409 з використанням праймерів N-o1-L/R. Таким чином, не можна вважати, що головною причиною поліморфізмів у спектрів ампліконів, отриманих з праймерами до гліадинових генів, є зміни кількості повторів у мікросателітних послідовностях. Той факт, що секвеновані послідовності демонстрували на 10-20 % більшу ідентичність одна до одної, ніж до очікуваної послідовності, пояснюється, на наш погляд, генетичною різницею між сортом Аврора та створеними на її базі інтрогресивними лініями та тим сортом, сиквенс гліадинів якого наведений у базі даних.

5.3.5. Аналіз інтрогресивних ліній з використанням методу REMAP.

REMAP (retrotransposon-microsatellite amplification polymorphism) – метод аналізу структури послідовності ДНК, що ґрунтується на виявленні поліморфізму за розміром ділянки між ретротранспозоном та мікросателітним локусом шляхом її ампліфікації. Таким чином можна засвідчувати переміщення ретротранспозону у геномі рослини. Один з праймерів, що використовується при ампліфікації, є комплементарним до SSR мотиву, другий відповідає LTR-кінцю ретротранспозону [402]. Праймер, що характеризує SSR мотив, є не просто його комплементарною послідовністю, оскільки на кінці він мусить мати якірний нуклеотид, який не буде відповідати мотиву SSR. Цей якірний нуклеотид є гарантом того, що саме цей мікросателітний повтор є ампліфікованим і саме стосовно нього так чи інакше розташований LTR ретротранспозон. Зазвичай цей праймер має вигляд $(NN)_n+Z$, $(NNN)_n+Z$ чи $(NNNN)_n+Z$, де N - це мотив мікросателіту, n - кількість повторів, а Z - якірний

нуклеотид, що є відмінним від мотиву мікросателіту [402]. Метод REMAP набув поширення, оскільки у геномі злакових мікросателіти часто асоційовані з ретротранспозонами [694]. Ампліфікуючи ділянку між консервативною послідовністю ретротранспозона та послідовністю мікросателіта з якірним нуклеотидом, за розмірами ампліконів можна прослідкувати відносне розташування ретротранспозона та мікросателіта. Наявність поліморфізму серед окремих ампліконів вказує на рух транспозону стосовно послідовності обраного мікросателітного локусу. За даними [94], міжгенні ділянки гліадинів багаті на ретротранспозони. Так у міжгенній ділянці α -гліадинів було ідентифіковано 12 ретротранспозонів [94]. Ретротранспозони, як і сателітні ділянки геному, збільшують частоту проходження нерівного кросинговеру [435] і можуть тому ставати джерелом поліморфізму генів, в тому числі гліадинових.

У нашому дослідженні у якості донору консервативної ділянки ретротранспозону було використано послідовність ретротранспозона родини *Sukkula*, оскільки її відносять до родин з найвищою активністю до переміщень по геному [462,549]. У якості праймеру, що буде характеризувати мікросателіт, було взято послідовність $(CT)_9G$. Рисунки 5.20–21 ілюструють деякі отримані результати на прикладі кількох генерацій. Повні дані наведено у таблиці 5.6. Компоненти пронумеровані за молекулярною масою від найважчого 1 до найлегшого 14. Максимальну кількість компонентів у спектрі, 14, дала ДНК Аврори. Компоненти 1, 2, 4, 6, 11 та 12 можна характеризувати як мажорні через їхню інтенсивність у всіх випадках, коли компонент у наявності. Інші компоненти виражені слабше і це ускладнює опис спектрів.

З 19 проаналізованих ліній-похідних Авродесу, які були представлені у 49 генераціях, 34 генерації виявилися мономорфними за спектрами чотирьох зернівок, тобто внутрішньогенераційної мінливості за компонентами спектру, що був отриманий в реакції ампліфікації за методом REMAP з використанням праймерів до консервативної ділянки ретротранспозону *Sukkula* та мікросателітної ділянки $(CT)_9G$, виявлено не було. Звичайно, не можна

Таблиця 5.6

Результати скринування ДНК інтрогресивних ліній з використанням REMAP-технології

Робочі номери зернівок	Назви генерацій	Номери компонентів спектру ¹⁾																
		1	1.1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	10.1	11	12	13	14	14.1
82	od 02 f09 385 res 2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
83	f08 501 f09 386 res 2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
84	f08 1618 f09 387 res 2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
88	f04 5 f09 409 res 7	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
89	f07 385 f09 410/1 res 7	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
90	f07 385 f09 410/2 res 7	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
91/4 ²⁾	f08 492 f09 411/1 res 7	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
92/1	f08 492 f09 411/2 res 7	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
92/2	f08 492 f09 411/2 res 7	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
92/3	f08 492 f09 411/2 res 7	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
92/4	f08 492 f09 411/2 res 7	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
93	od 02 f09 421/1 res 12	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
94/1,4	od 02 f09 421/2 res 12	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
94/2,3	od 02 f09 421/2 res 12	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
95/2	f07 387 f09 423 res 12	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
96/1,3,4	f08 1628 f09 424/1 res12	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
96/2	f08 1628 f09 424/1 res12	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
97	f08 1628 f09 424/2 res12	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
98	f08 1628 f09 425/1 res12	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-

Продовження табл. 5.6

Робочі номери зернівок	Назви генерацій	Номери компонентів спектру ¹⁾																
		1	1.1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	10.1	11	12	13	14	14.1
99	f08 1628 f09 425/2 res12	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
100/1	od 02 f09 426 res 13	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
100/2-4	od 02 f09 426 res 13	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
101/2	f07 388/1 f09 428/1 res 13	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-
102	f07 388/1 f09 428/2 res 13	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
103	f07 388/2 f09 429 res 13	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
104	f08 494 f09 430/1 res 13	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
105	f08 494 f09 430/2 res 13	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
106	f08 494 f09 430/3 res 13	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
107	f07 389/1 f09 437 res 15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
108/1,3,4	f07 389/2 f09 438 res 15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
108/2	f07 389/2 f09 438 res 15	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
1091,3,4	f07 389/3 f09 439 res 15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
109/2	f07 389/3 f09 439 res 15	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
110	f08 495 f09 441 res 15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
111/1,3	f04 f09 444/2 res 16	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
112/1-3	f07 390/1 f09 445 res 16	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
112/4	f07 390/1 f09 445 res 16	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
113/1,3,4	f07 390/2 f09 446 res 16	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
114	f07 390/3 f09 447 res 16	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
115	f08 496 f09 448 res 16	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-

Продовження табл. 5.6

Робочі номери зернівок	Назви генерацій	Номери компонентів спектру ¹⁾																
		1	1.1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	10.1	11	12	13	14	14.1
116/2	f04 17 f09 471/1 res 22	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
117/2	f04 17 f09 471/2 res 22	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
118/1-3	f07 395 f09 472 res 22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
118/4	f07 395 f09 472 res 22	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
119	f08 499 f09 473 res 22	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
120/2	f04 26 f09 506 res 31	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
120/4	f04 26 f09 506 res 31	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
121/2,3	f07 402 f09 507-08 res 31	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
126	f07 403 f09 510 res 32-1	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
127/2	f07 405 f09 517 res 33-1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
128	f08 525 f09 517 res 33-1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
129	f07 407 f09 527-28 res 34	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
130	od2 f09 539 res 39	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
131	f07 409 f09 542 res 39	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
132/2,3	f08 1655 f09 543 res 39	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
133	od2 f09 656 res 45	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
134/2	od2 f09 656 res 45	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
135	f07 415 f09 576 res 51	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
136	o2 f09 583 res 53	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
137	f07 417 f09 584/1 res 53	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
138	f07 417 f09 584/2 res 53	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-

Продовження табл. 5.6

Робочі номери зернівок	Назви генерацій	Номери компонентів спектру ¹⁾																
		1	1.1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	10.1	11	12	13	14	14.1
139	f08 1667 f09 586/1 res 53	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
140	f08 1667 f09 586/2 res 53	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
141/2	f07 427 f09 631 res 67	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
142	f07 427/1 f09 632? res 67/1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
143/3	f07 430 f09 644 res 70	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
144/1,3	f07 430-1 f09 645 res 70/1	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
145	f07 430-1 f09 645 res 70/2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
146/1	f08 1683 f09 646 res 70/2	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
146/3,4	f08 1683 f09 646 res 70/2	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
147/1,3,4	f 08 531 f09 676 res 79	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
147/2	f 08 531 f09 676 res 79	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

Примітка: ¹⁾ «+» – компонент у наявності, «-» – компонент відсутній; ²⁾ робочі номери, під якими ДНК зернівок досліджувалась, по 4 зернівки на номер. Якщо у комірці стоїть поодиноким число, що позначає лише генерації лінії, не було знайдено поліморфізму серед різних зернівок. Якщо поліморфізми було знайдено, номери різних зернівок вказуються через косу.

стверджувати, що такої мінливості взагалі немає. На інших зернівках ми могли б отримати інші результати. Обов'язково слід підкреслити, що з ДНК різних зернівок Аврора поліморфних варіантів спектрів не було. Повністю повторювали спектр генотипу Аврора лише чотири генерації: 83 (res2 п08 501-f09-386), 102 (res13 f07 388/1-f09 428/2), 103 (res13 f07 388/2-f09 429) та 119 (res 22 f08 499-f09 473). Окремих зернівок, що їхня ДНК повторювала спектр Аврора, також небагато (назви генерації вказано у таблиці 5.6): 92/3, 94/2, 94/3, 96/2, 100/1, 108/2, 109/2, 109/3, 112/1, 112/2, 112/3, 118/4, 146/4, 147/2.

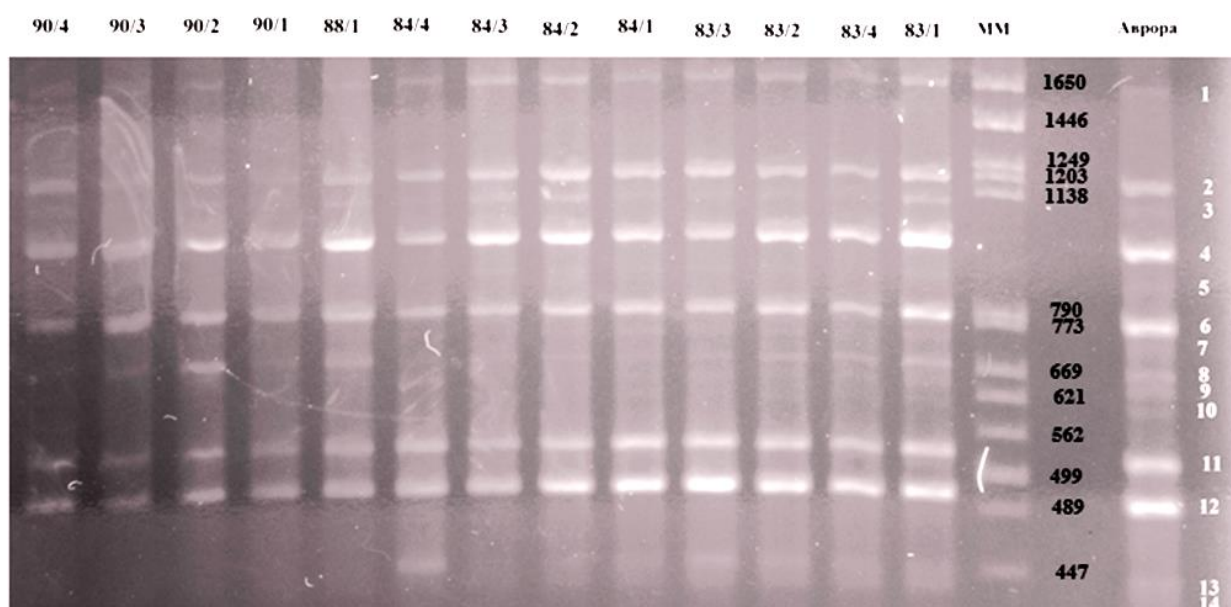


Рис. 5.20. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації за методом REMAP. Цифрами вказано робочі назви ліній, через косу лінію – номер зернівки. MM – маркер мас. (Λ ДНК+Vg11) Компоненти пронумеровані від 1 до 14 в залежності від маси продукту.

Переважає більшість ліній, що досліджувалися, мала відмінності у спектрі REMAP або у цілому за лінією, або у окремих генераціях, або у окремих зернівках. Це можна трактувати як свідчення значної рухливості ретроелементів у геномі інтрогресивних ліній пшениці. Вочевидь, стресові умови, спричиненні 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 поліглютамінових трактів. Отже, чинником поліморфізму у гліадинових спектрах інтрогресивних ліній, який ми стали спостерігати серед деяких ліній через деяких час після їхнього створення як цитологічно стабільних гексаплоїдних ліній, слід вважати рух ретротранспозонів.

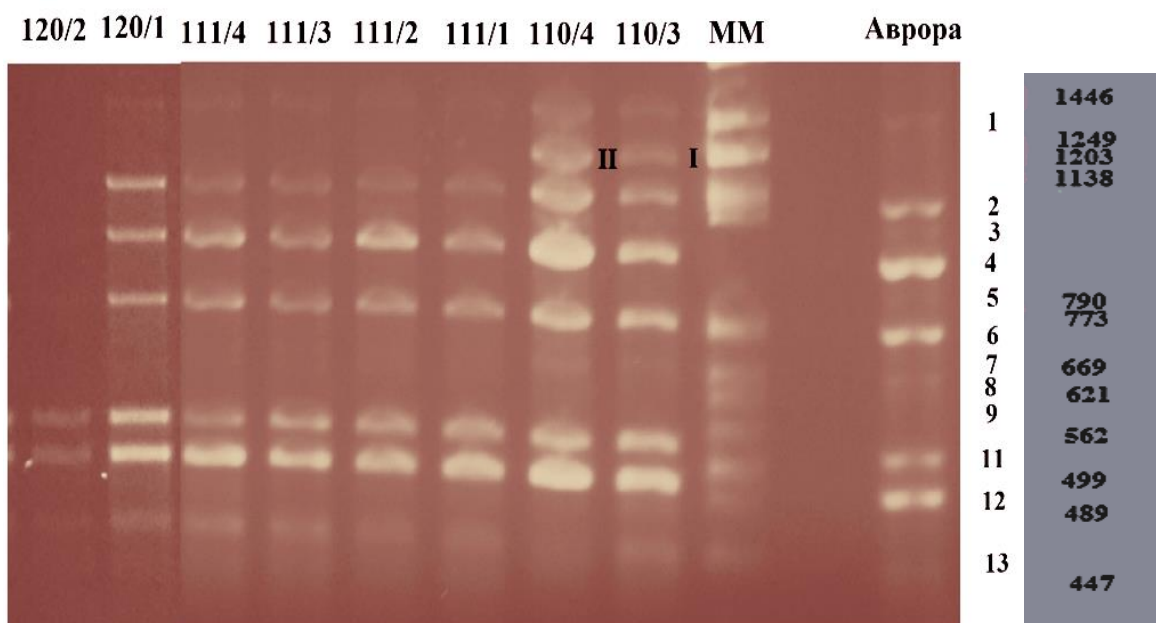


Рис. 5.21. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації за методом REMAP. Цифрами вказано робочі назви ліній, через косу лінію - номер зернівки. MM – маркер мас.(Lambda ДНК+ Bgl1). Компоненти пронумеровані від 1 до 13 в залежності від маси продукту. I та II – додаткові компоненти.

5.4. 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 [258]. Гаметоцидні гени (*Gc* гени) – особливі гени, які викликають руйнування тих чоловічих і жіночих гамет, що їх не містять, якщо гамети продукуються гетерозиготною за цим геном рослиною. У результаті цього гетеро- і гемізіготні рослини

виявляють часткову стерильність. Крім того, ці гени викликають руйнування хромосом при утворенні зиготи у тому випадку, коли пилок, який містить гаметоцидний ген, запліднює гамету, яка його не містить [253,256,555,819]. Гаметоцидні хромосоми є джерелом виникнення хромосомних аберацій та інших мутацій, які можуть передаватися нащадкам і закріплюватися [624]. Крім того, ця хромосома є причиною спотворення розщеплення проти очікуваного у гібридних популяціях, якщо таку хромосому містив лише один компонент схрещування та утворенні гібриди F_1 є гемізиготами за гаметоцидною хромосомою [21,426].

Гаметоцидним ефектом характеризуються хромосоми 2C (*Ae. cylindrica*), $2S^1$ та $4S^1$ (*Ae. longissima*), $2S^{sh}$ та $4S^{sh}$ (*Ae. sharonensis*), 2S (*Ae. speltoides*), 3C (*Ae. triuncialis*), $4M^g$ (*Ae. geniculata*) [253,259,820]. Інтенсивність гаметоцидної дії різних гаметоцидних генів варіює та залежить від генетичного тла, у якому опиняється [820]. Найбільш жорсткою дією характеризуються ген *Gc1a* *Ae. speltoides* та гаметоцидний фактор *Ae. sharonensis* на хромосомі $4S^{sh}$ (цит. за [451]).

У якості індуктора генетичної мінливості гаметоцидна хромосома може бути використана лише у тому випадку, якщо серед гібридів, отриманих за участю лінії з гаметоцидною хромосомою, з якоюсь певною частотою з'являються нащадки без такої хромосоми. Мова йде про те, що повна летальність гамет без гаметоцидної хромосоми унеможлиблює використання такої хромосоми у якості індуктора генетичної мінливості, тому що від такої хромосоми неможливо бути позбавитися, і створені таким чином лінії не будуть мати жодної цінності як джерело генетичної мінливості при схрещуванні з комерційними генотипами м'якої пшениці.

Для скринування гібридних нащадків на наявність/відсутність гаметоцидної хромосоми $4S^{sh}$ найбільш зручними є гени β -амілази, локалізовані саме у цій хромосомі.

5.4.1. Оцінка жорсткості дії гаметоцидної хромосоми $4S^{sh}$. На насінневу фертильність було оцінено F_2 від самозапилення гібридів F_1 . Для

отримання гібридів F_1 у якості чоловічих компонентів схрещування було використано інтрогресивні лінії *Triticum aestivum/Aegilops sharonensis*, до складу генома яких входить (лінії res115, res117, res118, res127, res 128, res139) чи не входить (лінії res121, res122, res132, res148) гаметоцидна хромосома $4S^{sh}$ (див. табл. 5.10 далі). Наявність чи відсутність $4S^{sh}$ хромосоми було встановлено через використання молекулярно-генетичних маркерів: мікросателітних повторів з праймерами, специфічними для хромосоми 4D (пункт дисертації 4.4.1), та гена β -*Amy-1* (підрозділ дисертації 5.5), — з урахуванням картини асоціації хромосом у M1 мейозу материнських клітин пилку у гібридів досліджуваних ліній з сортом м'якої пшениці Аврора (пункт 4.1.1). Жіночі компоненти схрещування для отримання зазначених гібридів F_1 самі були гібридами F_1 , 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. Схрещування з лініями без цієї хромосоми робили для контролю.

Фертильними були рослини F_2 від 18 комбінацій схрещування з перевірених 22 комбінацій. Для оцінки фертильності рослин F_2 підраховували кількість колосків у кожній рослині і кількість зерен у цих колосках, а також очікувану кількість зерен в такій кількості колосків. Передбачається, що за нормальної, незниженої, фертильності кожен колосок повинен містити мінімум 2 зерна. Отже, для розрахунку очікуваного кількість колосків множили на два. Після цього знаходили співвідношення реальної кількості зерен до очікуваної, яке використовували як показник

фертильності кожної рослини (рис. 5.22). Розподіл варіант оцінки фертильності у межах кожної комбінації схрещування суттєво відрізнявся від такого, побудованого за законом Гауса. Всі розподіли, побудовані для кожної комбінації схрещування, характеризувалися статистично значущим (розраховувався показник t) коефіцієнтом правобічної (негативної) асиметрії. Тому для статистичної обробки результатів використовували непараметричний дисперсійний аналіз Крускала-Уолліса [24].

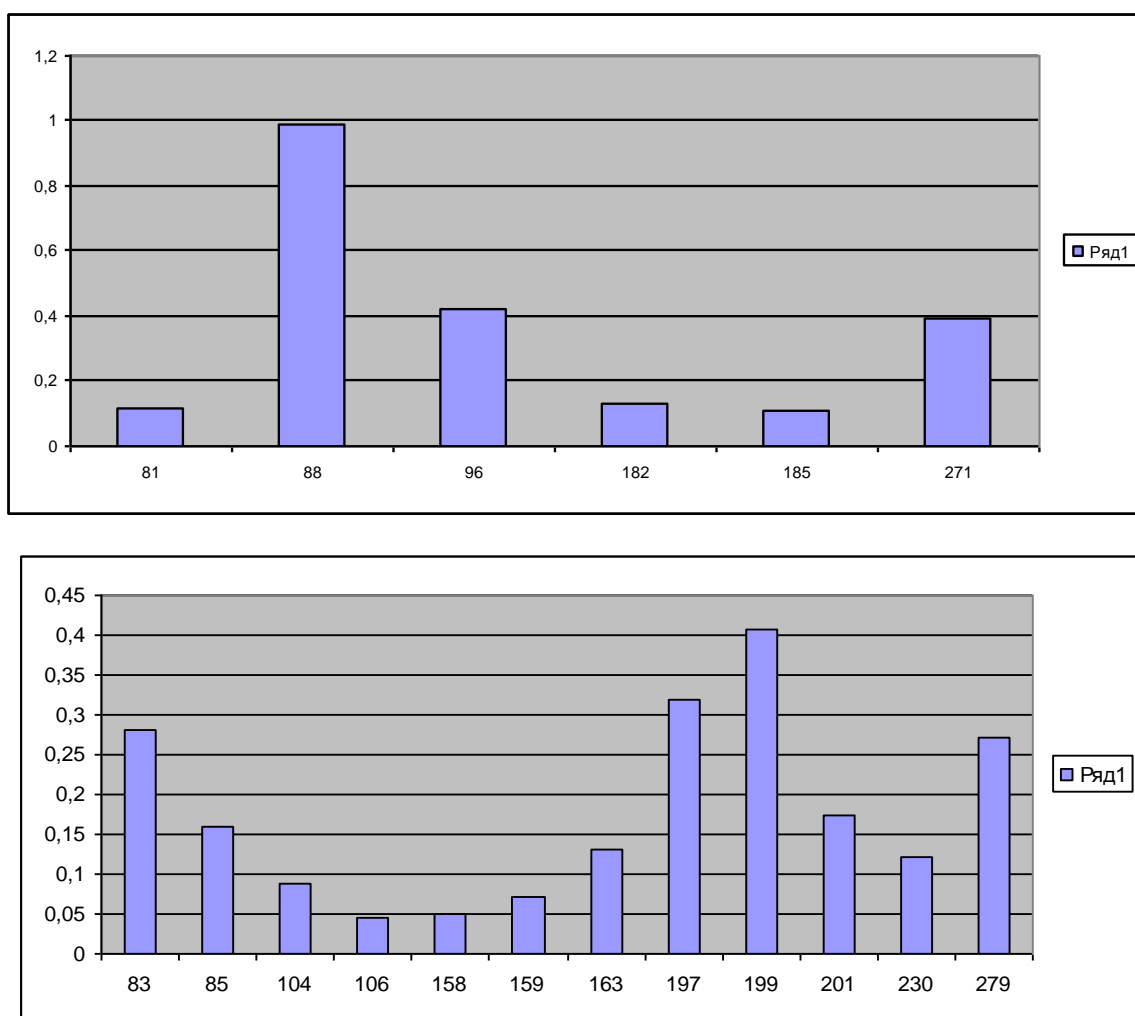


Рис. 5.22. Результати оцінки рослин F_2 за фертильністю. По осі абсцис вказано номери комбінацій схрещування, по осі ординат – оцінка фертильності, виражена у медіані.

Перевіряли три припущення. 1. Фертильність рослин залежить просто від присутності в одного з компонентів схрещування гаметоцидної хромосоми $4S^{sh}$. 2. Фертильність рослин залежить від того, яке походження мали гібриди F_1 , які слугували материнським компонентом схрещування у досліджуваних комбінаціях схрещування: у їхньому походженні брав участь або сорт пшениці м'якої, або інтрогресивна лінія. 3. Чи залежить фертильність від того, який саме сорт або яка саме лінія брали участь в утворенні гібридів F_1 , що були материнським компонентом схрещування.

Для перевірки кожного з припущень було виконано однофакторний дисперсійний аналіз Крускала-Уоллеса для непараметричних даних (табл. 5.7). Групи гібридів для порівняння формувались наступним чином: 1 – $4S^{sh}$ у геномі присутня, 2 – $4S^{sh}$ у геномі відсутня, 3–5 – гібриди F_1 материнського компоненту схрещування були утворені за участю тільки інтрогресивних ліній, 6–7 – гібриди F_1 материнського компоненту схрещування були утворені за участю сортів м'якої пшениці, 8–11 – в утворенні гібридів F_1 брали участь інтрогресивні лінії різного походження (рис. 5.23).

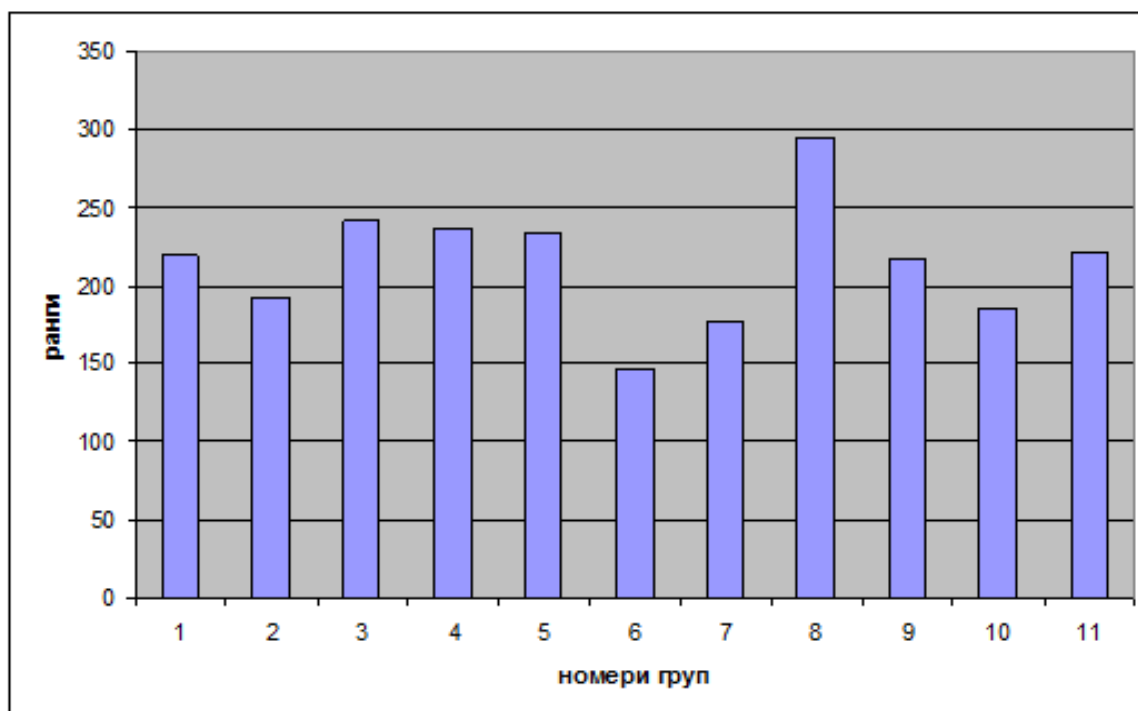


Рис. 5.23. Середні ранги за фертильністю гібридів різного походження. Пояснення у тексті.

За результатами аналізу не виявлено розбіжностей за фертильністю між групами гібридів, які містили чи не містили хромосому $4S^{sh}$ (перший рядок табл. 5.7). Низьку фертильність гібридних рослин, як F_1 , так і F_2 , які несуть хромосому $4S^{sh}$, легко пояснити загибеллю частини гамет, що не мають цієї хромосоми. Гібриди другої групи не отримали гаметоцидної хромосоми з боку батьківського компонента схрещування (друга група гібридів). Проте лінії *T. aestivum/Ae. sharonensis*, які брали участь у їхньому утворенні та, за нашими даними, не мають гаметоцидної хромосоми, у своєму родоводі мали гібрид AABBDS з хромосомою $4S^{sh}$. Отже, наслідки аберантних подій, які мали місце у геномі цього гібриду, можуть діяти протягом наступних поколінь навіть серед нащадків, які гаметоцидну хромосому не успадкували. Цей феномен є спеціальним випадком явища, яке Б. Мак-Клінток назвала геномним шоком [572].

Перевірка другого припущення показала, що фертильність рослин F_2 не залежить від того, що саме у своєму родоводі, сорт м'якої пшениці чи інтрогресивну лінію, має материнський компонент схрещування, тобто гібрид F_1 (табл. 5.7, другий рядок).

Адекватним виявилось третє припущення. Статистично значущою різницею у фертильності рослин ($p < 0,01$, табл. 5.7 третій рядок) характеризувались гібриди, материнський компонент яких походив від схрещування лише інтрогресивних ліній (групи 3–5) чи включав у родовід сорти м'якої пшениці (групи 6–7). Гібриди, до родоводу яких увійшли сорти м'якої пшениці, характеризувались більш низькою фертильністю. При порівнянні гібридів, які вели походження від схрещування виключно інтрогресивних ліній, без участі сортів м'якої пшениці (групи 8–11), розбіжності між групами виявились також статистично значущими, хоча й на більш низькому рівні. Проте значущість різниць між груповими середніми рангами у цьому варіанті дисперсійного комплексу виявилась максимальною. Найвищою фертильністю характеризується група ліній 8, у походженні якої

брали участь інтрогресивні лінії *T. aestivum/Ae. sharonensis*, найнижчою – група ліній 6, в походженні якої обов'язково брали участь лінії *T. aestivum/Ae. umbellulata*. Абсолютні, не рангові, значення фертильності (Me (медіана) = 0,15 для комплексу у цілому, Me = 0,095 для групи 6 та Me = 0,20 для групи 8) вказують на дуже низький відсоток зав'язування насіння.

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 родоходу 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 [104].

Таблиця 5.7

Результати трьох 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

Отже, можна говорити про те, що на фертильність гібридів з гаметоцидною хромосомою впливає природа материнського компоненту схрещування, який завжди був гібридом F₁. Вплив генетичного фону на гаметоцидний ефект різних генів не є неочікуваним результатом. Löve, вивчаючи можливість передачі генетичного матеріалу від *Agropyron* до пшениці, використовував різні хромосомно-додані лінії пшениця-*Agropyron*, а для викликання розривів хромосом – додані лінії пшениці з хромосомою 2С *Aegilops cylindryca* і помітив, що ефект гаметоцидної хромосоми 2С залежить

від того, яка саме лінія пшениця-*Agropyron* була використана. В цьому випадку генетичний фон впливає на прояв гаметоцидної дії (цит за [457]. Крім того, були відкриті супресори для гаметоцидних хромосом, носіями яких є певні сорти пшениці. Тобто при створенні моносомно-доданих ліній пшениці визначеного сорту з гаметоцидною хромосомою егілопсу ця хромосома не проявляє свого гаметоцидного ефекту, в той час як у моносоміків з інших сортів цей ефект є яскраво вираженим [818]. Наявність чи відсутність супресора гаметоцидної хромосоми у гібридному геномі також є генотипною особливістю партнера по схрещуванню та може впливати на фертильність гібрида.

З самого початку вивчення дії гаметоцидних хромосом було висловлено припущення, що причиною стерильності є руйнування хромосом. З часом виявилось, що руйнування хромосом і напівстерильність рослин не завжди асоційовані. Так, рослини Чайніз Сприн-*Gc1* та Чайніз Сприн-3С показували невелику кількість хромосомних аберацій, але високу стерильність, як чоловічу, так і жіночу. А гібрид F_1 Норін 10 x Чайніз Сприн+3С3С виявив високу частоту аберацій і, водночас, нормальну фертильність. Це дозволяє робити припущення, що стерильність викликана чимось іншим, ніж руйнування хромосом [819]. Для прояснення цього питання у випадку наших ліній ми вивчили мітоз в гібридах F_2 десяти комбінацій схрещування (табл. 5.8).

Кількість хромосом серед нащадків коливалась від 39 до 45. Спостерігали такі відхилення від нативного генотипу сорту Аврора: пара дицентриків, чотири супутникові хромосоми замість двох, до чотирьох телоцентричних хромосом, дуже маленькі хромосоми, яких не зустрічається у сорті Аврора. Результати, наведені у таблиці 5.8, показують, що залежності між розкидом кількості хромосом серед паростків F_2 та участю у походженні гібрида F_1 інтрогресивної лінії з гаметоцидної хромосомою (права колонка) чи без гаметоцидної хромосоми (ліва колонка) не спостерігається. В той же час, отримані результати дають змогу припустити, що знижена фертильність

рослин F_1 від схрещування інтрогресивних ліній може залежати від цитологічної нестабільності як самих рослин F_1 , так і інтрогресивних ліній, які брали участь у їхньому походженні, про що було наведено дані у розділі 3.

Таблиця 5.8

Результати підрахунку кількості хромосом у корінцях паростків F_2

номер гібрида	розкид за кількістю хромосом	номер гібрида	розкид за кількістю хромосом
112	39–44	96	42–44
122	40–42	106	39–42
150	41–44	136	42–44
78	39–43	143	40–42
121	40–43	185	42–45

Загалом, наші результати не суперечать висновкам [206], які показали, що хромосомні аберації у рослин з хромосоною $4S^{sh}$ статистично не відрізняються від появи таких у мітозах корінців еуплоїдної пшениці. Проте при дії на рослини гіпометилуючим агентом 5-азоцитидином було помічено підвищення частоти хромосомних аберацій у рослин, які є носіями гаметоцидної хромосоми. Автори припустили, що впродовж розвитку після стадії зародку генетичний матеріал захищається від гаметоцидної дії шляхом метилювання.

За результатами досліджень, які проводились раніше, хромосома $4S^{sh}$ відносилася до хромосом із сильною гаметоцидною дією (ген *Gc2*) [589,594,642]. Для створення ліній, придатних для генетичних маніпуляцій, з усього відомого набору гаметоцидних генів використовувались переважно гени, розташовані на хромосомах 2C і 3C егілопсів *Ae. cylindryca* і *Ae. triuncialis*, оскільки їхня дія на геном вважається більш м'якою і не чинить суттєвого впливу на фертильність [253]. Дані даного дослідження говорять про те, що гаметоцидний ген *Ae. sharonensis* $4S^{sh}$ також може

використовуватись з такою метою як, зокрема, інтрогресія чужинного матеріалу до геному пшениці. Проте, слід враховувати вплив на геном гаметоцидного гену, ефект якого не зникає у ряді поколінь – геномний шок. Подальша розробка питання може полягати в тому, щоб порівняти інтрогресивні лінії між собою та виявити ті з них, які є найоптимальнішими для генетичних маніпуляції з інтрогресії чужинного матеріалу до складу геному пшениці.

5.4.2. Мінливість за спектром бета-амілази усередині інтрогресивних ліній. Оскільки оцінку жорсткості дії гаметоцидної хромосоми 4S^{sh} виконували на гібридах, за спектром β -амілази було вивчено лінії, що брали участь в їхньому утворенні: 16 ліній — похідних Аврозису (res106–res148), 13 ліній — похідних Авродесу (res2–res87) та 9 ліній — похідних Авролати (res201–res254, табл. 5.9). Лінії було вивчено в одній генерації 2009 року, по чотири рослини, шість зернівок на рослину.

Характеристику електрофоретичного спектру β -амілази було наведено у підрозділах 4.3 та 5.2, тут ми коротко нагадаємо її для зручності сприйняття матеріалу. Спектр бета-амілази генотипу Аврора складається з чотирьох компонентів (рис. 5.24, а). Подвійний компонент (12) контролюється геном β -Amy-D1 (хромосома 4D), компонент 4 — геном β -Amy-B1 (4B) та компонент 6 — геном β -Amy-A1 (5A) [12]. Спектр Аврозису, крім компонентів 4 та 6, має специфічний, найбільш рухливий у спектрах наявних пшеничних форм, що досліджуються, компонент, помічений на рисунку як «s». Спектр Авролати має тільки компоненти 4 та 6, а спектр Авродеса від спектра Аврори майже не відрізняється за рухливістю нижнього подвійного компоненту (див. рис. 4.7).

Спектри всіх вивчених ліній мали компонент 4, який властивий генотипу Аврора та контролюється геном β -Amy-B1 (4A). Відсутність мінливості серед ліній за цим геном стала причиною виключення його із подальшого розгляду (табл. 5.9).

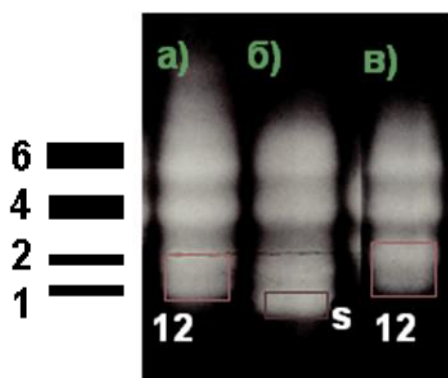


Рис. 5.24. Спектри ізозимів бета-амілази: а) Авродес, б) Аврозис, в) Аврора.

Беручи до уваги походження ліній, слід було очікувати, що будь-яка з них за геном β -*Amy-D1* буде виявляти наявність або алелю «12», властивого генотипу Аврори, або чужинного алелю для ліній - похідних Аврозису та - Авродесу. Для ліній - похідних Авролати компоненти «12» можуть бути відсутні (нуль-алель). За геном β -*Amy-A1* в лініях очікується наявність лише одного алелю «б», властивого генотипу Аврори, адже за хромосомами геномів А та В ми не очікували заміщень та перебудов [36]. Отримані результати від очікуваних відрізнялись. Спектри ліній res16, res60, res106 та res254 не мали компоненту 12, їхній алельний стан за геном β -*Amy-D1* було записано як "0", що є легітимним лише для лінії res254. Лінії res214, res221 та res243 мали компонент 3 (рис. 5.25), рухливість якого дещо менша за подвійний компонент 12. Вивчення рослин F_2 (підрозділ 5.4.3) показав, що компоненти 12, 3 та 0 контролюються алельними генами, тобто алелями гена β -*Amy-D1*. Лінія res125 виявилась нестабільною за цим геном та складалась з рослин з алелями, що контролюють компоненти 12, 3 та 0. Лінії res115, res117, res118, res127, res128, які були ідентифіковані нами як чужинно-транслокаційна (res115) та чужинно-заміщені лінії 4D/4S^{sh} [109] мали у спектрі очікуваний компонент «s», властивий Аврозису.

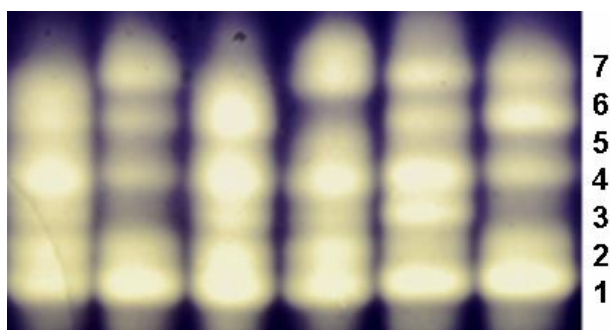
Фенотипна характеристика інтрогресивних ліній за компонентами спектру β -амілази

Лінія ¹⁾	Фенотип за геном β - <i>Amy1-4D</i>	Фенотип за геном β - <i>Amy1-5A</i>	Лінія	Фенотип за геном β - <i>Amy1-4D</i>	Фенотип за геном β - <i>Amy1-5A</i>
res2	12	6	<u>res125</u>	0, 12, 3	6
res3	12	7	<u>res127</u>	S	6
res4	12	5, 6, 7	<u>res128</u>	S	5, 7
res8	12	5, 6	res130	12	6
res16	0	6	res132	12	6
res23	12	6	<u>res137</u>	12	6
res26	12	6	<u>res139</u>	12	6
res33	12	6	res141	12	5
res34	12	0, 5, 7	<u>res147</u>	12	6
res60	0	6	res148	12	6
res66	12	6	res193	12	6
res67	12	7	res201	12	6
res87	12	6	res209	12	5, 7
res106	0	6	res210	3	5, 7
<u>res115</u>	S	6	res214	3	6
<u>res117</u>	S	7	res221	3	6
<u>res118</u>	S	7	res243	3	6
res121	12	6	res252	12	6
res122	12	6	res254	0	6

Примітка: ¹⁾ Підкреслено лінії з хромосомою 4S^{sh}.

Спектри ліній res67, res117, res118 замість компоненту 6 мали компонент 7 (рис. 5.25), а спектр лінії res141 – компонент 5. Лінії res4, res8, res34, res105, res128 виявились нестабільними за цими компонентами спектру, оскільки окремі рослини цих ліній мали різні компоненти спектру: 6, 5 або 7. За даними розщеплення серед гібридів F₂ від схрещування контрастних генотипів встановлено алельність генів, що контролюють компоненти 5, 6 та 7 (див. пункт 5.4.3). Ці компоненти є продуктами гена β -

Amy-A1 (5A). Походження алелів «5» та «7», також як алелю «3» гена β -*Amy-D1*, має бути пов'язане з мутацією. Те, що лінія виявляється нестабільною, показує, що вона тепер не є однорідною та складається з субліній, кожна з яких характеризується одним з трьох вказаних алелів гена β -*Amy-A1*. Нагадаємо, що спектр бета-амілази вивчали на шести зернівках, взятих від чотирьох рослин з кожної лінії. Ті лінії, які за даними табл. 5.9, виглядають як стабільні, цілком можливо такими не є, просто насіння було взято від рослин з однаковим алелем за генами β -*Amy-A1* та β -*Amy-D1*.



а) б) в) г) д) е)

Рис. 5.25. «Нелегітимні» компоненти спектру бета-амілази: а) – 3, б) – 7, в) – 3, г) – 357, д)–37, е) – 7.

Спробу порівняти лінії різного походження за частотою появи нового алеля за кожним з двох генів бета-амілази наведено у таблиці 5.10. Через маленькі вибірки у всіх випадках для статистичного порівняння використовували точний критерій Фішера. Всі три групи ліній, що походять від різних геномно-заміщених амфідиплоїдів, не відрізнялись одна від однією за частотою виникнення зміни за геном β -*Amy-A1*. Щодо гена β -*Amy-D1*, не відрізнялись одна від однієї групи ліній — похідних Авродеса та Аврозиса. Після їхнього об'єднання статистично значуще відрізнялась від них більшою частотою зміни алелю «12» на алель «3» група ліній — похідних Авролати ($P=0,041$). На наш погляд, такі результати є наслідком невеликої кількості

досліджених груп і можуть стати іншими при тотальному дослідженні всіх інтрогресивних ліній з нашої колекції.

У підрозділі 5.2 гени β -амілази вже були визнані такими, що мінливість за ними усередині інтрогресивних ліній виходить за межі, окреслені генотипами, які брали участь в їхньому створенні. Оскільки ми маємо тепер насіння F_3 , за якими можна встановити генотипи рослин F_2 , це дає матеріал для більш детального вивчення інтрогресивних ліній та їхніх гібридів щодо появи нових алелів в білкових спектрах гібридів.

Таблиця 5.10

Кількість ліній — похідних геномно-заміщених форм з очікуваними та зміненими алелями за двома генами бета-амілази

Лінії – похідні амфідиплоїда	Ген β -Amy-A1		Ген β -Amy-D1	
	З очікуваним алелем	Із зміненим алелем	З очікуваним алелем	Із зміненим алелем
Авродесу	8	8	12	1
Аврозису	12	4	14	2
Авролати	7	2	5	4

5.4.3. Генетичний аналіз лінії за генами β -Amy. З використанням згаданого рослинного матеріалу, до якого були додані F_2 від схрещування інтрогресивних ліній одна з одною (табл. 5.11), нами було реалізовано можливість прослідкувати за успадкуванням двох генів, що кодують ізоферменти β -амілази, розташованих в двох різних хромосомах, одна з яких, 4D, гомеологічна гаметоцидній хромосомі. При цьому можна було оцінити успадкування цих генів в двох групах гібридів: отриманих за участю ліній за гаметоцидною хромосомою та за участю ліній *T. aestivum/Ae. sharonensis* без гаметоцидної хромосоми.

5.4.3.1. Аналіз групи гібридів, отриманих без участі ліній з гаметоцидною хромосомою, за геном β -Amy-D1. Генотипи рослин F₂ за геном β -Amy-D1 встановлювали за результатами визначення генотипів їхніх нащадків F₃, коли нащадків було 4 та більше (табл. 5.12). Зіставлення таблиць 5.9 та 5.12 показує, що генотипи нащадків F₃ за алелями гена β -Amy-D1 цілком пояснюються генотипами ліній, які взяли участь у створенні гібридів F₁, що з ними було схрещено лінії *T. aestivum*/*Ae. sharonensis* без гаметоцидної хромосоми. Не розщеплялись гібриди 67, 82, 109 та 69. Три перших були нащадками від схрещування ліній з генотипом 12 12, а останній гібрид у родоводі мав лінію з алелем 3. Від самозапилення гетерозиготи F₁ з генотипом 12 3 фертильною була рослина з генотипом 12 12, а алель 3 було втрачено.

Таблиця 5.11

Комбінації схрещування, задіяні до виконання генетичного аналізу інтрогресивних ліній за генами β -Amy-A1 та β -Amy-D1

Номер гібрида F ₂	Комбінація схрещування	Номер гібрида F ₂	Комбінація схрещування
81	(res2 x res106) x res118	197	res26 x res210
83	(res3 x res252) x res117	199	res26 x res210
85	(res3 x res254) x res117	201	res26 x res210
88	(res5 x res105) x res118	230	res66 x res209
93	(res8 x Aurora) x res118	271	res87 x res141
96	(res16 x res125) x res127	279	res87 x res209
104	(res16 x res242) x res115	67	res201 x res121
106	(res16 x res243) x res115	69	res214 x res148
134	(res147 x res33) x res132	72	res 221 x res132
135	(res151 x Aurora) x res115	78	(res2 x res106) x res121
143	(res158 x res130) x 139	82	(res3 x res252) x res121

Продовження табл. 5.11

Номер гібрида F ₂	Комбінація схрещування	Номер гібрида F ₂	Комбінація схрещування
147	(res160 x res130) x res115	99	(res16 x res141) x res121
158	(res16 x res209) x res1085	109	(res33 x Aurora) x res122
159	(res26 x res193) x res115	112	(res34 x Aurora) x res148
163	(res87 x res156) x res891	121	(res60 x res137) x res122
182	res26 x res141	122	(res67 x Aurora) x res122
185	res26 x res141	150	(res4 x Aurora) x res132

Таблиця 5.12

**Розщеплення за алелями гена β -Аму-D1 серед нащадків F₃ гібридів,
у походженні яких не брала участь лінія з 4S^{sh}**

Номер гібрида	Кількість рослин гібридного компонента схрещування з генотипом, вказаним у дужках:	Кількість насінин, отриманих від вказаного номера гібрида, з таким генотипом				
		12 12	12 12 або 12 0	0	3 3	12 3
67	2 (12 12)	7	–	–	–	–
69	1 (12 12)	11	–	–	–	–
82	3 (12 12)	27	–	–	–	–
109	2 (12 12)	53	–	–	–	–
72	9 (12 3)	18	–	–	19	22
121	2 (12 0)	–	12	–	–	–
122	3 (12 0)	–	19	–	–	–
78	5 (12 12) або (12 0)	–	22	–	–	–
	2 (12 0)	20	–	2	–	–
	1 (0 0)	–	–	4	–	–
112	4 (12 12) або (12 0)	–	17	–	–	–
	2 (12 0)	–	7	2	–	–
150	1 (12 12) або (12 0)	–	4	–	–	–
	2 (12 0)	7	–	2	–	–
99	1 (12 12) або (12 0)	–	4	–	–	–
	2 (12 0)	5	–	3	–	–

Всі 9 рослин F_2 гібрида 72, отриманого від схрещування лінії-похідної Авролати res221 з алелем 3 та лінією res132 з алелем 12, були гетерозиготи. Їхнє сумісне розщеплення не відрізнялось від співвідношення 1 (12 12) : 2 (12 3) : 1 (3 3) ($\chi^2=3,85$, $df=2$, $p>0,05$). Можливість об'єднання окремих розщеплень в одне було доведено через застосування точного критерію Фішера. Розщеплення 3 : 1 за алелями 12 та 0 легко пояснюється для гібрида 121 генотипом лінії res60 і не є зрозумілим для гібрида 122, у родоводі якого алель 0 відсутній. Гібриди 112, 150, 99 були представлені рослинами F_2 з двома генотипами, 12 12 та 12 0, а гібрида 78 — з трьома: 12 12, 12 0 та 0 0. Хоча у всіх випадках впевнено відрізнити гомозиготу 12 12 від гетерозиготи 12 0 можна тільки за великої кількості нащадків F_3 . Розщеплення серед гібридів F_3 цілком відповідає моногенному успадкуванню ознаки. На передачу нащадкам алелів гену β -Amy-D1 ніяк не вплинула інтрогресивна природа ліній, які брали участь в утворенні гібридів.

5.4.3.2. Аналіз групи гібридів, отриманих без участі ліній з гаметоцидною хромосомою, за геном β -Amy-A1. Група складається тільки з двох гібридів, оскільки в інших не спостерігався поліморфізм за геном β -Amy-A1 (табл. 5.13).

В обох випадках кількості гомо- (6 6 та 5 5) та гетерозигот (6 7 та 5 6) серед рослин F_2 , що їхнє насіння F_3 аналізувалось за спектром бета-амілази, коментувати не можна через їхню замалу чисельність — було отримано та вирощено тільки по три рослини F_2 . Щодо розщеплення гетерозигот, воно не відрізняється від очікуваного 1 : 2 : 1. Для розщеплення 1(7 7), 7(6 7), 1(6 6) за точним критерієм Фішера $P=0,487$, а для розщеплення 5(6 6), 0 (5 6), 2 (5 5) $P=0,117$. Отже, немає підстав говорити про якесь відхилення в спадкуванні алелів гена β -Amy-A1 від очікуваного.

Таблиця 5.13

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

Номер гібрида	Кількість рослин гібридного компонента схрещування з генотипом, вказаним у дужках:	Кількість насінин, отриманих від вказаного номера гібрида, з таким генотипом					
		6 6	5 5	7 7	5 6	5 7	6 7
82	2 (6 6)	16	–	–	–	–	–
	1 (6 7)	1	–	1	–	–	7
150	1 (5 6)	5	2	–	–	–	–
	2 (5 5)	7	–	–	–	–	–

5.4.3.3. Аналіз групи гібридів, у походженні яких брала участь лінія з 4S^{sh}, за геном β -Amy-D1. Серед нащадків гібридів, які мають у своєму родоводі Аврозис, при схрещуванні з генотипом 12 s спостерігалась підвищена гетерозиготність і низька кількість гомозигот 12 12. Серед нащадків гібридів 81 (в схрещуванні брали участь 19 рослин F₁ материнського компонента) гомозигот за алелем *Ae. sharonensis* було 22, 67 гетерозигот і тільки одна гомозигота 12 12 (табл. 5.14). Якщо порахувати розщеплення, його можна представити як приблизно 3:9:1. У гібридів під номерами 88 і 185 серед нащадків переважали гетерозиготи 12 s, гомозигот 12 12 не було взагалі. Нашадки гібрида 96 розщеплюються наступним чином: 45(s s), 128 – гетерозиготи, 12 – гомозиготи 12 12, розщеплення подібне до такого, як у нащадків гібрида 81 (3:9:1). Гібридів під номером 135 було взято в схрещування 5 рослин, і нащадки знову показали розщеплення приблизно 3:9:1.

Розщеплення нащадків F₃ гібрида 134 вирізняється серед інших, отримано було 14 і 15 гомозигот s s і гетерозигот відповідно, тобто приблизно порівну, і втричі менше гомозигот 12 12. Тобто приблизно 3:3:1. У

нащадків гібридів, що є похідними Аврозиса і Авролати, також спостерігається перевага гетерозигот. Гомозигот 12 12 не виявилось взагалі.

У гібрида 138 домінуючим класом є гетерозиготи. У схрещування взято 5 рослин. Крім того, розщеплення серед насіння цього гібрида приблизно подібне до розщеплення у випадку гібрида 93, який походить від Аврори і Авродеса (відповідно, 8:9:1 і 28:37:2). Тут хоч і спостерігається перевага гетерозигот над гомозиготами обох типів, проте вона не така суттєва стосовно гомозиготи $s s$, як у насінні з гібридів, які мають у родоводі егілопс Шарона.

Цікаво, що перевага гомозигот $s s$ при схрещуванні з генотипом 12 s виявляється ще тільки у одному випадку— у гібрида, який має у родоводі Авродес і Авролату, під номером 199. Тут з двох рослин було отримано 9 насінин гомозигот $s s$ і 6 гетерозигот 3 s . Алель 12 було втрачено. Можливо, подвійний компонент 12 рослини, з якою схрещували 12 s , втрачається, а той, який присутній у гетерозиготі, походить від гібрида. Тому так мало гомозигот 12 12.

Як видно із таблиці 5.14, серед рослин F_1 , які були материнськими компонентами схрещування для створення тих гібридних популяцій F_2 , що ми їх тепер вивчаємо (наприклад, див. 85, 96, 93 та інші), було чимало таких, про які, судячи з розщеплення серед нащадків, можна думати, що вони мали не по два, а по три алелі гена β -*Amy-D1*. Таке припущення не можна одразу відкидати, адже геноми мають гібридне походження та їхня структура може провокувати певні відхилення від очікуваного для диплоїда розщеплення. При схрещуванні гібридів з генотипом 12 s 3 можливими є наступні генотипи нащадків: $s s$, 12 s , 12 12, 3 s , 12 3, 3 3. Проте не завжди вони всі представлені. Гібрид 96 має тільки один із трьох можливих типів гомозигот, а саме $s s$. Кількісно його найбільше з-поміж інших генотипів. Гетерозигот 12 s та 3 s приблизно порівну, а 12 3 тільки одна. Серед нащадків гібрида 185 немає жодного генотипу без алелю s . Переважають гетерозиготи 12 s , але не

значуще, на відміну від генотипів насіння гібриду 271, де їхня кількість вдвічі перевищує кількість гомозигот $s s$ та в 16 разів – гомозигот $12 12$. Серед нащадків цього гібрида відсутні такі, які б мали алель 3.

Таблиця 5.14

Розщеплення за алелями гена β -Ату-D1 серед нащадків F₃ гібридів, у походженні яких брала участь лінія з 4S^{sh}

Номер гібрид	Кількість рослин гібридного компонента схрещування з таким генотипом:	Кількість насінин, отриманих від вказаного номера гібрида, з таким генотипом								
		ss	12s	12 12	3 s	12 3	3 3	3 0	0 0	12 0
81	19 (12 s)	22	67	1	–	–	–	–	–	–
83	1 (12 s)		8	–	–	–	–	–	–	–
85	4 (12 s)	4	18	–	–	–	–	–	–	–
	2 (12 s 3)	6	10	–	3	–	1	–	–	–
88	4 (12 s)	11	29	–	–	–	–	–	–	–
96	25 (12 s)	45	128	12	–	–	–	–	–	–
	3 (12 s 3)	11	9	–	9	1	–	–	–	–
	2 (12 s 0)	4	16	4	–	–	–	–	2	–
93	13 (12 s)	28	37	2	–	–	–	–	–	–
	1 (12 s 3)	1	–	1	1	–	–	–	–	–
104	2 (12 s)	5	7	–	–	–	–	–	–	–
	1 (12 s 3)	1	1	–	2	1	–	–	–	–
	2 (s 3)	4	9	–	3	–	–	–	–	–
135	5 (12 s)	6	21	1	–	–	–	–	–	–
	2 (12 s 0)	3	4	1	–	–	–	–	2	1
134	1(12 12)		–	10	–	–	–	–	–	–
	1 (12 3)		–	7	–	–	–	20	–	–
	4 (12 s)	14	15	5	–	–	–	–	–	–
138	5 (12 s)	8	9	1	–	–	–	–	–	–
	1(12 12)	–	–	5	–	–	–	–	–	–
143	4 (12 s)	16	18	–	–	–	–	–	–	–
	1 (12 0)	–	8	–	–	–	–	–	–	1

Продовження табл. 5.14

Номер гібрида	Кількість рослин гібридного компонента схрещування з таким генотипом:	Кількість насінин, отриманих від вказаного номера гібрида, з таким генотипом								
		ss	12s	12 12	3 s	12 3	3 3	3 0	0 0	12 0
159	6 (12 s)	6	14	0						
	1 (3 s)	1			3					
185	3 (12 s)	5	12							
	5 (12 3 s)	10	11		6					
147	3 (12 s)	5	16							
	8(12 3 s)	12	34	1	15					
199	15 (12 3 s)	46	53	2	42	1				
	1 (3 s)	2	3		4					
	2 (12 s)	9			9					
201	3 (12 3 s)	4	12		10					
	3 (12 s)	6	16							
271	3 (12 3 s)	16	32	2						
	3 (12 s)		1						6	
279	7 (12 s)	16	33							

Загалом при схрещуванні з даним генотипом спостерігається тенденція переваги гетерозигот 12 s над іншими генотипами, генотипів, у яких присутній s-алель, над тими, де його немає, а також дуже мало генотипів, як гомо-, так і гетерозигот з алелем 3. Швидше за все, цей алель не є характерним для гібридів. Так, при схрещуванні гібридів з генотипом s 3 не було отримано жодного нащадку, гомозиготного за алелем 3. Натомість, у всіх гібридів, крім 159, був присутній генотип 12 s. Крім того, всі нащадки несли алель s. При схрещуванні гібридів з генотипами без алелю s інтерес викликають нащадки гібриду 134. Схрещування його з генотипом 12 3 дає 7 гомозигот 12 12 і відсутність як іншого класу гомозигот, так і гетерозигот

12 3. Проте з'являється генотип 3 0 і він представлений у більшості нащадків. Оскільки у жодного з батьків не був присутній 0-алель, можна припустити, що відбулася втрата алелю, яка могла бути результатом хромосомних аберацій під час гаметогенезу з огляду на те, що гібрид 134 має в своєму родоводі лінію з гаметоцидною хромосомою.

При схрещуванні гібриду 143, який походить від Авролати і Аврозису, з гетерозиготою 12 0 серед нащадків виявили 2 генотипи, один батьківський та 12 s. Алель s, очевидно, в цьому випадку належить геному гібрида. Повернувшись назад, побачимо, що нащадки від його схрещування з 12 s мали тільки 2 варіанти генотипів s s та 12 s, причому приблизно в однаковій кількості, що підкріплює попереднє припущення.

При схрещуванні з генотипом 12 s 0 рослин, які походили від Авродесу та Аврозису 135 і 96, спостерігається невеликий надлишок гетерозигот 12 s, у 135 вищеплюються генотипи 0 0 і 12 0, а у 96 – 0 0.

Якщо появу алеля 0 в інтрогресивній лінії - похідній Авролати (res254) можна пояснити заміщенням β -Amy-D1 на β -Amy-U1, а в лініях res16, res60 (похідні Авродесу), res106, res125 (похідні Аврозису) просто втратою гена β -Amy-1, то пояснити появу алеля 3, нового стосовно як Аврори, так і трьох геномно-заміщених амфідиплоїдів, можна лише мутаційним процесом. Важко тільки зрозуміти, чому в інтрогресивних лініях – похідних трьох різних видів егілопсу або в їхніх гібридах виникли однакові функціональні нові алелі гена β -Amy-D1 (табл. 5.9 та 5.11).

5.4.3.4. Аналіз групи гібридів, у походженні яких брала участь лінія з 4S^{sh}, за геном β -Amy-A. Лінії res2, res106, res118, що брали участь у походженні гібрида 81, мали алелі гена β -Amy-A1 6, 6 та 7, відповідно (табл. 5.15). Чотири рослини F₂ мали очікуваний генотип 6 7 і розщеплення не відрізнялось від співвідношення 1(6) : 2 (6 7) : 1 (7) ($\chi^2=0,35$, p>0,05). Вивчення насінин F₃ показало, що серед рослин F₂ були деякі з алелем 5, і такі рослини розщеплюються не за двома, а за трьома алелями. Таку саму

картину спостерігали у гібрида 85, який за походженням [res3(7) x res254 (6) x res117 (7)] не мав містити алель 5. У дужках наведені алелі, властиві лініям (див. табл. 5.9).

Таблиця 5.15

**Розщеплення за алелями гена β -Ату-А1 серед нащадків F₃ гібридів,
у походженні яких брала участь лінія з 4S^{sh}**

Номер гібрида	Кількість рослин гібридного компонента схрещування з генотипом, вказаним у дужках:	Кількість насінин, отриманих від вказаного номера гібриду, з таким генотипом					
		6 6	5 5	7 7	5 6	5 7	6 7
81	4(6)	10		8			16
	2(5 6)	3		2		5	6
85	3(6)	2		2			16
	3(5 6)	2		3	5		
88	4(5 6)	3		12		19	6
93	11 (6 7)	7		13			31
	2 (5 6)	2				4	3
143	7 (6 7)	6		1			8
	2 (5 7)		9	2		4	4
96	16	40		50			48
	8	11	2	19		16	
163	7 (6 7)	7		1			7
	1			2	4	4	2
201	4 (6, 7)	4		7			14
	3 (5,7)	1		2		10	10
197	2 (6, 7)	3		2			13
	8 (5,7)	11	4			12	20
199	9 (6, 7)	17		13			54
	8 (5,7)	20	3	10	4	14	21
271	1 (6, 7)	4		2			4
	5 (5,7)	10				11	19
279	3 (6, 7)	14		4			8
	3 (5,7)	3		8		8	5

Для гібрида 88 [(res5 x res105) x res118] алель був встановлений тільки для лінії res118, це 7 (табл. 5.9). Судячи з результатів розщеплення серед рослин F₂, гібрид F₁ мав бути з генотипом 5 6.

Гібрид 93 [res8(5, 6) x Аврора (6) x res118 (7)] представлений 11 рослинами з генотипом 6 7, розщеплення серед яких не відрізняється від очікуваного 1 (6) : 2 (6 7) : 1 (7) ($\chi^2=3,78$, $p>0,05$), та двома рослинами, які розщеплюються за трьома алелями (табл. 5.15).

Гібрид 143 [res158 x res130 (6) x res139 (6)], генотип лінії res158 не встановлений. 7 рослин розщеплюються за двома алелями, 6 та 7 (табл. 5.15). Отже, лінія res158 може мати алель 7. Кількості фенотипних класів 7 (6), 8 (6 7), 1(7) за точним критерієм Фішера від очікуваного 1 : 2 : 1 не відрізняється ($p_{ініці} = 0,035$, $p_{повн} = 0,325$). 2 рослини мають серед нащадків алель 5. Оскільки генотип лінії res158 невідомий, можна припустити, що вона розщеплюється за алелями 5 та 7. Тем не менш, одна з двох рослин розщеплюється за трьома алелями замість двох.

Гібрид 163 [res87 (6) x res 156 x res128 (5, 7)]. Генотип ліній res156 не встановлений. 7 рослин розщеплюються за алелями 6 та 7 у співвідношенні, яке не відрізняється від очікуваного ($p_{ініці} = 0,035$, $p_{повн} = 0,319$) (табл. 5.15). Дві рослини розщеплюються за алелями 5, 6, 7.

Гібриди 201, 197 та 199 мають однакове походження, [res26(6) x res210 (5,7) x res139 (6), причому лінія res210 розщеплюється за алелями 5 та 7 (табл. 5.15). Проте всі рослини F₂, як і всі попередні гібриди, розділяються тільки на дві групи: гібриди, що розщеплюються за алелями 6 та 7, та гібриди, які розщеплюються за трьома алелями. Розщеплення за алелями 6 та 7 у гібридів 201 та 197 не відрізнялось від очікуваного: для гібриду 201: 4 (6), 14 (6 7), 7 (7) ($p_{ініці} = 0,055$, $p_{повн} = 0,803$). Серед нащадків гібрида 197 спостерігали розщеплення 3 (6), 13 (6 7), 2 (7), яке відповідало очікуваному ($p_{ініці} = 0,04$, $p_{повн} = 0,439$). А серед нащадків гібрида 199 спостерігали надлишок гетерозигот ($\chi^2=7,23$, $p<0,05$).

Гібрид 271 [res87 (6) x res 141 (5) x res188 (7)]. Картина успадкування не відрізняється від попередніх гібридів (табл. 5.13). Розщеплення алелів 6 та 7 не відрізняється від очікуваного, 4 (6), 4 (6 7), 2 (7) ($p_{ініц} = 0,1$, $p_{повн} = 0,864$). П'ять рослин розщеплюються за трьома алелями.

Гібрид 279 [res87 (6) x res 209 (5,7) x res140], генотип лінії res140 не встановлений (табл. 5.15). При розщепленні алелів 6 та 7 спостерігається надлишок гомозигот за 6 алелем ($\chi^2=11,54$, $p<0,05$).

В жодному з обстежених гібридів не спостерігали розщеплення окремо за алелями 5 та 7 чи 5 та 6. Розщеплення відбувалось або за алелями 6 та 7, або за трьома алелями одночасно. 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 алеля бета-амілази, яка призводить до появи на спектрі компонента 5, відбувається при формуванні гамет гібридом, гемізиготним за хромосомою 4S^{sh}. У наступному підрозділі наводяться результати нашої спроби зрозуміти можливий молекулярний механізм, що може призводити до феномену, що спостерігається.

Отже, вивчення електрофоретичних спектрів бета-амілази в інтрогресивних лініях м'якої пшениці та зразках, які брали участь у ініціальних схрещуваннях, виявило наявність компонентів спектру, не властивих жодному з компонентів схрещування. Генетичний аналіз з використанням F₂ та F₃ від 19 комбінацій схрещування між різними інтрогресивними лініями показав, що алелі, які кодують нові компоненти спектру, є членами алельних серій генів *β -Amy-A1* та *β -Amy-D1*. Три групи ліній, що походять від різних геномно-заміщених амфідиплоїдів, не відрізнялись одна від одної значуще за частотою виникнення змін за генами бета-амілази.

5.5. Природа мінливості гена бета-амілази у інтрогресивних лініях м'якої пшениці

Досліджували ДНК сорту Аврора, виду *Ae. sharonensis* ($2n=14$, $S^{sh}S^{sh}$), геномно-заміщеного амфідиплоїду Аврозис ($2n=6x=42$, $AABBS^{sh}S^{sh}$), інтрогресивні лінії «res» – похідні Аврозису 115, 117, 118, 121, 122/1, res122/2, 127, 128, 130, 132, 139, 141, 148, диплоїдні види *Ae. comosa* ($2n=14$, M^tM^t), *Ae. umbellulata* ($2n=14$, UU), штучний амфідиплоїд Міоза ($2n=6x=42$, AABVMM), який має геноми А та В від озимої твердої пшениці *T. durum* Mutiko italicum і геном M^t від *Ae. comosa* [105,765]. Від кожної лінії брали 2–6 рослин, так що 13 ліній були представлені 48 рослинами. Мінливість гена бета-амілази досліджували за допомогою ампліфікації гена у ПЛР. Реакцію проводили за методикою tdПЛР (touch-down) [435]. Використовували специфічні праймери, що були створені за допомогою сервісу PrimerBLAST на основі TSA (Transcriptome Shotgun Assembly) сиквенсу мРНК гена бета-амілази *T. aestivum* (номер послідовності у GeneBank JP213065.1) із бази даних NCBI (рис. 5.26) (NCBI Nucleotide Database. – Режим доступу [124,140]).

Із одинадцяти пар розроблених праймерів (табл. 5.16) не вдалось підібрати умови до двох: NAmu10 та NAmu11. Продукти ампліфікації розділяли у 1 % агарозному гелі в натрій боратному буфері. Візуалізацію продуктів проводили за допомогою бромистого етидію [727].

Ампліфікація ДНК Аврори та Аврозису дає поодинокі компоненти у спектрі з праймерами NAmu1, NAmu2, NAmu8, NAmu9, NAmu12 та подвійні – з праймерами NAmu3, NAmu4, NAmu5, NAmu7. Обидва компоненти мають однакову інтенсивність флюоресценції етидій броміду. Наявність двох компонентів найчастіше зберігається у лініях – похідних Аврозису. В деяких лініях один із них зникає чи змінює рухливість, що буде обговорюватись далі. На нашу думку, два амплікони формуються через наявність трьох

ортологічних генів β -амілази у гексаплоїдному геномі, що відрізняються за нуклеотидними послідовностями. Якщо відмінності полягають у наявності інсерцій або делецій, зміна маси ампліконів є цілком очікуваною.

Таблиця 5.16

Розроблені пари праймерів, специфічні до гена бета-амілази пшениці

Праймер	Послідовність	Довжина	Старт (н.)	Стоп (н.)
NAmy1 F	GCATGCGTGCTATGGTTCTG	20	879	898
	R GAGAAGGGCGACGAGATCAG	20	1785	1766
NAmy2	AGCACGTCTTGACCCTCTTG	20	286	305
	ACGACACTCCCGAGAAAACC	20	1157	1138
NAmy3	GGTTTTCTCGGGAGTGTCGT	20	1138	1157
	ATGGAAGAAGCTGCCGTCCAG	20	1436	1417
NAmy4	ACTTAGCAGCAGAAGCCTGG	20	16	35
	GGTGCAGCTGGCAATCAAAA	20	1006	987
NAmy5	ACCACCAGTGAATGCCAGAG	20	966	985
	AATTGCCTGACGATGCTGGA	20	1184	1165
NAmy7	ACCACCAGTGAATGCCAGAG	20	966	985
	ATGGCGAGCTTCAGGGAAAA	20	1401	1382
NAmy8	ACTTAGCAGCAGAAGCCTGG	20	16	35
	ACTGGAGCCATCCCCCTTTG	20	445	426
NAmy9	AGCACGTCTTGACCCTCTTG	20	286	305
	TGGATTCACCTACCTCCGGT	20	631	612
NAmy10	TCAGCATACATCTGGACGGC	20	1406	1425
	GAGAAGGGCGACGAGATCAG	20	1785	1766
NAmy11	CACTCAGCACCTGTTGGACT	20	758	787
	ACGACACTCCCGAGAAAACC	20	1157	1138
NAmy12	ACAGTTTGTGCTCAGGAGGG	20	633	652
	CACTGGTGGTACAGGGTTCC	20	975	956

Компоненти спектру ДНК *Ae. sharonensis* з усіма праймерами, крім NAm4, поодинокі. З праймерами NAm5, NAm7 та NAm3 ДНК Аврори дає два компоненти у спектрі. Компоненти егілопса Шарона з праймерами NAm5 та NAm7 збігаються за масою із важким компонентом Аврори, а компонент, що утворюється парою праймерів NAm3, – з легким. З парою праймерів NAm12 ДНК *Ae. sharonensis* не ампліфікується. Це можна

пояснити відмінностями у нуклеотидних послідовностях гена бета-амілази цього егілопса та *T. aestivum*, що відповідають праймерам NAmu12.

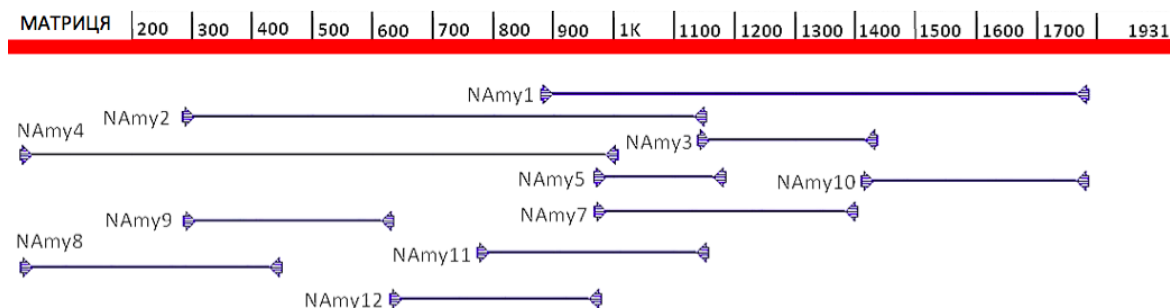


Рис. 5.26. Розташування послідовностей, що фланкуються відповідними праймерами (лінії обмежені стрілками) на основі сиквенсу гена бета-амілази *T. aestivum* JP213065.1 (лінія згори).

Спектри Аврозису зі всіма праймерами, крім пари NAmu5, не протирічають його походженню як амфідиплоїду тетра-Аврори та *Ae. sharonensis*. З праймерами NAmu5 ДНК Аврозису дає лише один компонент, властивий *Ae. sharonensis*, і не має другого, легкого, компоненту з пари, властивої Аврорі.

Лінії, які за попередніми результатами (пункт 4.4.1 дисертації) мають хромосому 4S^{sh} (res117, 118, 127, 141) або її плече з геном β -Amy-S^{sh}1 (res115), зазвичай мають у спектрі NAmu5 один важкий амплікон, як у Аврозису, та егілопса Шарона. ДНК ліній без заміщень 4D/4S^{sh} з парою праймерів NAmu5 продукує два амплікони. Отже, слід припустити, що легкий компонент спектру Аврора утворюється за рахунок гена β -Amy-D1 і може бути його маркером. Його немає в спектрі Аврозису, який не має геному D.

У інтрогресивних ліній спостерігали три типи мінливості за досліджуваними спектрами: 1) відсутність батьківського компоненту для однокомпонентних спектрів (мінливість типу 1/0) було знайдено у продуктах ампліфікації з праймерами NAmu1, NAmu2, NAmu8, NAmu9, NAmu12 (табл. 5.17); 2) відсутність одного або обох батьківських компонентів для

двокомпонентних спектрів (мінливість типу 1,2/1 та 1,2/0). Мінливість типу 1,2/0 виявлено з парою NAmu3. З праймерами NAmu5, NAmu4 та NAmu7 мінливість проявлялась у відсутності як одного (легкого), так і обох компонентів (табл. 5.18, рис. 5.27); 3) поява нового компоненту, не властивого батьківським формам. Такий поліморфізм спостерігали при ампліфікації з парою праймерів NAmu4.

Оскільки ділянка, що фланкується праймерами NAmu5, входить до складу ділянки, що фланкується праймерами NAmu7, і різниця у молекулярній масі легких та важких компонентів продуктів ампліфікації була однаковою, логічно було припустити, що причина мінливості продуктів ампліфікації з вказаними парами праймерів є одною й тією ж самою, тому продукти ампліфікації з праймерами NAmu7 можна не досліджувати.

Для характеристики інтрогресивних ліній досліджували ДНК від 2–6 рослин окремо. Проте це були не саме ті рослини, для яких визначали електрофоретичний спектр β -амілази, тому зіставити зміни у спектрах

Таблиця 5.17

Мінливість інтрогресивних ліній *T. aestivum*/*Ae. sharonensis* за однокомпонентними спектрами ампліфікації ДНК (амплікон у наявності/відсутній)

Пара праймерів	Кількість ліній з мінливістю	Номери ліній res
NAmu1	8	115, 117, 118, 121, 122/1, 128, 130, 148
NAmu2	3	122/2, 132, 148
NAmu8	6	115, 117, 118, 121, 128, 130
NAmu9	4	117, 118, 128, 130
NAmu12	1	128

**Мінливість інтрогресивних ліній *T. aestivum*/*Ae. sharonensis* за
двохкомпонентними спектрами ампліфікації ДНК (амплікони у
наявності/відсутні)**

Пара праймерів	Кількість ліній з мінливістю	Лінії res з мінливістю 1,2/0	Лінії res з мінливістю 1,2/1
NAmy3	8	121, 122/1, 122/2, 127, 128, 130, 132, 148	–
NAmy4	8	121, 128, 130	122/1, 122/2, 127, 128, 130, 148
NAmy5	8	122/1, 128, 148	121, 122/1, 127, 128, 130, 148
NAmy7	8	122/1	121, 122/1, 127, 128, 130, 148

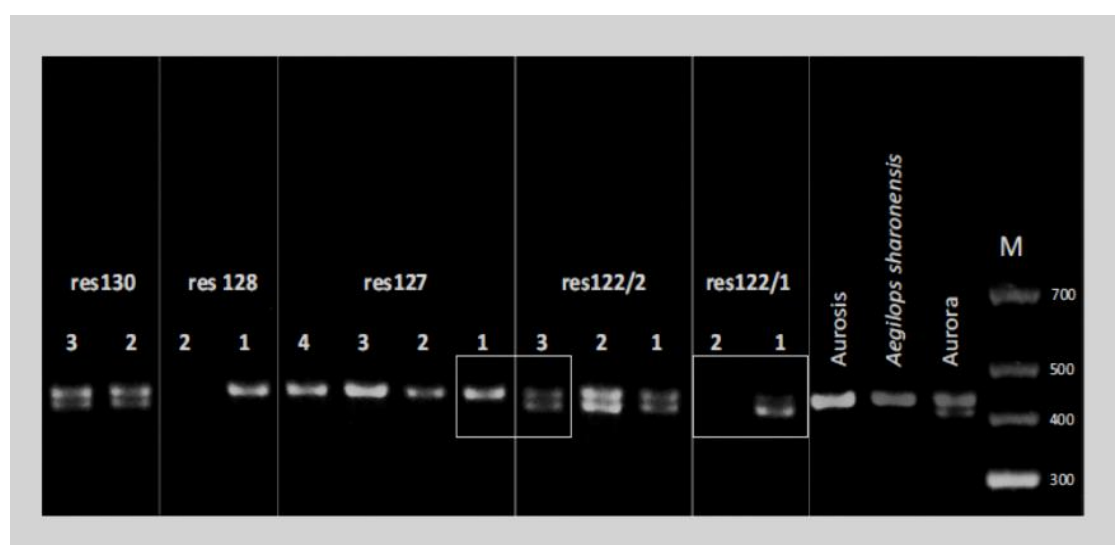


Рис. 5.27. Відсутність одного або обох батьківських компонентів у спектрах, що продукуються праймерами NAmu5. Верхній компонент – важчий, позначається як 1; нижній – легший, позначається як 2. Прямокутниками відмічені типи мінливості 1,2/1 та 1,2/0. Цифри під назвами ліній – номери зернівок, з яких брали ДНК.

ампліконів та спектрах бета-амілази ми могли лише в узагальненому для лінії вигляді. Перш за все лінії оцінювались на внутрішньолінійну мінливість між рослинами. При цьому відсутність амплікона у спектрі не розглядали як прояв поліморфізму, якщо така відсутність характеризувала спектри, отримані за кількома праймерами для однієї і тієї самої рослини. В такому випадку піддавалась сумніву специфічність картини. Крім того, поліморфним вважався продукт, якщо частота його більш рідкісного варіанту (в даному випадку – відсутність продукту) була $\geq 0,05$ (довірча імовірність 95%). За цими двома критеріями, мономорфні продукти ампліфікації для всіх ліній отримуються для трьох праймерів з тих п'яти, що дають поодинокий амплікон: NAmu2, NAmu9, NAmu12. Крім того, виявлено поліморфізм за участю нового компоненту спектра, який утворюється з парою праймерів NAmu4 (рис. 5.28). Мінливість ліній типу 3, поява нового компоненту у спектрі ампліфікації, було виявлено для деяких з них при використанні пари праймерів NAmu4 (табл. 5.18, рис. 5.28). Електрофоретичні спектри ферменту бета-амілаза у ліній res121, res122/1, res122/2, res141, res148, для яких показано появу нового амплікону з праймером NAmu4, або не відрізняються від спектру Аврори (res121, res122/1, res122/2, res148), або мають новий компонент на зимограмі ферменту, що контролюється геном β -Amy-A1 (res141, див. табл. 5.9).

Сегмент гена, що фланкується праймерами NAmu2, включає обидва сегменти, що фланкуються парами праймерів NAmu9 та NAmu12 (рис. 5.28). Можна припустити, що цей сегмент є консервативним та однаковим для всіх генів бета-амілази. Тому у гексаплоїдів він ампліфікується поодиноким продуктом, мономорфним навіть в тих лініях, для яких було встановлено наявність нових компонентів спектру бета-амілази «5» та «7», що контролюються геном β -Amy-A1.

Праймер NAmu5 — єдиний, за яким ДНК Аврори та Аврозису дають різні результати: два амплікони для Аврори та один – для Аврозису. Лінії, які

за даними попереднього вивчення [109] мають у складі хромосому $4S^{sh}$ (res117, res118, res127, res141) або її плече з геном $\beta\text{-Amy-}S^{sh}1$ (res115), мають на спектрі один важкий амплікон, як у Аврозису та егілопса Шарона. ДНК решти ліній, без заміщень $4S^{sh}/4D$, утворює два амплікони. Зрозуміло, що легкий компонент 1 утворюється за рахунок гена $\beta\text{-Amy-}D1$, тому його й немає в спектрі Аврозиса. Отже, ми знайшли пару праймерів, специфічних до гена $\beta\text{-Amy-}D1$, які можна використовувати далі при його аналізі.

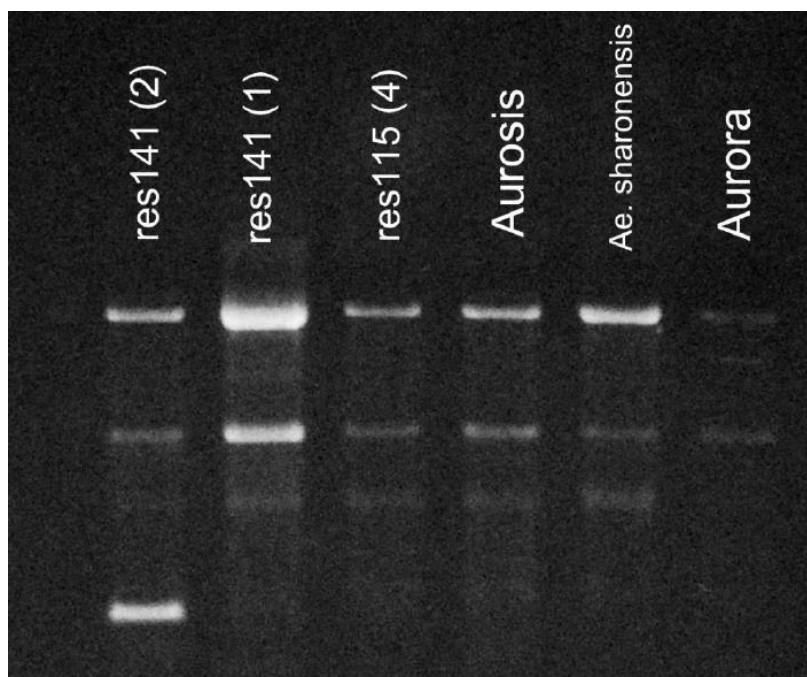


Рис. 5.28. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гена бета-амілази, що фланкується парою праймерів NAmu4.

Лінії res121, res122/1, res122/2 остисті, лінії res141, res148 – напівостисті (див. табл. 4.6). Наші дослідження показали (пункт 6.2.3 дисертації), що розвиток остей у інтрогресивних ліній Аврори пов'язаний зі зміною домінантного стану гена $B1$, локалізованого на хромосомі 5A, і, за результатами мікросателітного аналізу, це могло бути наслідком певних перебудов цієї хромосоми [20]. Ген $\beta\text{-Amy-}A1$ розташований на цій самій хромосомі. Не можна виключити, що пара праймерів NAmu4, ПЛР з якими дає продукт, не властивий прабатьківським геномам ліній, є специфічними до

гена *β -Amy-A1*. Тоді їх можна використовувати для подальшого вивчення змін у нуклеотидних послідовностях цього гена.

Для встановлення джерела мінливості продуктів ампліфікації з використанням праймерів NAmu3 секвенували наступні послідовності: амплікони NAmu3 амфідиплоїда Аврозис (важкий компонент AsisH та легкий AsisL) та інтрогресивної лінії res117 (res117H та res117L). При порівнянні сиквенсів важких продуктів ампліфікації AsisH та 117H із відповідними легкими ампліконами AsisL та 117L було виявлено, що важкі компоненти мають послідовність у 123 нуклеотиди, яка відсутня у легких компонентах (рис. 5.29). Ця послідовність на 100% ідентична послідовності мобільного генетичного елемента *Stowaway-MITE*, що знаходиться у послідовності гена бета-амілази з геному *Triticum urartu* Thumanjan ex Gandilyan (номер послідовності з бази даних GeneBank GQ847677.1, режим доступу [124,140]), донора субгеному А м'якої пшениці. MITE-елементи належать до групи транспозонів другого класу. Вони являють собою відносно невеликі (50-500 п. о.), неавтономні, висококопійні MTE, що мають термінальні інвертовані повтори (TIR) на кінцях та два короткі (2-3 п.н.) фланкуючі прямі повтори – дуплікації цільових сайтів (TSD, target site duplications). Через наявність інвертованих повторів, MITE часто утворюють у геномі вторинні структури – шпильки [154,595,606]. Відомо, що у рослинних геномах MTEs асоційовані з протеїнкодуючими генами. Вони можуть бути локалізовані або поряд з геном, або усередині його та функціонувати як цис- чи транс-регуляторні елементи [328]. Раніше вже було показано поліморфізм за геном бета-амілази, спричинений наявністю *Stowaway-MITE* у четвертому інтроні цього гена у представника Triticeae [565]. Поліморфні гени містять повну або усічену послідовність MITE, а також слід від її вирізання або порожній сайт. Важкі амплікони Аврозиса та лінії res117 містять повнорозмірну послідовність MITE, яку м'яка пшениця

успадкувала, очевидно, від *T. urartu*, донора субгенома А. Легкий амплікон містить порожній сайт.

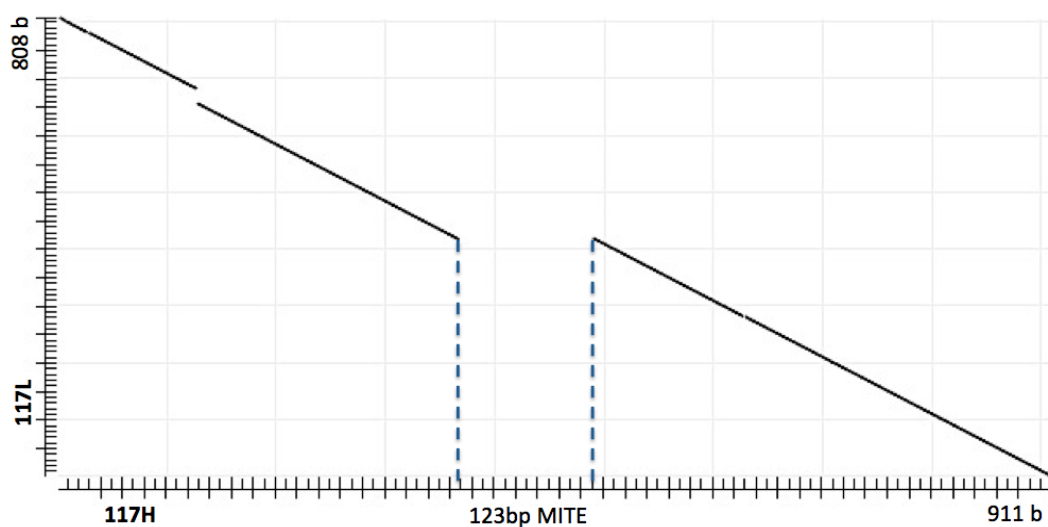


Рис.5.29. Матриця вирівняних послідовностей важкого (вісь абсцис) та легкого (вісь ординат) ампліконів NAmu3 лінії res117. Пунктиром виділена послідовність мобільного генетичного елемента MITE у сиквенсі 117H, яка відсутня у 117L.

Для встановлення причин мінливості продуктів ампліфікації NAmu5, вирівнювали послідовності ампліконів у батьківських форм Аврора, *Ae. sharonensis*, Аврозис, а також рослин із двох інтрогресивних ліній res115 та res117. 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 (рис. 5.30). На наявність подібних слідів у генах бета-амілази вже вказувала у своїх роботах Mason-Gamer [564,565]. У *Ae. sharonensis*, Аврозису та двох досліджених представників ліній було виявлено послідовності, гомологічні важкому компоненту Аврори, що також містили відбиток *Stowaway*-MITE. Відсоток ідентичності цих послідовностей стосовно AuH є досить високим і становить 94% для res115, res117 та Аврозису і 91% для *Ae. sharonensis*.

Для відповіді на питання, яким з трьох ортологічних генів бета-амілази кодуються амплікони NAmu5 Аврори, що відрізняються наявністю сліду від транспозону (AuL та AuH), ці дві послідовності вирівнювали до сиквенсів бета-амілази *T. urartu* (GQ847677.1, донор геному А), *Ae. tauschii* (AY821695.1, донор геному D) та *Ae. speltoides* (HE565971.1), вид, близький до донору геному В. Було встановлено, що сиквенси генів бета-амілази *T. urartu* та *Ae. speltoides* є гомологічними послідовності амплікону AuH, тоді як AuL є гомологічною послідовності *Ae. tauschii* з ідентичністю у 99%. Було зроблено висновок про те, що послідовність гена бета-амілази на геномі D (хромосомна локалізація 4DL) відповідає фрагменту AuL і містить делецію у 21 нуклеотид у порівнянні із послідовностями на 5AL та 4AL.

Нами встановлено, що *Ae. comosa* (M^tM^t) має відмінний, важчий від Аврориного компонент ампліфікації праймерами NAmu5 (рис. 5.31). Інший диплоїдний егілопс з геномом UU, *Ae. umbellulata*, не відрізнявся від м'якої пшениці за рухливістю амплікону NAmu5. У штучного амфідиплоїда Міоза (AABVM^tM^t [765]) молекулярна маса компоненту співпадає з такою у Аврори. Очікували, що Міоза матиме два компоненти: від твердої пшениці – важкий компонент спектру, що відповідає гену бета-амілази на 4А хромосомі, і від *Ae. comosa* – важчий фрагмент, характерний для геному М. Натомість Міоза мала лише один компонент ампліфікації, що при порівнянні послідовностей виявився на 95% гомологічним важкому компоненту Аврори. Оскільки Міоза є штучним амфідиплоїдом, то імовірно, що зникнення послідовності транспозону MITE у Міози пов'язане або з елімінацією послідовностей, або із активацією і переміщенням цього елемента, оскільки ці явища часто пов'язують із геномним шоком, спричиненим аллополіплоїдизацією [335,382,536].

близькоспорідненого виду *Aegilops comosa* розроблено серії праймерів stowc, специфічних до TIR елемента, та stown, специфічних до послідовностей гена, що фланкують елемент.

Секвеновані компоненти NAmu5 *Ae. comosa* та амфідиплоїда Міоза порівнювали із гомологічною послідовністю AuH. Було встановлено, що продукт ампліфікації *Ae. comosa* відрізняється від AuH послідовністю у 83 п. н. (рис. 5.32). Ця послідовність є елементом *Stowaway*-MITE, про що засвідчило вирівнювання із сиквенсом *Ae. comosa* (AY821690.1), у якому даний транспозон є анотованим. Ступінь гомології між послідовністю MITE-елементу у банку генів і отриманою нами послідовністю склав 100%.

Оскільки нами було встановлено, що елементи MITE у м'якої пшениці 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 перевірки цього припущення вирівнювали послідовності *T. urartu* (GQ847677.1) та *Ae. comosa* (AY821690.1) та встановили, що дійсно елемент локалізований у різних сайтах гена. Так, у послідовності *T. urartu* MITE локалізований у сайті 545-668 н., який відповідає сайту 564 н. *Ae. comosa* та у якому він відсутній. У *Ae. comosa* MITE натомість наявний у сайті 1224-1308 н., що відповідає 1325 н. послідовності *T. urartu* (рис. 5.33). Зіставлення двох послідовностей за екзонно-інтронною структурою показує, що елементи MITE локалізовані у двох різних інтронах цього гена: якщо позиція 1190-1482 н. *Ae. comosa* відповідає четвертому інтрону гена, то сайт 564, де у диплоїдній пшениці знаходиться MITE елемент, відповідає третьому інтрону (позиція 515-927 н.). Враховуючи те, що *T. urartu* є донором геному А м'якої пшениці, можна очікувати локалізацію MITE елемента у тому ж сайті гена *β -Amy-1A* м'якої пшениці.

AuH	83	TCTTGGACGAAGCAAACAAGGTCTTCTTGGGATGCAGGGTGCAGCTGGCAATCAAAGTAA	142
Ae. comosa	1	TCTTGGACGAGGCAAATAAGGTCTTCTTGGGATGCAGAGTACAGCTGGCAATCAAAGTAA	60
AuH	143	GTACCATCCTACAGATCTCAGTATATTATA-----	202
Ae. comosa	61	GTACCATCCTATAGATCTCAGTACATTATACTCCCTCCGATCCAAAATAAGCGTCGTGGT	120
AuH	203	-----TAGTAGA	262
Ae. comosa	121	TTTACTTCAAAACTCTCACTCAAACCACGATGCTTATTTTGGATCGGAGGGAGTAGTAGA	180
AuH	263	CAAGATTGCAAAAATCATGATTCAGTTGAAAAGTTGTGCCCCAGATAAACAAATAAA	322
Ae. comosa	181	CAAGATTAGAAAATCATGATTCATTTGAGAAGTTGTGCCT--GATAAACAAAAA--AAA	240
AuH	323	TGCACAACCCACCATAATGTAGGTGTATAAGCTTACGGAATGAGGAAGTATATACAAC	382
Ae. comosa	241	TGCACAAACTCACTCTAACATAG---TACAAGCTTAAGGAAAGAGGAAGTATATACGACT	300
AuH	383	CACATTGCTTAATCTAGAATGT--AATGAGACATGA	383
Ae. comosa	301	CACATTGCTTAATCTAGAACGTTAAATGAGACATGA	336

Рис. 5.32. Вирівняні послідовності важкого продукту ампліфікації *T. aestivum* сорту Аврора (AuH) і гомологічної послідовності *Aegilops comosa*. Виділено послідовність *Stowaway*-MITE, що відсутня у Аврори, проте наявна у *Ae. comosa*.

Отримані результати частково узгоджуються із даними Mason-Gamer, яка вказувала на те, що в ході еволюції *Triticinae* елемент MITE кілька разів зазнавав делецій та інсерцій у четвертий інтрон гена бета-амілази [564]. Наші дані доповнюють отримані автором результати, оскільки ми показали що інсерції відбувались у різні локуси: крім четвертого інтрону елемент може бути локалізованим у третьому інтроні гена бета-амілази пшениці.

При порівнянні MITE елементів, знайдених у різних локусах в послідовностях *T. urartu* та *Ae. comosa*, було виявлено, що ці елементи мають невисокий відсоток гомології. Зокрема, вони є різними за довжиною: 83 п.н. – у *Ae. comosa* і 123 п.н. – у *T. urartu*. Елемент, що належить *Ae. comosa*, має дві великі делеції – одна у 21, друга – у 19 нуклеотидів порівняно з MITE *T. urartu*. Ступінь гомології між цими двома послідовностями складає 79%. Консервативними, головним чином, залишились TIR та прилеглі крайові послідовності. С цього впливає припущення, що транспозони можуть бути різними за походженням та інсерція кожного з них відбулась незалежно протягом еволюції злаків. Але не можна виключити, що MITE-елементи з

геномів *T. urartu* та *Ae. comosa* мають спільного попередника, який рухався усередині гена бета-амілази та зазнав делеції.

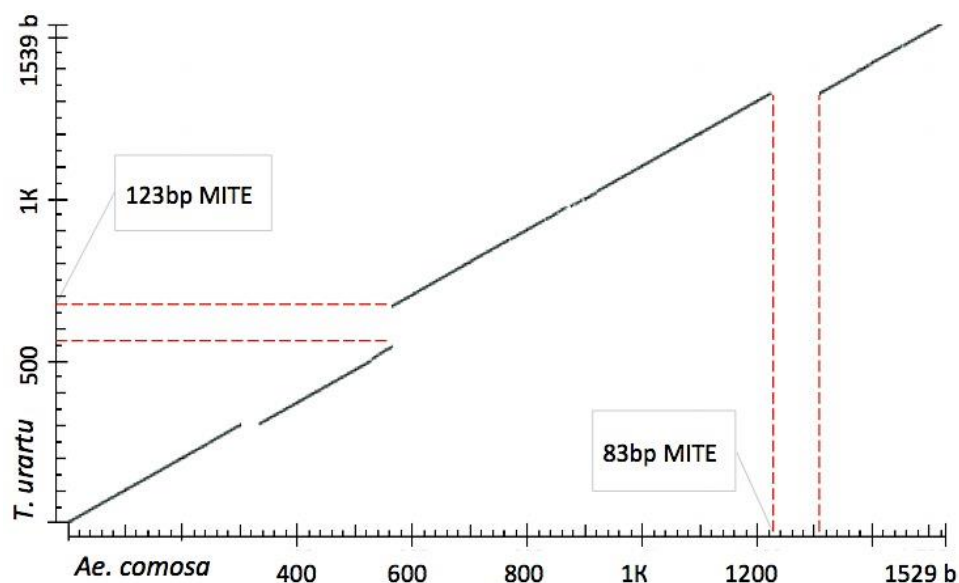


Рис. 5.33. Матриця вирівняних послідовностей часткових сиквенсів бета-амілази *Ae. comosa* (AY821690.1, вісь абсцис) та *T. urartu* (GQ847677.1, вісь ординат). Розриви у прямій відповідають делеціям у послідовностях, делеції що позначені пунктиром, є елементами МІТЕ.

За високим ступенем гомології (84–96%) із послідовностями, наявними у базі даних МІТЕ-транспозонів, що знаходяться у сиквенсі 3В хромосоми м'якої пшениці (FN564426.1) і анотовані як *Stowaway*-МІТЕ типу *Pan*, а також за характерною довжиною елемента (довжина транспозонів *Pan* складає 127 п.н., що співставно із довжиною дослідженого МІТЕ (123 п.н.)), МІТЕ бета-амілази *Triticum urartu* можна віднести до транспозонів *Stowaway*-МІТЕ типу *Pan*. За даними цієї ж бази, послідовність МІТЕ з геному *Ae. comosa* на 88% ідентична послідовності транспозона *Stowaway* гена бета-амілази (AY821714) з геному *Peridictyon sanctum* Melderis).

Оскільки МІТЕ-елементи є відносно короткими, вони мають тенденцію формувати у геномі стабільні вторинні структури з одного ланцюгу [328]. Для транспозонів МІТЕ вже показано, що вони утворюють шпильки [154,595,606]. Для розрахунку імовірності та візуалізації утворення

вторинних структур у вигляді шпильок послідовностями транспозонів типу МІТЕ у геномі *Ae. comosa* та у геномі *T. urartu*, створили модель за допомогою сервісу [713] (рис. 5.34).

Вільна енергія Гіббса для утворення цих структур за 27°C є негативною і становить -88,1 та -41,7 кДж/моль для *T. urartu* та *Ae. comosa* відповідно. Отже, шпилькові структури, які утворюють МІТЕ, є досить стабільними.

Порівняння спектрів ампліконів, отриманих із праймерами до різних частин гена бета-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. Вивчення можливих молекулярних чинників наявності поліморфізму у електрофоретичних спектрах бета-амілази показало, що такою причиною можуть бути зміни у нуклеотидній послідовності усередині генів бета-амілази. Одним з доведених у даній 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. Цей аспект питання ще чекає на своє дослідження.

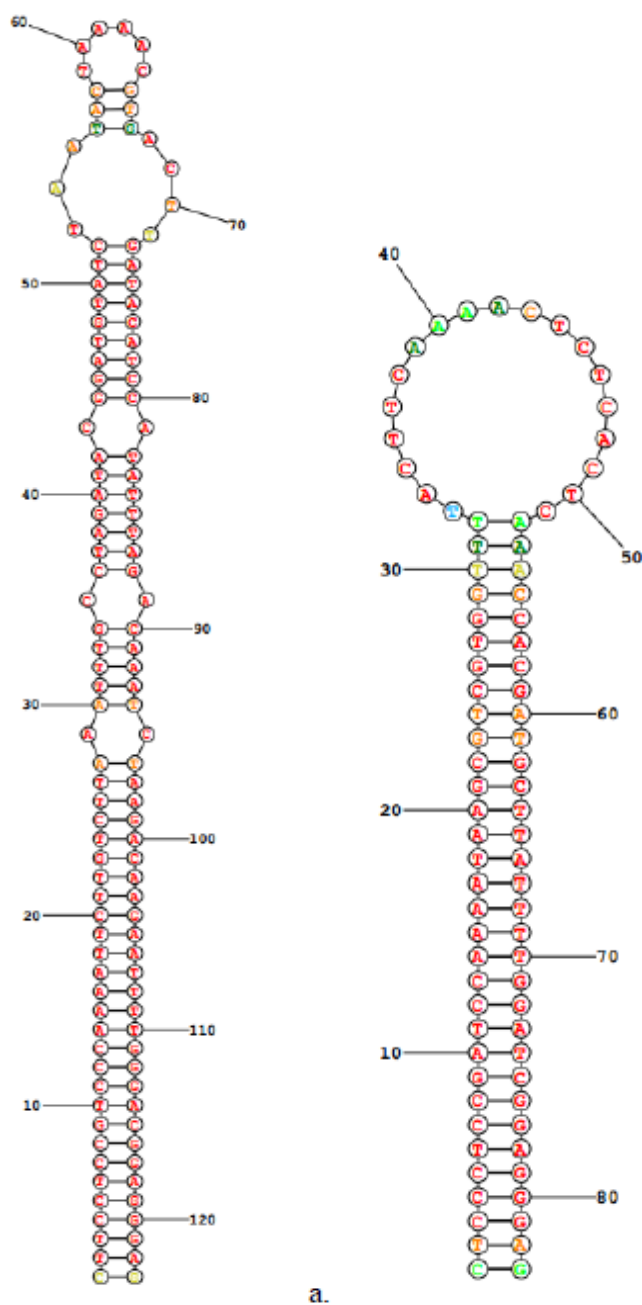


Рис. 5.34. Утворення шпильки *Stowaway*-MITE елементами *Triticum urartu* (а) та *Aegilops comosa* (б) за $t = 27^{\circ}\text{C}$. Модель створена завдяки сервісу Predict a Secondary Structure Web Server [713]. Червоним кольором позначені основи, що будуть утворювати пари із вірогідністю 99%, помаранчевим – із вірогідністю 95%, жовтим – 90%, зеленим – 80%.

За результатами, наведеними у підрозділі, стає очевидним, що та фенотипна мінливість, яку спостерігаємо у генераціях амфідиплоїдів та

інтрогресивних ліній, є невід'ємною особливістю пшеничних рослин, геном яких має гібридне походження. Принаймні, на двох досліджених нами моделях, зміни у гліадинових спектрах інтрогресивних ліній та спектрах бета-амілази, показано генетичне підґрунтя для змін, що спостерігаються. Поява нових компонентів у білкових спектрах супроводжується змінами у нуклеотидних послідовностях генів. Ці зміни можуть викликатися рухом транспозонів, локалізованих як у гені безпосередньо (β -*Amy*), так і у міжгенному просторі (*Gli*), та експансією мікросателітних повторів, що кодують глютамін (*Gli*).

Список публікацій, оприлюднених за результатами досліджень, викладених у розділі 5

Antonyuk MZ, Shpylchyn VV, Ternovska TK. Permanent genetic variability in the introgressive lines and amphidiploids of Triticeae. *Cytology and Genetics*. 2013;47(4):242-51.

Antonyuk M, Navalikhina A, Ternovska T. Beta-amylase gene variability in introgressive wheat lines. *J Appl Genetics*. 2017; 58(2):143-49.

Маньковська ОС, Терновська ТК, Антонюк МЗ. Цитологічна стабільність та життєздатність інтрогресивних ліній з гаметоцидною хромосомою 4Sl та їх гібридів. *Наукові записки НаУКМА. Випуск Біологія та екологія*. 2009;93:23-6.

Михайлик СЮ, Антонюк МЗ, Терновська ТК. Генетична варіабельність інтрогресивних ліній м'якої пшениці за генами *Gli*. *Наукові записки НаУКМА. Випуск Біологія та екологія*. 2011;119:8-14.

Михайлик СЮ, Мартиненко ВС, Антонюк МЗ. Варіабельність внутрішньогенних мікросателітних повторів генів α -, β та ω -гліадинів в інтрогресивних лініях пшениці. *Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць. Київ: Логос, 2016;19:33-7.*

Антонюк МЗ, Маньковська ОС, Бодильова МВ, Терновська ТК. Геномний стрес в інтрогресивних лініях як наслідок дії гаметоцидної хромосоми 4Sl. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць; Київ: Логос, 2009;6: 34-9.

Антонюк МЗ, Михайлик СЮ, Терновська ТК. Мінливість інтрогресивних ліній м'якої пшениці за електрофоретичними спектрами гліадинів. В кн.: Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. Зб. наукових праць ІХ з'їзду УТГіС. Київ: Логос, 2012;4:13-8.

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: 201-5.

Михайлик СЮ, Антонюк МЗ, Терновська ТК. Можливі молекулярні механізми мінливості гліадинових генів в інтрогресивних лініях пшениці. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць. Київ: Логос, 2014;14: 62-6.

Наваліхіна АГ, Антонюк МЗ, Терновська ТК. Генетична мінливість інтрогресивних ліній м'якої пшениці за геном бета-амілази. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць. Київ: Логос, 2014;14:67-71.

Vdovychenko Zh, Antonyuk M, Ternovskaya T. Influence of gametocidal chromosome 4Sl on the segregation ratio in genetic analysis of the common wheat lines. In: Pogna NE, Romano M, Pogna EA, Galterio G , editors. Proceedings of the Tenth International Wheat Genetics Symposium; 1-6 September 2003; Paestum, Italy. Roma: Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura; 2003, p. 649-51.

Antonyuk M, Bodylyova M, Ternovska T. Cytogenetical characteristics of the introgressive common wheat lines including and lacking the 4Sl

chromosome. International Triticeae Mapping Initiative – COST Action Tritigen Joint Workshop; August 31th – September 4th 2009; Clermont-Ferrand, France. Abstract reference: ITMI2009_006.

Antonyuk M, Mankovska O, Ternovska T. Genomic stress in introgression lines of common wheat as a consequence of the action of gametocidal chromosome 4Sl. The 9th Plant Genomics European Meeting; May 4–7, 2011; Istanbul. Turkey, Europe; Abstract book, 2011, p.37.

Михайлик С, Антонюк М, Терновська Т. Внутрішньолінійна мінливість глідинових спектрів в інтрогресивних лініях м'якої пшениці як наслідок нестабільності генома. Перша конференція молодих вчених «Біологія рослин та біотехнологія»; 5–7 жовтня 2011; Біла Церква, Україна. Тези доповідей, 2011, с.55.

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”; Kyiv. Abstract book, 2011, p.89.

Терновська ТК, Шпильчин В, Антонюк МЗ. Феномен генетичної нестабільності інтрогресивних ліній та амфідиплоїдів пшениці. Abstracts of the International Scientific Conference “Breeding and Genetics of Agricultural Crops: Traditions and Prospects”, October 17-19th, 2012, Odesa, Ukraine; Odesa, 2012:197-8.

РОЗДІЛ 6

ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ ЗА МАРКЕРНИМИ ОЗНАКАМИ

Вибір ознак для встановлення їхнього генетичного контролю визначався різними завданнями. Ми намагались встановити характер успадкування ознаки, якщо її в цьому аспекті ще ніхто не вивчав (опушення краю листкової піхви) та ідентифікувати гени, що контролюють певну ознаку у пшеничному геномі, якщо відомості про характер її успадкування, на наш погляд, неповні (остистість колосу), в тому числі якщо такі гени мають чужинне походження (остистість, забарвлення колосу зрілої луски, стійкість до борошнистої роси). Отримуючи гібридні популяції та аналізуючи їхнє розщеплення за фенотипом, ми поступово уяснили, що генетичний аналіз ліній інтрогресивного походження не дає адекватних результатів без ретельного вивчення компонентів схрещування щодо структури їхнього геному, а гібридів різних популяцій – щодо особливостей передачі нащадкам досліджуваних ознак у зв'язку з цією структурою. Чинний розділ містить детальний опис наших кроків у прагненні отримати інформацію про генетичний контроль ознак морфології пшениці (опушення краю листкової піхви, остистість колосу, забарвлення луски), спектру бета-амілази та стійкості до борошнистої роси з застосуванням ліній, які мають інтрогресивне походження.

6.1. Ознака опушення краю листкової піхви

Лінії res – похідні Аврозису 115, 117, 118, 127, 128, 134, 139, 140 мають опушений край листкової піхви. Як було показано у пункті 4.2.2 дисертації, ознака контролюється геном $Hs-S^{sh}$, локалізованим на $4S^{sh}$ хромосомі. Лінії

121, 122, 132, 146, 148 мають неопушений край піхви, тобто за цією ознакою відповідають сорту пшениці Аврора. Гібриди F_1 між генотипами з контрастним виразом ознаки мали опушення по краю листкової піхви, отже ознака домінантна. Нашадків F_2 оцінювали два роки, у 2000 та 2001 роках. Хоча розвиток опушення контролюється одним домінантним геном, серед нащадків F_2 рослин без опушення було набагато менше, ніж 25% (табл. 6.1) і причину такого відхилення емпіричного розщеплення за фенотипом від очікуваного ми прагнули зрозуміти.

Таблиця 6.1

Розщеплення за опушенням краю листкової піхви серед нащадків F_2 від схрещування інтрогресивних ліній *ges* пшениці м'якої з контрастним виразом ознаки

Комбінація схрещування	Опушення краю листкової піхви				середня частка неопушених \pm ст.похибка
	всього	опушені	неопушені	$\chi^2(3:1)^2$	
Результати оцінювання 2000 року					
1. <u>115</u> ¹⁾ x 121	80	76	4	15,63 ^{***}	0,050 \pm 0,028
2. <u>118</u> x 148	36	36	0	12 ^{***}	0
3. <u>127</u> x 132	30	28	2	5,38 [*]	0,017 \pm 0,045
4. <u>140</u> x 146	32	31	1	8,17 ^{**}	0,031 \pm 0,031
5. 121 x <u>117</u>	47	45	2	10,79 ^{**}	0,043 \pm 0,029
6. 132 x <u>117</u>	86	82	4	19,96 ^{***}	0
7. 122 x <u>139</u>	41	41	0	13,67 ^{***}	0,047 \pm 0,023
8. 146 x <u>118</u>	58	56	2	14,37 ^{***}	0,034 \pm 0,024
Середня частка по комбінаціях					0,021 \pm 0,004

Результати оцінювання 2001 року					
<u>115</u> x 148	158	152	6	37,88 ^{***}	0,038±0,015
<u>115</u> x Аврора	103	102	1	31,71 ^{***}	0,01±0,01
132 x <u>117</u>	103	101	2	29,21 ^{***}	0,019±0,014
148 x <u>117</u>	232	231	1	74,69 ^{***}	0,004±0,004
121 x <u>117</u>	182	179	3	52,93 ^{***}	0,016±0,009
122 x <u>139</u>	114	112	2	32,85 ^{***}	0,018±0,012
146 x <u>139</u>	319	312	7	88,49 ^{***}	0,022±0,008
148 x <u>128</u>	110	104	6	22,41 ^{***}	0,055±0,022
Середня частка по комбінаціях					0,034±0,009

Примітка: ¹⁾ – номери лінії з опущенням підкреслено;

²⁾ – * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ для $df=1$.

6.1.1. Гаметоцидна хромосома як фактор спотворення співвідношень фенотипних класів при розщепленні. Природно було припустити, що невідповідність між очікуваними та отриманими співвідношеннями розщеплення обумовлено розташуванням гена $Hs-S^{sh}$ у складі чужинної хромосоми. В такому випадку у М1 мейозу бівалент між різними хромосомами не формується, а унівалентні хромосоми можуть не тільки відходити до полюсів, а і втрачатися у цитоплазмі [423]. Теоретично це може вплинути на співвідношення рослин у різних фенотипних класах. До того ж, хромосома $4S^{sh}$ відома як гаметоцидна [255,259]. Відомо, що у гібридах, гемізіготних за гаметоцидною хромосомою $4S^{sh}$, відбувається переважна передача гамет із такою хромосомою [255,259], що також може бути чинником спотворення співвідношення розщеплення проти очікуваного. Якщо за [423], імовірність для унівалента відійти до одного з двох полюсів становить 0,25 і не відійти до нього – 0,75, утворюються гамети, що містять: 1) обидва гомологи, $4D$ та $4S^{sh}$ (у таблиці 6.2 позначено як DS , 22-

хромосомні), 2) або 4D або 4S^{sh} (D та S, 21-хромосомні) 3) не містять жодної з цих хромосом (– –, 20-хромосомні) з частотами, наведеними у табл. 6.2.

Таблиця 6.2

Розрахунок частоти гамети, що їх формує гібрид F₁, з хромосомами D та S

Частота гамети щодо унівалента D	Частота гамети щодо унівалента S	Склад гамети	Частота гамети
D (0,25)	S (0,25)	DS	0,0625
	0 (0,75)	D	0,1875
0 (0,75)	S (0,25)	S	0,1875
	0 (0,75)	– –	0,5625

Якщо функціонують усі гамети, тоді частка рослин без чужинної хромосоми, а отже і без опушення, складатиме 0,563 (див. табл. 6.5). Якщо функціонують усі жіночі та лише 21-хромосомні чоловічі гамети, рослин без опушення очікується 0,375. Якщо функціонують лише 21-хромосомні гамети, ми отримаємо 0,25 рослин без опушення (див. табл. 6.5). Жодне з трьох припущень не підтверджується результатами, наведеними у таблиці 6.1. Отже, навіть теоретично специфіка поведінки в мейозі унівалентних хромосом може впливати на деформацію співвідношення між фенотипними класами лише у бік збільшення частки рослин без опушення, а ми маємо нестачу таких рослин.

Має бути досліджена інша причина спотворення розщеплення, а саме диференційну життєздатність гамети, що несуть чи не несуть гаметоцидну хромосому. Озерненість досліджуваних інтрогресивних ліній (відношення кількості отриманих з колоса зерен до очікуваної їхньої кількості, рівної подвоєній кількості колосків з колосу) завжди була нижчою у порівнянні з сортом Аврора, на генетичному тлі якого створено чужинно-заміщені лінії (табл. 6.3). За даними, наведеними у таблиці, можливо оцінити цитологічну стабільність досліджених ліній та переконатися, що немає залежності між фертильністю ліній та їхньою цитологічною стабільністю. Серед п'яти

рангових коефіцієнтів кореляції (r_s) [24] статистично значущим був лише один, між фертильністю та часткою анеуплоїдів в насінневому потомстві лінії: озерненість колоса підвищується зі збільшенням кількості анеуплоїдів серед нащадків. Це може відбуватися за рахунок участі у заплідненні анеуплоїдних яйцеклітин. Якщо анеуплоїдні зиготи життєздатне насіння не формують, зерна утворюються лише в тих випадках, коли зигота сформувалась від об'єднання 21-хромосомних гамет, хоча утворюватися у жіночій та чоловічій статевих сферах можуть гамети з іншою кількістю хромосом.

Таблиця 6.3

Характеристика чужинно-заміщених ліній за фертильністю та показниками цитологічної стабільності

Лінія «ген»	Озер- неність	В метафазі 1 мейозу лінії середня кількість:			Частка анеуплоїдів	Лабора- торна схожість
		уніва- лентів	мультива- лентів	бівален- тів		
115	0,34	0,52	0,02	20,7	0,18	0,41
117	0,53	0,5	0,07	20,62	0,23	0,67
118	0,19	0,49	0,17	20,45	0,13	0,47
121	0,19	0,1	0,04	20,88	0,14	0,22
122	0,48	0,41	0	20,8	0,08	0,36
127	0,27	1,05	0,21	20,09	0,09	0,45
128	0,44	0,35	0,06	20,72	0,19	0,77
132	0,55	0,56	0,06	20,62	0,14	0,75
139	0,46	0,37	0,01	20,79	0,05	0,58
140	0,46	0,13	0,21	20,42	0,07	0,36
146	0,40	0,56	0,04	20,64	0,03	0,31
148	0,41	0,15	0	20,81	0,22	0,26
Аврора	1,00	0,34	0,03	20,78	0	0,97
r_s		-0,06	-0,21	0,03	0,56**	-0,16
$t_{\text{факт.}}^{1)}$		0,13	0,44	0,05	1,64 > $t_{0,01}$	0,32

Примітка: ¹⁾ для $n = 13$ $df = 11$ і $t_{0,05} = 0,61$, $t_{0,01} = 0,76$

Дані таблиці 6.4 показують, що пов'язувати зниження озерненості колоса лише тільки із наявністю або відсутністю у гібрида гаметоцидної хромосоми не можна. По-перше, гібриди ліній без гаметоцидної хромосоми не мають переваг за ознакою озерненість колосу. По-друге, вона виявилась різною у різні роки вирощування ліній та гібридів. У всіх варіантах фертильність ліній та гібридів набагато менша, ніж такий показник у реципієнтного генотипа (Аврора).

Таблиця 6.4

Фертильність ліній ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$), що мають чи не мають гаметоцидну хромосому, та гібридів між ними

Рослини, що оцінюються	Наявність гаметоцидної хромосоми	Озерненість	
		1999 рік	2002 рік
Лінії	Лінії із гаметоцидною хромосомою	–	17,69±2,12
	Лінії без гаметоцидної хромосоми	–	17,04±2,32
Гібриди F ₁	Обидві батьківські лінії із гаметоцидною хромосомою	34,00±3,41	–
	Обидві батьківські лінії без гаметоцидної хромосоми	25,88±3,04	3,49±0,68
	Одна з батьківських ліній із гаметоцидною хромосомою	13,99±1,62	8,50±1,72

Від реципрокних схрещувань ліній із гаметоцидною хромосомою з сортом Аврора отримано однакові середні значення озерненості, 15,79±2,86 та 18,14±2,69, які не відрізняються від середніх значень озерненості ліній при їх самозапиленні (табл. 6.4, дані 2002 року) ($t_{\text{факт}} \leq 0,60$ для всіх можливих комбінацій порівнянь чотирьох середніх одна з одною). Отже, звичайна фертильність ліній з гаметоцидною хромосомою близько 17 зерен на колос і

це становить 40% від потенційної озерненості колоса. Саме така величина виходить, якщо вважати, що серед чоловічих гамет функціонують виключно 21-хромосомні, а серед жіночих – всі (друга графіка у таблиці 6.5).

Таблиця 6.5

Очікувані частоти зигот серед нащадків гібрида 4D4S^{sh}, якщо очікувані частоти гамет взято з таблиці 6.2

Функціонують всі гамет				
Тип гамет із частотою	D (0,1875)	S (0,1875)	DS (0,0625)	– (0,5625)
D (0,1875)	0,0352 ¹⁾	0,0352	0,0118	0,1055
S (0,1875)	0,0352	0,0352	0,0118	0,1055
DS (0,0625)	0,0118	0,0118	0,0039	0,0352
– (0,5625)	0,1055	0,1055	0,0352	0,3164
0,4375 опушених : 0,5625 неопушених 0,1408 генотипів утворилося від 21-хромосомних гамет				
Функціонують всі жіночі та 21-хромосомні чоловічі гамет				
Тип гамет із частотою	D (0,50)	S (0,50)		
D (0,1875)	0,09375	0,09375		
S (0,1875)	0,09375	0,09375		
DS (0,0625)	0,03125	0,03125		
-- (0,5625)	0,28125	0,28125		
0,625 опушених : 0,375 неопушених 0,375 генотипів утворилося від 21-хромосомних гамет				
Функціонують лише 21-хромосомні гамет				
Тип гамет із частотою	D (0,50)	S (0,50)		
D (0,50)	0,25	0,25		
S (0,50)	0,25	0,25		
0,75 опушених : 0,25 неопушених Усі генотипи утворилися від 21-хромосомних гамет				

Примітка: ¹⁾ генотипи без опушення виділено

Наявність у популяціях, що розщеплюються, рослин без опушення (без хромосоми $4S^{sh}$) показує, що у рослин із гаметоцидною хромосомою невелика частка гамет виявляється життєздатною і бере участь у формуванні зигот навіть при відсутності у гаметі гаметоцидної хромосоми [21]. Зіставлення часток рослин без опушення по різних комбінаціях показало їхню статистичну однаковість в межах року, тому результати об'єднали та отримали дві частки: для 2000 та 2001 років.

Для того, щоб експериментальні дані покласти в основу розрахунків, спрямованих на визначення частоти функціонування гамет без гаметоцидної хромосоми, зробимо формальне припущення: нехай для гамет, яка має хромосому $4D$ та не має хромосоми $4S^{sh}$, існує імовірність p взяти участь у формуванні життєздатної зиготи. Формалізацію міркувань здійснено з метою застосування у розрахунках методу найбільшої правдоподібності. Припускаємо позірне зчеплення з пшеничною хромосомою D фактору загибелі гамет L . Щоб гамета виявилася життєздатною, зчеплення $D-L$ повинно бути зруйновано з формуванням сполучення $D-l$. Фактор l у вихідних компонентів схрещування позірно зчеплений з $4S^{sh}$. Тоді від схрещування $4S^{sh}l/4S^{sh}l \times 4DL4DL$ маємо гібрид $4S^{sh}l4DL$ з гаметоцидною хромосомою та опушенням піхви. Гібрид формує нежиттєздатні гамети DL з імовірністю $0,5(1-p)$ та життєздатні гамети: $0,5Dl$ (p), $0,5S^{sh}l$ ($1-p$), $0,5S^{sh}L$ (p) (табл. 6.6).

Беручи до уваги генотипи життєздатних гамет, які візьмуть участь у формуванні генотипів гібридів F_2 від схрещування ліній, контрастних за ознакою, вважаємо, що теоретично співвідношення 15 з опушенням : 1 без опушення повинно бути покладеним в основу розрахунків величини рекомбінації p методом найбільшої подібності [88], а не 3 : 1, як ми припускали спочатку. Нежиттєздатні гамети $0,5(1-p)DL$ забезпечують не появу 7 частин зигот із загальної кількості частин 16 (табл. 6.7), так що серед рослин популяцій F_2 цієї частини немає, а є тільки 9 частин з 16, що

повинно бути враховано у розрахунках. Оскільки співвідношення гамет і зигот в даному випадку формується залежно від частоти p , співвідношення 7 : 9 повинно бути виражено як $\frac{0,75 - 0,5p - 0,25p^2}{0,25 + 0,5p + 0,25p^2}$.

Таблиця 6.6

Типи і частки гамет і зигот, які формує гібрид $4S^{sh}l4DL$ ¹⁾

	0,5(1-p) DL	0,5p Dl	0,5(1-p) S ^{sh} l	0,5p S ^{sh} L
0,5(1-p) DL	0,25 (1-p) ² DLDL	0,25p(1-p) DLDl	0,25(1-p) ² DLS ^{sh} l	0,25p(1-p) DLS ^{sh} L
0,5p Dl	0,25p(1-p) DIDL	0,25p ² D/Dl	0,25p(1-p) DlS ^{sh} l	0,25p ² DlS ^{sh} L
0,5(1-p) S ^{sh} l	0,25(1-p) ² S ^{sh} IDL	0,25p(1-p) S ^{sh} lDl	0,25(1-p) ² S ^{sh} lS ^{sh} l	0,25p(1-p) S ^{sh} lS ^{sh} L
0,5p S ^{sh} L	0,25p(1-p) S ^{sh} LDL	0,25p ² S ^{sh} Ldl	0,25p(1-p) S ^{sh} LS ^{sh} l	0,25p ² S ^{sh} LS ^{sh} L

Примітка: ¹⁾ затінені клітинки містять частки нежиттєздатних гамет і зигот; частоту зигот, з яких виростуть рослини без опушення, показано в рамці.

Для отримання рівняння оцінки величини p і величини інформації з табл. 6 роботи [88] ми використовували ті, що подано для розщеплення в F_2 у співвідношенні 15 доміантних : 1 рецесивний, стан відштовхування:

$$(a+b+c) \times \left(\frac{-2p}{4-p^2} \right) + d \times \left(\frac{2}{p} \right) \text{ для рівняння оцінки } p \pm s_p \text{ та } i \frac{4}{4-p^2} \text{ для}$$

розрахунку величини інформації (i_p) від кожної особини F_2 . Для отримання повної інформації I величину i_p помножують на об'єм вибірки. Алгоритм розрахунку частоти p на прикладі даних 2000 року (з табл. 6.1) наведено в таблиці 6.8. Як джерело різноманітності для розрахунку p методом максимальної подібності використали вісім однотипних популяцій F_2 , оскільки при наявності всього двох фенотипних класів в популяції, що розщеплюється, іншого джерела різноманітності у нас бути не могло. Величина $(a+b+c)$ з формули Алларда, реально представлена кількістю

опушених рослин, включає 8 частин життєздатних зигот (ми мали і оцінювали ці рослини) і 7 частин нежиттєздатних зигот (беруть участь у формуванні співвідношення 15 : 1, але не з'являються як реальні рослини, оскільки нежиттєздатні, в табл. 6.8 стовпчик *b*). Саме тому загальна кількість рослин (стовпчик *e* в табл. 6.8) залежить від кількості нежиттєздатних рослин, що нами не спостерігалися, і не є сумою опушених (стовпчик *a*) і неопушених (стовпчик *d*) рослин, що спостерігалися. Величина *b* змінюється разом з величиною *p* і розраховується за формулою:

$$\frac{(a + d) \times (0,75 - 0,5p - 0,25p^2)}{0,25 + 0,5p + 0,25p^2}$$

Таблиця 6.7

Розрахунок часток зигот з урахуванням частоти *p* при формуванні нежиттєздатних (затемнені клітинки ґратки Пеннета) і життєздатних зигот

	0,38 <i>DL</i>	0,12 <i>Dl</i>	0,38 <i>S^{sh}l</i>	0,12 <i>S^{sh}L</i>
0,38 <i>DL</i>	0,1458 <i>DLDL</i>	0,0451 <i>DLDl</i>	0,1458 <i>DLS^{sh}l</i>	0,0451 <i>DLS^{sh}L</i>
0,12 <i>Dl</i>	0,0451 <i>DIDL</i>	0,0140 <i>D/Dl</i>	0,0451 <i>DIS^{sh}l</i>	0,0140 <i>DIS^{sh}L</i>
0,38 <i>S^{sh}l</i>	0,1458 <i>S^{sh}IDL</i>	0,0451 <i>S^{sh}lDl</i>	0,1485 <i>S^{sh}lS^{sh}l</i>	0,0451 <i>S^{sh}l^{sh}L</i>
0,12 <i>S^{sh}L</i>	0,0451 <i>S^{sh}LDL</i>	0,0140 <i>S^{sh}LdL</i>	0,0451 <i>S^{sh}LS^{sh}l</i>	0,0140 <i>S^{sh}LS^{sh}L</i>
				Σ = 1
k=1/(0,12+0,38+0,12) = 1,618, коефіцієнт для множення частот гамет після видалення тих частот гамет, що формують нежиттєздатні зиготи:				
		0,19 <i>Dl</i>	0,62 <i>S^{sh}l</i>	0,19 <i>S^{sh}L</i>
0,19 <i>Dl</i>		0,0365 <i>D/Dl</i>	0,1181 <i>DIS^{sh}l</i>	0,0365 <i>DIS^{sh}L</i>
0,62 <i>S^{sh}l</i>		0,1181 <i>S^{sh}lDl</i>	0,3816 <i>S^{sh}lS^{sh}l</i>	0,1181 <i>S^{sh}lS^{sh}L</i>
0,19 <i>S^{sh}L</i>		0,0365 <i>S^{sh}LdL</i>	0,1181 <i>S^{sh}LS^{sh}l</i>	0,0365 <i>S^{sh}LS^{sh}L</i>
				Σ = 1

Отримане значення p підставляємо в табл. 6.7 (друга ґратка Пеннета) і отримуємо результати. Співвідношення 0,0365 без опушення : 0,9635 з опушенням є теоретично очікуваним на основі величини p , розрахованої методом максимальної подібності за даними 2000 року і 0,0274 : 0,9726 за даними 2001 року. Враховуючи величину p , розраховали теоретично очікувані в F_2 розщеплення (табл. 6.9). Тест на однорідність χ^2 показав, що емпіричні розподіли по фенотипних класах у семи різних вибірках однорідні та можуть бути об'єднані. Після об'єднання семи вибірок для 2000 та 2001 років застосування критерію хі-квадрат показало, що емпіричні обсяги фенотипних класів (з опушенням – без опушення) для обох років не відрізняються від теоретично очікуваних, розрахованих на основі частоти виникнення життєздатних гамет без гаметоцидної хромосоми, p (табл. 6.9).

Отримані нами оцінки частоти передачі хромосоми $4S^{sh}$ нащадкам гібридів ($p = 0,236 \pm 0,030$ за даними 2000 року та $p = 0,167 \pm 0,016$ за даними 2001 року), не суперечать результатам, опублікованим іншими дослідниками [426]. Ці результати дають відповідь на питання, чому в умовах моногенного контролю домінантної ознаки від схрещування контрастних батьківських форм у F_2 , ми маємо 15 рослин з рецесивним фенотипом замість 152 (дані 2000 року) і 28 замість 330 (дані 2001 року). Спотворення співвідношення розщеплення 3:1 обумовлено негативним добором проти гамет, позбавлених гаметоцидної хромосоми, на якій локалізовано ген, що контролює ознаку, яка розглядається. Можливість спотворення співвідношень фенотипних класів за рахунок дії гаметоцидної хромосоми може стати причиною неправильних висновків про кількість та тип дії генів, що контролюють критичну ознаку. Після відкриття гаметоцидних властивостей хромосоми $4S^{sh}$ за кілька років такі хромосоми було знайдено в інших егілопсах. При залученні до генетичного аналізу ліній, які потенційно можуть мати гаметоцидну хромосому (ген), інтрогресивний матеріал потрібно попередньо вивчити на можливість спотворення емпіричних розщеплень проти очікуваних за

Таблиця 6.8

**Розрахунок частоти p методом максимальної правдоподібності за даними оцінювання популяцій F_2 за 2000 р.,
положення відштовхування**

№ комбі- нації з табл. 6.1	Величини фенотипних класів, що спостерігаються ¹⁾									
	a	D	$p = 0,50$		$p = 0,33$		$p = 0,27$		$p = 0,24$	
			b	e	b	e	b	e	b	E
1	76	4	62,2222	142,2222	100,2747	180,2747	119,7465	199,7465	128,3679	208,3679
2	36	0	28,0000	64,0000	45,1236	81,1236	53,8859	89,8859	57,7655	93,7655
3	28	2	23,3333	53,3333	37,6030	67,6030	44,9050	74,9050	48,1379	78,1379
4	31	1	24,8889	56,8889	40,1099	72,1099	47,8986	79,8986	51,3471	83,3471
5	45	2	36,5556	83,5556	58,9114	105,9114	70,3511	117,3511	75,4161	122,4161
6	82	4	66,8889	152,8889	107,7953	193,7953	128,7275	214,7275	137,9955	223,9955
7	41	0	31,8889	72,8889	51,3908	92,3908	61,3701	102,3701	65,1155	106,1155
8	56	2	45,1111	103,1111	72,6992	130,6992	86,8162	144,8162	93,0667	151,0667
			Оцінка (Sc)	Інформ. (I)	Оцінка (Sc)	Інформ. (I)	Оцінка (Sc)	Інформ. (I)	Оцінка (Sc)	Інформ. (I)
1			-20,8593	151,7037	-5,6569	185,3200	2,7133	203,4545	8,4509	211,4122
2			-17,0667	68,2667	-13,7600	83,3940	-12,3599	91,5545	-11,4163	95,1355
3			-5,6889	56,8889	0,9938	69,4950	4,7899	76,2954	7,3966	79,2796
4			-10,9037	60,6815	-6,0009	74,1280	-3,4416	81,3818	-1,6927	84,5649

Продовження табл. 6.8

			Оцінка (Sc)	Інформ. (I)	Оцінка (Sc)	Інформ. (I)	Оцінка (Sc)	Інформ. (I)	Оцінка (Sc)	Інформ. (I)
5			-13,7481	89,1259	-5,5040	108,8755	-1,0467	119,5295	2,0056	124,2047
6			-23,7037	163,0815	-7,9502	199,2190	0,6533	218,7136	6,5482	227,2681
7			-19,4370	77,7481	-15,6711	94,9765	-14,0765	104,2704	-13,0019	108,3488
8			-18,9630	109,9852	-9,7085	134,3570	-4,8233	147,5045	-1,4827	153,2738
			ΣSc	ΣI	ΣSc	ΣI	ΣSc	ΣI	ΣSc	ΣI
			-130,3704	777,4815	-63,2579	949,7652	-27,5914	1042,7043	-3,1922	1083,4875
			-0,1677 ²⁾	0,3323 ³⁾	-0,0666 ²⁾	0,2657 ³⁾	-0,0265 ²⁾	0,2393 ³⁾	-0,0029 ²⁾	0,2363 ³⁾
			p = 0,50		p = 0,33		p = 0,27		p = 0,24	0,030

Примітки: ¹⁾ a – кількість рослин із опушенням, d – кількість рослин без опушення, b – кількість нежиттєздатних зигот, e – загальна чисельність популяції F_2 ;

$$2) \frac{\sum Sc}{\sum I};$$

$$3) p - \frac{\sum Sc}{\sum I}.$$

Таблиця 6.9

**Результати перевірки на відповідність емпіричних та теоретичних,
розрахованих на основі p , обсягів фенотипних класів**

Частоти в фенотипних класах				χ^2
Емпіричні		Теоретичні		
опушені	неопушені	опушені	неопушені	
Дані 2000 р.				
76	4	77,08	2,92	
36	0	34,68	1,32	
28	2	28,90	1,10	
31	1	30,83	1,17	
45	2	45,28	1,72	
82	4	82,86	3,14	
41	0	39,50	1,50	
56	2	55,88	2,12	
Тест хі-квадрат на однорідність, $df=7$				
При об'єднанні вибірок				
395	15	395,02	14,98	0,00 ²⁾
Дані 2001 р.				
152	6	153,68	4,32	
102	1	100,18	2,82	
101	1	100,18	2,82	
231	1	225,65	6,35	
179	3	177,02	4,98	
112	2	110,88	3,12	
312	7	310,27	8,73	
104	6	106,99	3,01	
Тест хі-квадрат на однорідність, $df=7$				
При об'єднанні вибірок				
1293	28	1284,85	36,15	1,89 ²⁾

рахунок впливу гаметоцидних хромосом на співвідношення фенотипних класів у популяціях, що розщеплюються.

6.1.2. Життєздатність зигот як фактор, що впливає на картину фенотипного розщеплення у популяціях F_2 . У пункті 6.1.1 було показано, що величина p (частота передачі хромосоми $4S^{sh}$ нащадкам гібридів) є різною у два роки дослідження, $p = 0,236 \pm 0,030$ за даними 2000 року та $p = 0,167 \pm 0,016$ за даними 2001 року. На цьому базується припущення, що оцінювання популяції F_2 за будь-якими ознаками з метою встановлення частоти p може включати післядію ще одного фактору, що спотворює розщеплення: життєздатність зигот без зозулиної хромосоми. Ми спробували оцінити дію цього фактору на матеріалі оцінки популяцій F_2 одночасно за двома ознаками, опушення краю листової піхви та електрофоретичний спектр β -Аму-1. Ген β -Аму-1 локалізований в хромосомах 4A, 5A та 4D пшениці [82]. Розщеплення в поколінні F_2 за маркерним для хромосом 4D та $4S^{sh}$ компонентом β -Аму-1 було вивчено двома способами: оцінювання рослин F_2 за зернівками F_3 (по 4 зернини на рослину F_2 для визначення її генотипу (β -Аму- $S^{sh}1\beta$ -Аму- $S^{sh}1$ або β -Аму- $S^{sh}1\beta$ -Аму-D1, або β -Аму-D1 β -Аму-D1) та оцінювання безпосередньо зернівок F_2 . Результати наведено в таблицях 6.10, 6.11.

Розщеплення у популяції F_2 не відповідає теоретично очікуваному для успадкування ознаки із кодомінантним типом міжжалельної взаємодії співвідношенню 1 : 2 : 1 (табл. 6.10, 6.11). Для попереднього порівняння різних популяцій стосовно розщеплення залучили величину кількість гетерозигот/кількість гомозигот, яка теоретично має прямувати до одиниці. Перш за все було вивчено, чи немає залежності цього показника від року вирощування популяцій (2000 та 2001) та напрямку отримання гібридів F_1 (лінія із зозулиною хромосомою використовувалася у якості материнської або батьківської), а також від способу оцінювання розщеплення у F_2 – на зернівках F_3 або F_2 .

Таблиця 6.10

Розщеплення за алелями гена β -Аму-1 у гібридів F₂, коли генотип рослин встановлювали за зернівками F₃

Комбінація схрещування ¹⁾ ліній res	Кількість рослин F ₂ з генотипом ²⁾			Співвідношення гетеро-/Гомозиготи	Рослин F ₂	$\chi^2(1:2:1)^3)$
	<i>D1D1</i>	<i>S^{sh}1S^{sh}1</i>	<i>S^{sh}1D1</i>			
Популяцію F ₂ вирощено у 2000 році						
<u>115</u> x <u>121</u>	0	37	26	0,70	63	468,27***
122 x <u>134</u>	1	21	9	0,41	31	184,17***
132 x <u>117</u>	0	42	30	0,71	72	595,00***
Популяцію F ₂ вирощено у 2001 році						
<u>115</u> x Ав	0	43	12	0,28	55	878,05***
<u>115</u> x 132	0	24	5	0,20	29	294,04***
<u>115</u> x 148	0	104	24	0,23	128	5241,00***
121 x <u>128</u>	0	53	14	0,26	67	1342,16***
122 x <u>139</u>	0	49	17	0,35	66	1080,51***
132 x <u>117</u>	0	42	9	0,21	51	878,99***
146 x <u>139</u>	0	129	56	0,43	185	6908,22***
148 x <u>117</u>	0	69	53	0,77	122	1513,80***
148 x <u>128</u>	5	72	20	0,26	97	2312,09***

Примітки: ¹⁾ тут і далі підкреслено лінії з хромосомою 4S^{sh}.

²⁾ тут та далі у таблицях: $S^{sh}1 S^{sh}1 = \beta\text{-Аму-}S^{sh}1\beta\text{-Аму-}S^{sh}1$

$S^{sh}1 D1 = \beta\text{-Аму-}S^{sh}1\beta\text{-Аму-}D1$

$D1 D1 = \beta\text{-Аму-}D1\beta\text{-Аму-}D1$

³⁾ тут і у табл. 6.11 використано критерій хі-квадрат, тому що для всіх комбінацій схрещування теоретичні обсяги фенотипних класів більші п'яти, *** $p < 0,001$ для $df=2$.

Результати пошуку залежності показника гетеро-/гомозиготи від факторів, що були перераховані, наведено у табл. 6.12. Схоже, що є лише два фактори, що якимось впливають на співвідношення гетеро-/гомозиготи, це рік вирощування популяції F_2 та спосіб оцінки популяції: за зернами F_2 або F_3 . Отже можна припустити, що існує ще один чинник, який спотворює розщеплення додатково до дії гаметоцидної хромосоми – життєздатність зигот без $4S^{sh}$ хромосоми.

Таблиця 6.11

**Розщеплення за алелями гена β -Аму-1 у гібридів F_2 , яке встановлено
безпосередньо на зернівках F_2**

Комбінація схрещування	Кількість зерен F_2 з генотипом				Співвідношення гетеро-/гомозиготи	Зерен F_2	χ^2 (1:2:1) ²
	<i>DID1</i>	<i>S^{sh}1S^{sh}1</i>	<i>S^{sh}1D1</i>	<i>0 0</i> ¹⁾			
Популяцію F_1 вирощено у 2000 році							
121 x <u>128</u>	0	45	25	0	0,55	70	776,61***
146 x <u>139</u>	1	52	53	2	1	108	674,79***
148 x <u>128</u>	0	39	24	0	0,62	63	558,10***
Популяцію F_1 вирощено у 2001 році							
122 x <u>139</u>	0	77	45	1	0,58	123	2196,95***
148 x <u>128</u>	0	26	20	0	0,77	46	222,14***

Примітки: ¹⁾ у спектрі немає компонентів, що відповідають експресії генів β -Аму-*S^{sh}1* або β -Аму-*D1*; ²⁾ рослини із генотипом *0 0* не враховували.

В таблиці 6.13 наведено дані розщеплення популяцій за двома ознаками: опушення листкової піхви та електрофоретичний спектр компонентів бета-амілази. Ознака опушення листкової піхви оцінюється на стадії кушіння, оскільки надійно виявляється саме на молодих рослинах. Зерна F_3 , за якими встановлювали генотип рослин F_2 за геном \square -амілази, могли отримати лише від дорослих рослин, якщо вони не виявилися

стерильними. З таблиці 6.13 (стовпчики 5 та 8) добре видно, що між двома вибірками рослин є різниця, яку оцінено у стовпчику 9 цієї ж таблиці кількістю стерильних рослин. Стерильними виявилися всі рослини без опушення, геном яких, як ми вважаємо, сформувався з двох гамет, позбавлених хромосоми $4S^{sh}$. Виключенням була популяція $(148 \times 128)F_2$, у якій з шести рослин без опушення зберіглося 5. Ми бачимо, що поза залежністю, досягли рослини зрілого стану чи ні, майже всі рослини без опушення (тобто без гаметоцидної хромосоми) не дали зерен. Тому, оцінка частоти передачі гамет без зозулиної хромосоми за даними вивчення спектрів α -амілази із зернівок F_3 буде спотвореною через стерильність рослин з генотипом β -Amy-D1 β -Amy-D1.

Таблиця 6.12

Розщеплення за фенотипом спектру β -амілази у F_2 , скомпонованих відповідно до різних факторів, що вивчаються

Роки отримання F_2	$S^{sh}1 S^{sh}1$	$S^{sh}1 D1$	$D1 D1$	співвідношення гетеро-/гомозиготи
Групування комбінацій за роком вирощування F_2				
2000	100	65	1	0,65
2001	585	210	5	0,36
Групування комбінацій за напрямком схрещування: носієм хромосоми $4S^{sh}$ виступає материнський або батьківський компонент схрещування (перший та другий рядки, відповідно)				
2000	37	26	0	0,70
	63	39	1	0,61
2001	171	41	0	0,24
	414	169	5	0,40
Групування комбінацій залежно від покоління зерен, що аналізували				
2000 F_2	136	102	1	0,75
F_3 з F_2 2000	100	65	1	0,64
2001 F_2	103	65	0	0,63
F_3 з F_2 2001	585	210	5	0,36

Таблиця 6.13

Розщеплення в популяціях F₂ від схрещування ліній з хромосомою 4S^{sh} та без неї за ознаками опушення листкової піхви та електрофоретичний спектр компонентів β-амілази

Комбінація схрещування ліній res	Кількість рослин F ₂ з генотипом за β-Аmy-1			Оцінено рослин F ₂	Кількість рослин F ₂ з генотипом		Оцінено рослин F ₂	Кількість стерильних рослин F ₂
	S ^{sh} 1S ^{sh} 1	S ^{sh} 1D1	D1D1		Hs	hshs		
115xАврора	43	12	0	55	102	1	103	48
115 x 132	24	5	0	29	59	0	59	30
115 x 148	104	24	0	128	152	6	158	30
121 x 128	53	14	0	67	75	0	75	8
122 x 139	49	17	0	66	112	2	114	48
132 x 117	42	30	0	72	101	2	103	31
146 x 139	129	56	0	185	312	7	319	70
148 x 117	69	53	0	122	231	1	232	72
148 x 128	72	20	5	97	104	6	110	13

Результати таблиці 6.13 показують, що на стадії від кушення до дорослої рослини ми втрачаємо рослини, які виникли від об'єднання гамет без зозулиної хромосоми. Звідси виходить, що оцінювання частоти передачі цієї хромосоми буде залежати від того, на якій стадії розвитку рослин ми робимо оцінювання трансмісії. Іншими словами, певний внесок дає фактор життєздатності зигот, і він діє протягом онтогенезу.

Щоб знайти певну кількісну характеристику дії фактору життєздатності, величини *p*, що були отримані за даними оцінювання рослин за опушенням (пункт 6.1.1), застосували для розрахунку теоретичних співвідношень розщеплення за алелями гену β-амілази. Для популяцій,

вищених у 2000 році, застосовували $p = 0,24$, у 2001 році – $p = 0,17$. Алгоритм розрахунків, який дає змогу визначити теоретично очікувані величини генотипних класів на основі імовірності p для гамети без хромосоми $4S^{sh}$ зберегтися та взяти участь у формуванні зиготи, наведено в пункті 6.1.1. Згідно з розрахунками, виконаними за цим алгоритмом, частка гомозигот $\beta\text{-Amy-}S^{sh}1\beta\text{-Amy-}S^{sh}1$, гетерозигот $\beta\text{-Amy-}S^{sh}1\beta\text{-Amy-}D1$ та гомозигот $\beta\text{-Amy-}D1\beta\text{-Amy-}D1$ складатиме, відповідно, $0,6719 : 0,2956 : 0,0325$ та $0,7293 : 0,2494 : 0,213$ у 2000 та 2001 роках. Переклавши ці частки на обсяги популяційних вибірок, отримуємо дані для таблиці 6.14. Ці дані показують, що незважаючи на те, що для низки окремих популяцій розраховані частоти генотипів достовірно не відрізняються від емпіричних, у всіх випадках спостерігається один і той же напрямок відхилень: нестача обох типів гомозигот та надлишок гетерозигот. Цей факт стає статистично доведеним, якщо ми об'єднуємо вибірки за роками. Різниця між частотами емпіричними та розрахованими особливо помітна, коли генотипи F_2 встановлюються на зернах F_2 , а не F_3 (табл. 6.15). Всі подальші розрахунки проводитимемо з вибірками, об'єднаними за роками.

Таблиця 6.14

Емпіричні (перший рядок для кожної популяції) та теоретичні (другий рядок) розщеплення за геном $\beta\text{-Amy-}1$

Комбінації схрещування ліній res	Кількість рослин F_2 з генотипом			Всього рослин	P за точним критерієм Фішера
	$D1 D1$	$S^{sh}1 D^{sh}$	$S^{sh}1 S^{sh}1$		
788 x 834	0	26	37	63	0,162
	2,05	18,62	43,33		
835 x 936	1	9	21	31	1,00
	1,01	9,16	20,83		
933 x 790	0	9	42	51	0,097
	1,66	15,08	34,27		

Продовження табл. 6.14

Комбінації схрещування ліній ges	Кількість рослин F ₂ з генотипом			Всього рослин	P за точним критерієм Фішера
	<i>D1 D1</i>	<i>S^{sh}1 D^{sh}</i>	<i>S^{sh}1 S^{sh}1</i>		
788 x Аврора	0	12	43	55	0,658
	1,17	13,72	40,11		
788 x 933	0	5	24	29	0,530
	0,62	7,23	21,15		
788 x 1096	0	24	104	128	0,122
	2,73	31,92	93,35		
834 x 891	0	14	53	67	0,544
	1,43	16,71	48,86		
835 x 1025	01	17	49	66	1,00
	1,41	16,46	48,13		
933 x 790	0	30	42	72	0,032
	1,53	17,96	52,51		
1077 x 1025	0	56	129	185	0,088
	3,94	46,14	134,92		
1096 x 790	0	53	69	122	0,002
	2,60	30,43	88,97		
1096 x 891	5	20	72	97	0,443
	2,07	24,19	70,74		

Примітка: ¹⁾ жирним шрифтом помічено $P < 0,05$.

генотипів будуть відрізнятися від тих, що розраховані з урахування тільки величини p , фактичні дані для розрахунку якої було отримано на більш ранньому етапі онтогенезу (табл. 6.15).

Таблиця 6.15

Теоретичні частоти різних генотипів за генами β -амілази, розраховані з урахуванням фактору зниження життєздатності зигот V .

(E – емпіричні величини класів)

Генотип	Величини класів від популяцій 2000 року					Величини класів від популяцій 2001 року				
	E	$p=0,24$	$p=0,24$	$p=0,35$	$p=0,35$	E	$p=0,17$	$p=0,17$	$p=0,32$	$p=0,32$
			$V=0,2$					$V=0,3$		
Генотипи встановлено за зернівками F_3										
$S^{sh}S^{sh}$	100	108,66	111,92			585	584,41	593,18		
$S^{sh}D$	65	51,29	52,82			210	198,70	201,68		
DD	1	6,05	1,25			5	16,89	5,14		
χ^2 ¹⁾		8,57	4,12				9,01	0,46		
Генотипи встановлено за зернівками F_2										
			$V=0,1$		$V=0,1$			$V=0,1$		$V=0,1$
$S^{sh}S^{sh}$	136	156,44	161,75	131,14	139,58	103	122,73	125,10	96,99	102,40
$S^{sh}D$	102	73,84	76,35	91,80	97,71	65	41,73	42,54	62,08	65,54
DD	1	8,71	0,90	16,06	1,71	0	3,55	0,36	9,93	1,05
χ^2		20,24	12,73	15,44	0,58		19,17	16,13	10,50	1,06

Примітка: ¹⁾ табличні значення χ^2 для $df = 2$: 5,99 ($\alpha = 0,05$), 9,21 ($\alpha = 0,01$)

З табл. 6.14 видно, що у всіх розподілах спостерігається нестача обох типів гомозигот та надлишок гетерозигот стосовно розрахованого співвідношення. Зрозуміло звідси, що справа не в помилковому визначенні частот гамет, позбавлених гаметоцидної хромосоми. Співвідношення спотворюється вже після формування гамет, причому особливо це помітно для класу з найменшою частотою - гомозигот за геном β -Amy-D1, який сформований за рахунок об'єднання гамет без гаметоцидної хромосоми. Якщо згадати, як саме здійснюється гаметоцидна дія хромосоми 4S^{sh} [624], а

це порушення нормального ходу другого поділу мейозу за рахунок розривів та об'єднань хромосом у клітинах, в які не потрапила гаметоцидна хромосома, зрозуміло, що гамети, які не загинуть одразу внаслідок хромосомних порушень, можуть виявитися зі зниженою життєздатністю та конкурентоздатністю, по-перше, і по-друге, можуть взяти участь у формуванні зиготи, життєздатність якої буде зниженою з тієї ж самої причини – наявності хромосомних порушень. Дані нашого дослідження дозволяють нам оцінити тільки фактор зниження життєздатності зигот, тому що відокремити зниження частот певних гамет за рахунок формування абортівних гамет у процесі мейозу від частоти гамет, які мають знижену життєздатність і слабку конкурентну здатність, ми не в змозі.

Дані експерименту (табл. 6.13) ясно показують, що не всі рослини, які сформовані з двох гамет, позбавлених гаметоцидної хромосоми, досягають стадії репродукції, відмираючи на різних стадіях розвитку. Припустимо, що діє фактор зниження життєздатності зиготи V , і його можна оцінити як відношення фактичної кількості гомозигот з генотипом $\beta\text{-Amy-D1}\beta\text{-Amy-D1}$ до теоретичної, розрахованої з урахуванням величини p , отриманої з оцінки на стадії кушіння. 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 (табл. 6.15).

З табл. 6.15 видно, що теоретичний розподіл частот різних генотипних класів, 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 популяцій обох років. Ця різниця особливо помітна, коли генотипи F_2 встановлювали за зернами не F_3 , а F_2 . Порівняння обсягів класів показує, що введення величини V дає змогу отримати теоретичні величини класів, що відповідають фактичним для обох років дослідження, коли генотипи F_2 встановлено за зразками F_3 (перша

частина табл. 6.15). Якщо генотипи F_2 встановлено за зернівками F_2 (друга частина табл. 6.15), введення величини V майже не впливає на обсяг класу гетерозигот, а обсяг класу гомозигот з гаметоцидною хромосомою додатково зростає. Тобто зміна теоретичного розподілу стосовно фактичного здійснюється не у потрібному напрямку. Звідси робимо висновок, що у даному випадку мало місце використання величини p , яке не відповідало фактичному її значенню. Враховуючи, що зерна F_2 – це більш ранній етап онтогенезу, ніж рослини, що кущяться (оцінка опушення), величина p могла бути більш високою. Визначили цю величину безпосередньо за даними оцінювання зернівок F_2 за спектрами β -амілази (логіка розрахунків така ж, що і при застосуванні ознаки опушення піхви, тільки замість вихідного розщеплення 3 : 1 використовували 1 : 2 : 1). Отримали $p = 0,35 \pm 0,032$ для популяцій 2000 року та $p = 0,32 \pm 0,038$ для популяцій 2001 року. При порівнянні фактичних розподілів з теоретичними маємо той же самий характер невідповідності, який вже спостерігали при відсутності урахування зниженої життєздатності зигот без гаметоцидної хромосоми (табл. 6.15). Введення у розрахунки величини $V = 0,1$ дало змогу отримати теоретичні ряди частот, які повністю відповідають фактичним.

Результати проведених досліджень дають змогу дійти висновку, що суттєвими чинниками впливу на результат оцінювання успіху в передачі нащадкам гамет без гаметоцидної хромосоми є рік вирощування популяцій та стадія онтогенезу, на якій виконується оцінювання за критичною ознакою. При оцінюванні F_2 на різних етапах онтогенезу величина p , якою оцінюється успіх передачі гамет без гаметоцидної хромосоми, змінюється від більшого значення до меншого в напрямку від більш ранньої стадії онтогенезу до більш пізньої. Для зигот, що сформовані з двох гамет без гаметоцидної хромосоми, констатується факт зниження їхньої життєздатності, кількісною оцінкою якої є величина V . Оцінити її можна як відношення кількості зигот, що спостерігається, до теоретичної їхньої кількості, отриманої на основі величини p .

6.2. Ознака остистість колосу

На сьогодні на хромосомах пшениці м'якої локалізовано три гени, які беруть участь у контролі ознаки остистість, причому домінантні алелі кожного з цих генів пригнічують розвиток остей: *Hd* (4AS), *B1* (5AL), *B2* (6BL) [579]. Наявність остей – ознака рецесивна. Домінантні алелі кожного з вказаних генів інгібують розвиток остей різною мірою. Наявність принаймні двох домінантних генів повністю пригнічує утворення остей [785]. В низці робіт наводилися дані щодо наявності не лише інгібіторів, але й промоторів остистості. Ваткінс та Елортон (1940) (цит. за [320]) виділили п'ять основних генів: *B1*, *b2a*, *B2*, *A*, *Hd*, серед яких *A* був промотором, *b1a* зумовлював напівостистий стан, тобто також був промотором, а решта була супресорами. Моносомний аналіз (Wenzel (1971), цит за [320]) показав наявність генів, що контролюють остистість, на восьми хромосомах, серед яких 1В, 5D та 7А були показані вперше. За результатами дослідження F₁ від схрещування моносомної серії сорту Чайніз Сприн із остистою твердою пшеницею було постульовано участь дев'яти хромосом в контролі остистості: 5А, 1В, 3В, 4В, 5В, 6В (промотори) та 2А, 6А й 2В (інгібітори) (Mokhtarzadeh (1975), цит. за [320]). Ці результати не збігаються з існуючими на цей час уявленнями про генетичний контроль остистості у пшениці. Позаяк, на сьогоднішній день, промоторні гени не входять до каталогу генів та генних символів, і посилання на згадані роботі майже не зустрічаються в сучасних статтях [484]. Справді, з геном *Hd*, одним із генів-інгібіторів остистості, пов'язують розвиток остеподібних відростків [785]. Крім того показано, що у диплоїдних та тетраплоїдних пшениць остистість може домінувати над безостистістю [318], хоча гени-промотори остистості дотепер не ідентифіковано.

Дослідження генетичного контролю остистості вказують на складні механізми пригнічення утворення остей та взаємодію генів *Hd*, *B1* та *B2*. Наприклад, анеуплоїди сорту Чайніз Сприн за ділянками 5AL-10, в яких відсутній локус із геном *B1*, є частково остистими. Аналогічно, апікальні ості

з'являються в делеційного мутанта за ділянкою 6BL-6, на якій розташований ген *B2*. З огляду на цитогенетичні дослідження, зараз припускають, що напівостистий стан зумовлений епістатичною взаємодією генів *B1* та *B2* та промоторних генів [579], а ген *B1* сам не може пригнічувати утворення остей у гомозиготної за двома рецесивними генами рослини, в той час, як відсутність гену *B2* (генотип *Hd_B1_*) зводить нанівець інгібіторний ефект двох інших генів [785].

6.2.1. Генетичний контроль утворення остей у *T. durum*. Щоб перевірити можливу участь генів *Hd*, *B1* та *B2* у контролі остистості колосу було застосовано контрастні за ознакою сорти та лінії пшениці твердої (*Triticum durum* Desf.), алотетраплоїдного виду, та мікросателітний аналіз популяцій, що розщеплюються, з застосуванням SSR-локусів, специфічних до хромосом 4A (ген *Hd*), 5A (ген *B1*) та 6B (ген *B2*). Безостою була лінія *Mutiko italicum* 59h132 (MI), остистими — сорти Чорномор та Леукурум. Лінії Кандіканс та Рубрум мали добре розвинені остеподібні відростки (рис. 6.1). Зазначені зразки було використано як батьківські форми у циклічному схрещуванні за такою схемою (стрілка вказує на материнський компонент схрещування):

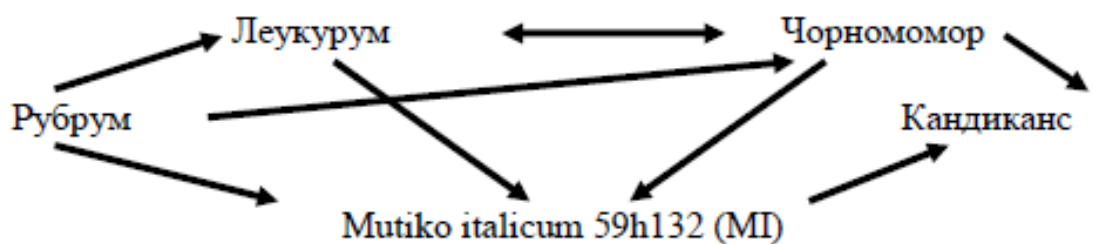




Рис. 6.1. Колосся пшениці з остеподібними відростками (зліва), безості (у центрі), остисті (справа).

Фенотип гібридів F_1 (табл. 6.16) показує, що в жодному випадку не було повного домінування ознаки, яка притаманна одному з компонентів схрещування. В усіх випадках спостерігається проміжне успадкування з ухилом у бік батька, який характеризується менш розвиненими остями. Залежно від ступеня розвитку остей рослини класифікували на три фенотипні класи у відповідності до фенотипів батьківських форм та гібридів F_1 : остисті, безості з остеподібними відростками.

Відсутність розщеплення за остистістю у F_2 для схрещування Леукурум x Чорномор у реципроках, а також відсутність фенотипної різниці між компонентами схрещування та гібридами F_1 для цієї комбінації є основою для твердження, що ці генотипи мають однакову генетичну основу для ознаки остистий колос. Для комбінацій схрещування, F_2 яких мали по два фенотипних класи, перевірили гіпотезу про моногенний контроль ознаки (табл. 6.17). Вона виявилась вірною для трьох комбінацій схрещувань з п'яти.

Для двох інших визначитися щодо прийняття або спростування гіпотези про моногенний контроль ознаки не вдалося.

Таблиця 6.16

Характеристика рослин F_1 та F_2 за ознакою остистість колосу

Комбінація схрещування	Фенотип рослин F_1	Кількість рослин у F_2 з фенотипом ¹⁾			Обсяг вибірки
		БО	ОВ	О	
МІ х Рубрум	БО зі слабкими ОВ	75	38		113
Кандиканс х МІ	БО зі слабкими ОВ	59	18		77
МІ х Чорномор	ОВ	23	56	23	102
МІ х Леукурум	ОВ	30	109	42	181
Леукурум х Рубрум	Розвинені ОВ		71	38	109
Чорномор х Рубрум	Розвинені ОВ		98	41	139
Кандиканс х Чорномор	Розвинені ОВ		133	57	190
Леукурум х Чорномор	Остисті			177	177
Чорномор х Леукурум	Остисті			45	45

¹⁾ у всіх таблицях цього підрозділу БО — безості, ОВ — остеподібні відростки, О — остисті.

Сорти Чорномор та Леукурум є твердою пшеницею і немає відомостей, що в їх родоводах брала участь м'яка пшениця, *T. aestivum*. Навпаки, про генотипи МІ, Рубрум та Кандиканс достеменно відомо, що вони пішли від

схрещування *T. aestivum* x *T. durum* з наступним неконтрольованим самозапиленням пентаплоїдного гібрида AABBDD, $2n = 35$, та добором тетраплоїдних форм просто за типовим для твердої пшениці фенотипом (персональне повідомлення авторів цих форм, В.В. Костіна, Краснодарський НДІСГ, та В.Н. Чередниченко, Харківський ІР). За свідомством В.В. Костіна, генотип Mutiko italicum 59h132 має у своєму родоводі сорт м'якої пшениці Аврора. Сорт Аврора має ген *Bl* на хромосомі 5AL (Арбузова, 1994, цит. за [579]), який бере участь у забезпеченні безостого фенотипу. Цілком можливо, що безостий фенотип лінії МІ, що має Аврору у своєму родоводі, пояснюється наявністю у її геномі саме гена *Bl*.

Таблиця 6.17

Перевірка гіпотез про генетичний контроль ознаки остистість колосу

Комбінація схрещування	Теоретичне співвідношення класів	Емпіричні обсяги класів у F ₂	Значення χ^2
МІ x Рубрум	3:1	75 БО + 38 ОВ	4,49 ¹⁾
Кандиканс x МІ	3:1	59 БО + 18 ОВ	0,11
МІ x Чорномор	3:10:3	23 БО + 56 ОВ + 23 О	2,51
МІ x Леукурум	3:10:3	30 БО+109 ОВ + 42 О	2,52
Леукурум x Рубрум	3:1	71 ОВ + 38 О	5,65 ¹⁾
Чорномор x Рубрум	3:1	98 ОВ + 41 О	1,50
Кандиканс x Чорномор	3:1	133 ОВ + 57 О	2,53

Примітка ¹⁾ $\chi^2_{st0,01} > \chi^2 > \chi^2_{st0,05}$

При схрещуванні лінії МІ із сортами твердої пшениці, які не мали у родоводі м'якої пшениці, у F₂ спостерігається три фенотипні класи, співвідношення між якими свідчить про участь у контролі ознаки двох генів. За результатами виконаного гібридологічного аналізу, безостий фенотип лінії

МІ може бути пов'язаний з наявністю у її геномі гена *BI*. Розщеплення у F_2 від схрещування генотипів МІ та Рубрум, і генотипів Кандиканс та Чорномор показало, що різниця у кожній парі генотипів є моногенною. Розщеплення у F_2 від схрещування генотипів МІ та Леукурум та МІ x Рубрум свідчить про дигенну різницю між вказаними генотипами щодо генів остистості. Для вказаних зразків сортів твердої пшениці нами було запропоновано такі гаплотипи за генами, що беруть участь у контролі остистості:

лінія МІ b_nBI , безоста через наявність домінантного інгібітора остистості *BI* (5A) та відсутність домінантного промотора остистості, B_n , локалізованого, за нашими припущеннями [53], у хромосомі 6B;

лінія Рубрум b_nbI , остеподібні відростки через відсутність домінантного промотора остистості B_n та домінантного інгібітора остистості *BI*;

сорт Леукурум B_nbI , остистий завдяки домінантному промотору остистості B_n та відсутністю домінантного інгібітора *BI*.

Остеподібні відростки у ліній Кандиканс та Рубрум різні, більш розвинені у Кандиканса, ніж у Рубрума. Звичайно, можна збільшувати кількість генів, та залучати до розщеплення гіпотетичні гени-модифікатори. Але не можна виключити можливість існування різних алелів одного й того самого гена B_n , які сприяють розвитку остеподібних відростків різного ступеню, від таких, що роблять колос безостим, до таких, які нагадують напівості. Такий колос може бути описаний як остистий і це призводить до помилок у класифікації рослин за фенотипом, як це буває зазвичай для кількісних ознак.

Тоді від схрещування Кандиканса та Рубруму з генотипом МІ очікуємо співвідношення 3 безостих та 1 остеподібні відростки. Дійсно, у комбінації Кандиканс x МІ спостерігається саме таке розщеплення (табл. 6.17), а в комбінації МІ x Рубрум має місце деяка нестача безостих рослин. На наш погляд, це пов'язано із дуже низькою зимостійкістю лінії МІ. При зимованні

популяції F_2 могла мати місце вибіркова загибель рослин з генотипом, близьким до цієї лінії.

Від схрещування тих самих генотипів з сортами твердої пшениці, для яких ми запропонували формулу генотипу $B_n B_n b_1 b_1$, слід очікувати один клас повністю остистих рослин з генотипом $B_n B_n b_1 b_1$, всі інші генотипи сприятимуть розвитку остеподібних відростків різного ступеня. Нестача рослин у фенотипному класі ОВ та надлишок остистих рослин слід розглядати як підтвердження нашого припущення про різний ступінь розвитку остей, що ускладнює класифікацію рослин за фенотипом.

Щоб перевірити, чи є гени, за якими відбувається розщеплення у наявних комбінаціях схрещування, відомими генами $B1(5A)$, $B2(6B)$, $Hd(4A)$, виконали мікросателітний аналіз із застосуванням SSR-локусів, специфічних для вказаних хромосом (табл. 6.18). Вивчали популяції F_3 від двох комбінацій схрещування (табл. 6.18), отримані методом SSD (single seed descent) [267,678], так що рослини F_3 у кожній популяції є сукупністю поодиноких нащадків від кожної рослини F_2 . Оцінку остистості виконували на індивідуальних зрілих рослинах за трьома градаціями: безостий колос, остистий, колос має остеподібні відростки.

З праймерами мікросателітних локусів $Xgwm410$ та $Xwmc727$ продукту отримано не було. Продукт ампліфікації із праймерами локусів $Xwmc524-5AL$, $Xwmc577-5AL$, $Xwmc110-5AL$ та $Xwmc152-6B$ є мономорфним, тому їх було виключено із подальшої роботи (табл. 6.18). Спектри продуктів ампліфікації із праймерами локусу $Xgwm291-5AL$ (рис. 6.2) для генотипів МІ та Чорномор представлені подвійним компонентом, а у Леукурум та Кандиканс —одинарним. Очікуваний розмір продукту ампліфікації близько 120 п.н. Локус становить інтерес через тісне зчеплення із геном $B1$ [128].

Продукти ампліфікації із праймерами локусу $Xcfd2155-5AL$ [128] (рис. 6.3) демонструють поліморфізм лише при дуже доброму розділенні. Всі батьківські форми, крім Леукурума, мають продукти ампліфікації однакового розміру, а Леукурум – трохи легший.

Таблиця 6.18

**Наявність (+) та відсутність (–) поліморфізму в
електрофоретичних спектрах, отриманих з праймерами до низки
мікросателітних локусів, для компонентів схрещування двох гібридних
комбінацій**

№	SSR- локус	Хромосома, де локалізований SSR-локус	Комбінація схрещування	
			Рубрум x МІ	МІ x Леукурум
1	<i>Xgwm291</i>	5AL	+	+
2	<i>Xwmc524</i>	5AL	–	–
3	<i>Xgwm410</i>	5AL	відсутній продукт	відсутній продукт
4	<i>Xwmc577</i>	5AL	–	–
5	<i>Xcfd2155</i>	5AL	–	+
6	<i>Xwmc110</i>	5AL	–	–
7	<i>Xwmc727</i>	5AL	відсутній продукт	відсутній продукт
8	<i>Xcfd71</i>	4AS	+	+
9	<i>Xcfa2256</i>	4AS	+	–
10	<i>Xwmc516</i>	4AS	+	+
11	<i>Xwmc726</i>	6BL	+	–
12	<i>Xwmc152</i>	6BL	–	–
13	<i>Xgwm219</i>	6BL	+	–
14	<i>Xbarc178</i>	6BL	+	+

Мікросателітний локус *Xcfd71*-4AS (рис. 6.4) можна використовувати в комбінаціях, де в якості батьківської форми залучено генотип МІ, адже продукт ампліфікації його ДНК із праймерами цього локусу є дещо легшим, ніж в решти генотипів. Локус специфічний для 4D та 4A хромосом [128].

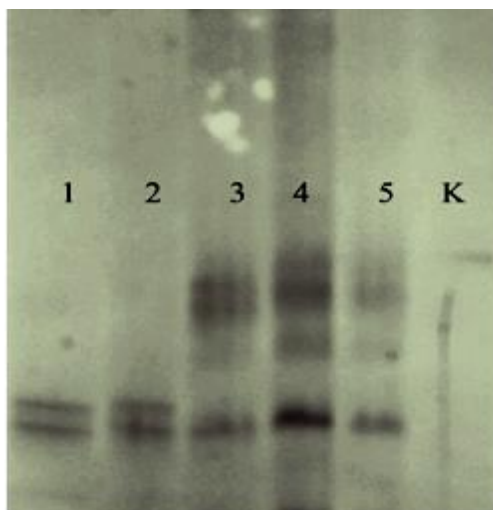


Рис. 6.2. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації генотипів твердої пшениці із праймерами локусу *Xgwm291-5AL*. 1 – МІ, 2 – Чорномор, 3 – Леукурум, 4 – Рубрум, 5 – Кандиканс. К – контроль (без ДНК).

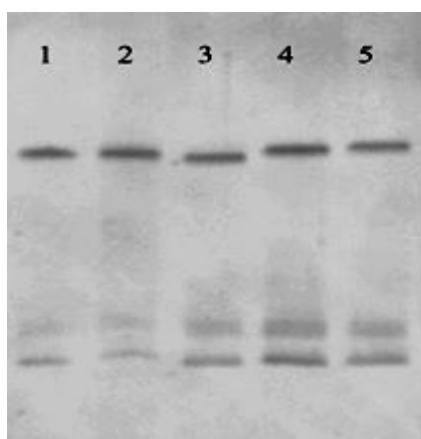


Рис. 6.3. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації генотипів твердої пшениці із праймерами локусу *Xcfd2155-5AL*. 1- МІ, 2 – Чорномор, 3 – Леукурум, 4 – Рубрум, 5 – Кандиканс.

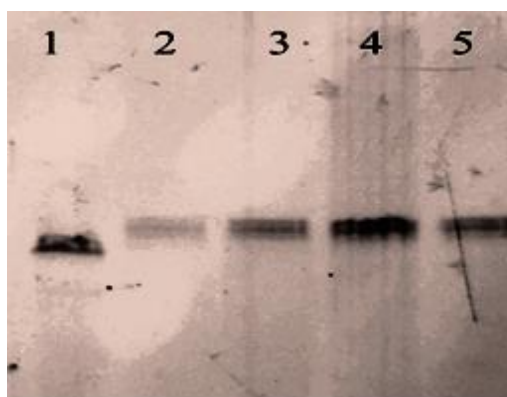


Рис. 6.4. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації генотипів твердої пшениці із праймерами локусу *Xcfd71-4AS*. 1- МІ, 2 – Чорномор, 3 – Леукурум, 4 – Рубрум, 5 – Кандиканс.

Поліморфізм за продуктами ампліфікації з праймерами локусу *Xcfa2256-4AS* (рис. 6.5) виявлено в комбінаціях, де як батьківську форму залучений генотип Рубрум. Притаманний йому продукт ампліфікації є легшим, ніж такий в інших генотипів. Різниця в молекулярній масі є

достатньою для адекватного розрізнення компонентів. Очікуваний розмір продукту ампліфікації близько 170 п.н.

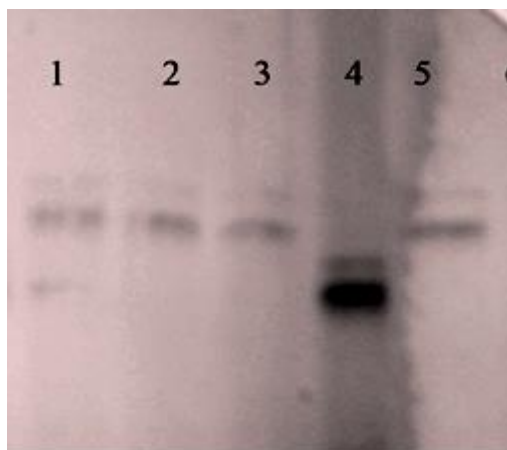


Рис. 6.5. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації генотипів твердої пшениці із праймерами локусу *Xcfa2256-4AS*. 1- МІ, 2 – Чорномор, 3 – Леукурум, 4 – Рубрум, 5 – Кандиканс.

ПЛР з праймерами локусу *Xwmc516-4AS*, згідно із його характеристикою [128], дає множинні продукти. Спектр продуктів його ампліфікації для генотипів твердої пшениці виявився поліморфним (рис. 6.6). Очікуваний продукт має мати розмір 130–150 п.н., тобто має бути в нижній частині спектру.

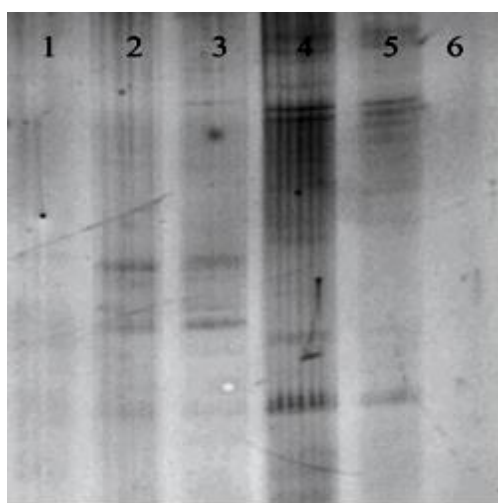


Рис. 6.6. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації генотипів твердої пшениці із праймерами локусу *Xwmc516-4AS*. 1- МІ, 2 – Чорномор, 3 – Леукурум, 4 – Рубрум, 5 – Кандиканс, 6 – контроль.

На 6ВL хромосомі знаходиться ген *B2*, один із інгібіторів остистості. Ми припускаємо, що в деяких із досліджених нами генотипів можуть бути присутні різні алелі цього гена [50]. Серед локусів, специфічних для 6В хромосоми, поліморфним виявився *Xgwm219-6ВL*. У генотипу МІ продукт ампліфікації, що утворюється із цією парою праймерів, є важчим, ніж в інших генотипів (рис. 6.7). Локус *Xgwm219-6ВL* можна використати для роботи із комбінаціями, в яких залучено генотип МІ.

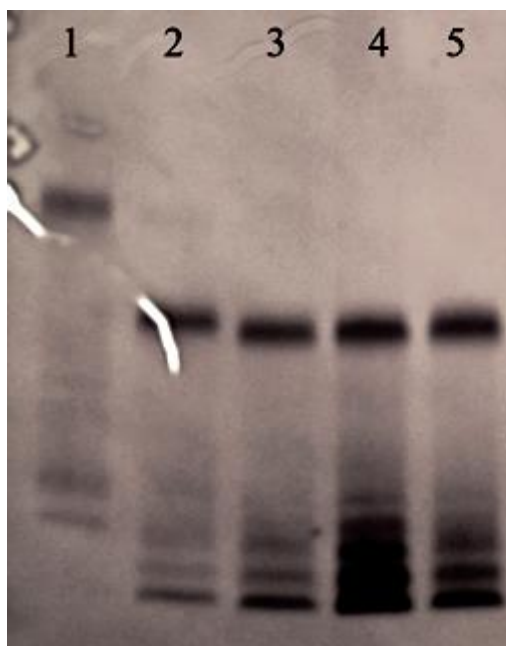


Рис. 6.7 Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації генотипів твердої пшениці із праймерами локусу *Xgwm219-6BL*. 1- МІ, 2 – Чорномор, 3 – Леукурум, 4 – Рубрум, 5 – Кандиканс.

Із праймерами локусу *Xwmc726-6BL* продукт ампліфікації утворюється лише в генотипу Рубрум (рис. 6.8). Тому навряд чи можна використовувати його для аналізу популяцій через можливість отримання хибно негативних результатів.

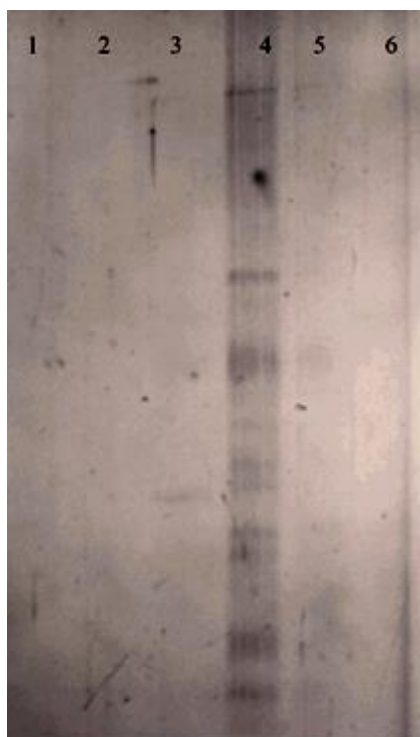


Рис. 6.8. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації генотипів твердої пшениці із праймерами локусу *Xwmc726-6BL*. 1- МІ, 2 – Чорномор, 3 – Леукурум, 4 – Рубрум, 5 – Кандиканс, 6 – контроль.

Із праймерами до локусу *Xbarc178-6B* продукт ампліфікації утворюється у всіх генотипів як поодинокий компонент, рухомість якого в генотипах МІ, Рубрум та Леукурум є різною.

Таким чином, для кожної із двох комбінацій схрещування, Рубрум х МІ та МІ х Леукурум, знайдено пари праймерів, що фланкують мікросателітні повтори на хромосомах 4А, 5А або 6В (табл. 6.19). Для можливої локалізації генів, що залучені до контролю остистості, слід було проаналізувати популяції F_3 за маркерами до кожної із зазначених хромосом.

SSR-локуси є кодомінантними молекулярними маркерами, отже розщеплення у F_2 за кожною парою праймерів очікується $1_{\text{гом}1} : 2_{\text{гетеро}} : 1_{\text{гом}2}$. Проте ми працювали з ДНК рослин F_3 , отриманих як поодинокі нащадки від кожної з рослин F_2 . Оскільки по одній насініні було взято від кожної рослини F_2 випадково, а тверда пшениця є самозапильовачем, очікуване співвідношення у F_3 становить $3_{\text{гом}1} : 2_{\text{гетеро}} : 3_{\text{гом}2}$. Перевірка відповідності розщеплення за алелями мікросателітних локусів у F_3 розщепленню $3 : 2 : 3$ показала справедливість нульової гіпотези для всіх мікросателітних локусів, які виявились моногенними, кодомінантними і алелі успадковуються випадково (табл. 6.19).

Щодо ознаки остистість, при моногенному контролі і двох фенотипних класах у F_3 очікували співвідношення 5 безості : 3 остеподібні відростки для комбінації МІ та Рубрум. При дигенному контролі у комбінації МІ та Леукурум – 15 остисті : 34 остеподібні відростки : 15 безості. Це було підтверджено результатами оцінки фенотипів (табл. 6.20).

У комбінації схрещування МІ х Рубрум відбувається розщеплення за геном *Bl*, розташованим у хромосомі 5А, та за мікросателітними локусами *Xgwm291-5AL* і *Xcfd2155-5AL*, розташованими у тій самій хромосомі. Якщо ці гени не зчеплені, у середині кожного з фенотипних класів, безості рослини та рослини з остеподібними відростками, за мікросателітними алелями буде спостерігатися розщеплення $3_{\text{гом}1} : 2_{\text{гетеро}} : 3_{\text{гом}2}$ за алелями мікросателітних локусів. У комбінації МІ х Леукурум, за нашими припущеннями, відбувається

розщеплення за двома генами, *B1* та *Bn*, один з яких може бути розташованим у хромосомі 5А, другий – у хромосомі 6В. Якщо жоден з генів остистості не зчеплений з локусом *Xcfd2155-5AL* чи *Xbarc178-6B*, в кожному фенотипному класі буде спостерігатися розщеплення за алелями мікросателітного локусу 3 гомо1: 2 гетеро: 3 гомо2. (табл. 6.21).

Таблиця 6.19

Перевірка розподілу генотипів за алелями мікросателітних локусів у різних комбінаціях F₃ на відповідність теоретично очікуваному розщепленню 3 гомо1: 2 гетеро: 3 гомо2

Локус та комбінація схрещування	Кількість особин з генотипом			χ^2	P
	гомо1	гетеро	гомо2		
Рубрум x МІ					
<i>Xgwm291-5AL</i>	19	6	12	3,29	>0,05
<i>Xcfd2155-5AL</i>	28	27	29	2,30	>0,05
<i>Xcfd71-4AS</i>	37	25	21	5,27	>0,05
<i>Xgwm219-6BL</i>	21	8	26	3,81	>0,05
<i>Xbarc178-6B</i>	33	26	27	1,81	>0,05
МІ x Леукурум					
<i>Xcfd2155-5AL</i>	24	30	32	5,47	>0,05
<i>Xbarc178-6B</i>	31	31	25	5,80	>0,05
<i>Xcfd71-4AS</i>	24	28	31	4,16	>0,05

Таблиця 6.20

Розщеплення рослин F₃ за ознакою остистість

Комбінація схрещування	Теоретичне співвідношення класів	Емпіричні обсяги класів у F ₃	χ^2 та оцінка P
МІ x Рубрум	5 БО : 3 ОВ	83 БО+ 33 ОВ	2,08 P>0,05
МІ x Леукурум	15 БО : 34 ОВ : 15 О	43 БО + 69 ОВ + 27 О	4,61 P>0,05

Таблиця 6.21

**Перевірка розподілу генотипів за алелями мікросателітних локусів
у різних фенотипних класах F₃ на відповідність теоретично очікуваному
розщепленню 3_{гомо1}: 2_{гетеро}: 3_{гомо2}**

Локус та розщеплення серед різних за остистістю фенотипних класів	Кількість особин з генотипом			χ^2	P ¹⁾
	гомо1	гетеро	гомо2		
Рубрум x МІ					
<i>Xgwm291-5AL</i> , безості	14	4	7	3,69	>0,05
остеподібні відростки	4	2	4	¹⁾	=1,00
<i>Xcfd2155-5AL</i> , безості	21	13	26	0,91	>0,05
остеподібні відростки	9	8	44	0,38	>0,05
<i>Xcfd71-4AS</i> , безості	15	12	18	0,33	>0,05
остеподібні відростки	11	2	8	3,25	>0,05
<i>Xgwm219-6BL</i> , безості	12	5	17	2,90	>0,05
остеподібні відростки	6	2	8	¹⁾	=0,736
<i>Xbarc178-6B</i> , безості	27	18	15	4	>0,05
остеподібні відростки	7	6	7	0,27	>0,05
МІ x Леукурум					
<i>Xcfd2155-5AL</i> , безості	6	5	2	¹⁾	=0,484
остеподібні відростки	16	15	17	1,79	>0,05
Остисті	9	7	8	0,28	>0,05
<i>Xbarc178-6B</i> , безості	2	6	13	7,83	<0,05
остеподібні відростки	18	15	12	2,73	>0,05
Остисті	6	7	0	¹⁾	=0,04
<i>Xcfd71-4AS</i> , безості	5	3	3	¹⁾	=1,00
остеподібні відростки	12	15	15	2,86	>0,05
Остисті	7	8	9	1,11	>0,05

Примітка: ¹⁾ використано двобічний точний критерій Фішера [575].

Відхилення емпіричного співвідношення розщеплення від очікуваного спостерігали тільки у комбінації МІ х Леукурум за локусом *Xbarc178*. Серед остистих рослин не було таких з алелем, специфічним для генотипу МІ (безоста форма). Серед безостих рослин спостерігалася нестача рослин з алелем, специфічним для генотипу Леукурум, та надлишок рослин з алелем, специфічним для генотипу МІ. Позаяк локус *Xbarc178* розташований у хромосомі 6В, слід припустити, що домінантний промотор остистості B_n також локалізований у цій хромосомі та перевірити наявність зчеплення між локусом *Xbarc178* та геном B_n .

Для розрахунку зчеплення між локусом *Xbarc178* та геном B_n розробили алгоритм встановлення величини θ за даними розщеплення у F_3 за двома локусами методом максимальної правдоподібності через застосування методу Lod scores [218]. Було взято до уваги, що фенотипні класи за ознакою остистість формуються за умов розщеплення за двома генами, $B1$ та B_n , так що у цілому у розщепленні брало участь три гени, два з яких, B_n , та локус *Xbarc178*, мають бути перевірені на наявність зчеплення. Загальна кількість фенотипних класів у сумісному розщепленні за алелями мікросателітного локусу та двома генами остистості — дев'ять. Тому правдоподібність значення θ розраховували за формулою

$$L = \frac{N!}{n_1!n_2!n_3!n_4!n_5!n_6!n_7!n_8!n_9!} a^{n_1} b^{n_2} c^{n_3} d^{n_4} e^{n_5} f^{n_6} g^{n_7} h^{n_8} i^{n_9}, \text{ де величини } n_1 \dots n_9 \text{ є}$$

обсягами фенотипних класів (табл. 6.22), а величини $a \dots i$ — є частками кожного фенотипного класу залежно від величини θ . Оскільки ми працювали з популяціями F_3 , величина θ у розрахунку величин $a \dots i$ враховувалась двічі: 1) гібриди F_1 формують чотири сорти гамет, 2 сорти $0,5\theta$ рекомбінантних та 2 сорти $0,5(1-\theta)$ нерекомбінантних; 2) частоти гамет, які формують рослини F_2 , встановлюються для кожного генотипного класу окремо з уведенням однієї і тієї самої величини θ для вираховування величини рекомбінації між досліджуваними генами. Рослини F_2 у пшениці самоzapиллюються, тому частоти зигот від об'єднання різних гамет, що утворюються з різною частотою, яка

залежить від величини θ , розраховуються для кожного генотипного класу, і обсяги фенотипних класів у F_3 утворюються на основі частот однакових зигот, які формуються різними рослинами F_2 з різною частотою. Розрахунки виконано з застосуванням програмного пакету Excel. Величина θ шукається у межах від 0 (повне зчеплення між генами) до 0,5 (вільне комбінування генів). Встановлено, що локуси *Xbarc178* та *B1* комбінуються незалежно, а між локусами *Xbarc178* та *B_n* визначається зчеплення з рекомбінацією $\theta = 0,25$. За функцією Косамбі, це 27,5сМ [438]. Отже, генотип остистого сорту твердої пшениці Леукурум у хромосомі 6В несе домінантний промотор остистості, позначений нами як *B_n*, оскільки ми припускаємо його алельність гену *B2* м'якої пшениці. Зважаючи на те, що відстань між генами встановлювалась на популяції F_3 , рослини якої утворилися після двох подій мейозу, відстань між генами може виявитися дещо іншою при вивченні рослин F_2 чи аналізуючого беккросу, які формуються після проходження гібридами одного мейозу.

Таблиця 6.22

**Результати пошуку зчеплення між локусом *Xbarc178* та геном *B_n* у F_3
комбінації МІ x Леукурум**

1)	Теоретичні частоти класів при		Генотип за мікросат елітом ²⁾	Фенотип за остистістю	3)	Обсяг класів	
	$\theta = 0,5$	$\theta = 0,25$				емпіри чних	теорет. при $\theta =$ 0,25
a	0,087891	0,01631	СС	безості	n ₁	2	1,29
b	0,199219	0,227851	СС	остеп.відр.	n ₂	18	18,00
c	0,087891	0,130839	СС	остисті	n ₃	6	10,34
d	0,058594	0,03526	Сс	безості	n ₄	6	2,79
e	0,132813	0,142146	Сс	остеп.відр.	n ₅	15	11,23
f	0,058594	0,072594	Сс	остисті	n ₆	7	5,73
g	0,087891	0,182804	сс	безості	n ₇	13	14,44
h	0,199219	0,161253	сс	остеп.відр.	n ₈	12	12,74

Продовження табл. 6.22

1)	Теоретичні частоти класів при		Генотип за мікросат елітом ²⁾	Фенотип за остистістю	3)	Обсяг класів	
	$\theta = 0,5$	$\theta = 0,25$				емпіри чних	теорет. при $\theta =$ 0,25
i	0,087891	0,030942	сс	остисті	n ⁹	0	2,44
	1	1				79	79
$Z=3,43$ ($p<0,01$) при $\theta = 0,25$			$\chi^2= 7,91$ (після об'єднання класів), $p > 0,05$				

Примітки: ¹⁾ частки фенотипних класів; ²⁾ С – алель мікросателітного локусу, властивий генотипу Леукурум, с – генотипу МІ; ³⁾ обсяги фенотипних класів.

6.2.2. Генетичний аналіз інтрогресивних ліній за остистістю колосу.
Лінії – похідні Аврозису. Інтрогресивні лінії, що ми їх вивчали за ознакою остистість, походять від геномно-заміщених гексаплоїдних амфідиплоїдів Аврозису та Авролати [676]. Як докладно вказувалось у підрозділі 2.1, лінії отримані від кількарязового беккросування гексаплоїдного гібрида Аврозис x Аврора (геном AABBD^{S^h}) та Авролата x Аврора (геном AABBDU) з сортом Аврора до відновлення самофертильності нащадків. Тому теоретично гексаплоїдні фертильні лінії, які було отримано в результаті цієї роботи, мали один і той самий компонент геному AABV та розрізнялись за кількістю та структурою хромосом геномів D та S^h для ліній – похідних Аврозису та D і U для ліній – похідних Авролати [36]. Як вже було вказано, сорт Аврора є безостим за рахунок гена *Bl*. Колос *Ae. umbellulata* (UU) має дуже розвинені ості. Це вказує на наявність у геномі U промотора та відсутність інгібітора остистості. Авролата з геномом AABBUU характеризується добре розвиненими остеподібними відростками. Колос *Ae. sharonensis* також остистий, хоча ості більш слабкі, ніж у егілопса зонтичного. Аврозис, як і Авролата, характеризується проміжним розвитком ознаки: ості є, проте більш слабкі порівняно з диплоїдним носієм гена-промотора остистості. Розвиток на колосі

Авролати та Аврозиса остеподібних відростків свідчить, що інгібітор *B1* генома Аврори не є повністю епістатичним стосовно промотора остистості егілопсів, який позначимо як *Awn1*.

Інші геномно-заміщені амфідиплоїди, що об'єднують субгеноми АВ та геном диплоїдного спорідненого виду, також мають більш слабкий розвиток остей, ніж вид — донор третього субгеному амфідиплоїду. Це Авроале (AABBRR), R від остистого *Secale cereale* L., Авродес (AABBSS), S від остистого *Ae. speltoides* [37]. Отже, ген *B1* поводитья як ген з неповним домінантним епістазом стосовно генів — промоторів остистості чужинного походження. Повністю безостим є амфідиплоїд Авротіка (AABBTT), третій субгеном якого, T, отримано від *Ae. mutica*, безостого виду [37].

Перш за все було досліджено інтрогресивні лінії з генетичним матеріалом від *Aegilops sharonensis*, обсяг та локалізація якого у різних лініях розрізняється [54]. Лінії відрізнялися одна від одної кількома морфологічними ознаками, зокрема, ступенем розвитку остей, та були піддані гібридологічному аналізу з застосуванням гібридів F₁ та F₂ від кількох комбінацій схрещування.

Серед 16 вивчених ліній (табл. 6.23) одна була безоста як сорт Аврора, три мали остеподібні відростки, як у Аврозису, решта були остистими. Поява в інтрогресивних лініях рецесивної ознаки (остистість) може бути пояснена тільки через втрату ними гена *B1*, можливо через делецію частини хромосоми під час схрещувань [(Аврозис x Аврора)BC₁₋₃ з Авророю]. Досліджуючи тверду пшеницю, ми встановили, що ген — промотор остистості *B_n*, розташований у хромосомі 6В. Беручи до уваги інформацію про гомеологію генів у *Triticinae* [14,579], можна припустити, що ген-промотор остистості егілопсу розташований у хромосомі 6S^{sh}. Крім того, результати оцінювання великої кількості створених нами хромосомно-заміщених ліній пшениці з чужинними хромосомами від *Ae. umbellulata*, *Ae. sharonensis*, *Ae. speltoides*, *Agropyron glaucum* показало, що наявність чужинної хромосоми із гомеологічної групи 6 супроводжується появою остей на колосі з різним ступенем експресії ознаки [14]. Коли субгеном АВ є гомозиготним за геном *B1*, лінії, що містять пару

гомологічних хромосом з геном-промотором остистості *Awn1*, демонструють такий фенотип, як у Аврозису, наявність остевидних відростків. Якщо лінія не має генів-промоторів остистості, вона безоста, як сорт Аврора. Лінія, в якій наявний ген *Awn1* проте, відсутній домінуючий інгібітор остистості *B1*, характеризується повним розвитком остей. Причому в лініях ознака характеризується більшою експресією порівняно з егілопсом, від якого отримано ген-промотор. Можливо, це є наслідком адитивної взаємодії цього гена та іншого промотора остистості, b_n , локалізованого раніше на хромосомі 6D сорту Кавказ, сестринської лінії сорту Аврора, яка відрізняється від сорту Аврора тільки за датою колосіння [31], гіпостатичний до гену *B1* [61]. Про вплив хромосоми 6D на розвиток остей повідомлялось для сорту м'якої пшениці Казахстанська 126 [73]. За нашою гіпотезою, лінія з делецією гена *B1*, але без гена *Awn1* буде мати остеподібні відростки завдяки впливу промотора остистості b_n , наявного у хромосомі 6D (табл. 6.23).

Таблиця 6.23

Гіпотетичні генотипи досліджуваних форм пшениці щодо генів, які контролюють остистість колосу

Генотипи зразків пшениці			Фенотипи зразків пшениці	
5AL	6D	6S ^{sh}		
<i>B1B1</i>	b_nb_n		безості (Б)	Сорт Аврора
<i>B1B1</i>		<i>Awn1Awn1</i>	остеподібні відростки (ОВ)	Аврозис
<i>B1B1</i>	b_nb_n		безості	Лінія res 134
<i>B1B1</i>		<i>Awn1Awn1</i>	остеподібні відростки	Лінії res 115, 127, 135
<i>del del</i> ¹⁾	b_nb_n			
<i>del del</i>		<i>Awn1Awn1</i>	остисті (О)	лінії res 117, 118, 121, 122, 128, 132, 137, 138, 139, 140, 146, 148

Примітки: ¹⁾ Позначено делецію гена *B1*.

Всі гібриди F_1 від схрещування остистих ліній одна з одною були остистими. У F_2 від деяких схрещувань було знайдено кілька рослин з остеподібними відростками замість повноцінних остей (табл. 6.24). При досліджуванні цієї групи інтрогресивних ліній за ознакою стійкість до борошнистої роси (див. підрозділ 6.4) нами було показано, що гібридологічний аналіз інтрогресивних ліній обов'язково має супроводжуватися вивченням конфігурації хромосом у метафазі 1 мейозу гібридів F_1 від схрещування рослин, які піддаються генетичному аналізу [835]. Детально це питання висвітлено у розділах 3 та 4 дисертації. Наявність обов'язкових унівалентів на цій стадії мейозу виявилось фактором, що спотворює фактичні співвідношення розщеплення у популяціях F_2 проти тих, що очікуються на основі певних припущень про генетичний контроль ознаки [59,835], оскільки унівалентні хромосоми порівняно з членами хромосомних пар мають знижену можливість увійти до складу гамет. А гамети з незбалансованим хромосомним набором (перш за все, чоловічі) характеризуються зниженою життєздатністю. Обидві причини є не тільки факторами спотворення очікуваних співвідношень розщеплення, а і появи у популяціях, що розщеплюються, неочікуваних фенотипних класів.

За результатами вивчення хромосомних конфігурацій у метафазі 1 мейозу гібридів F_1 від схрещування остистих інтрогресивних ліній (наведено у пункті 4.1.2, таблиця 4.3) їх можна розділити на дві групи: гібриди першої групи не характеризуються присутністю у метафазі обов'язкових унівалентів (ліва колонка табл. 6.24). Гібриди другої групи мають мати обов'язкові уніваленти завдяки особливостям структури геному компонентів схрещування (права колонка таблиці). Крім обов'язкових у М1 мейозу з'являються необов'язкові уніваленти, які свідчать про послаблення гомології між парами гомологічних хромосом.

Таблиця 6.24

Розщеплення у F₂ від схрещування остистих ліній одна з одною

Комбінація схрещування	Фенотип рослин		Комбінація схрещування	Фенотип рослин	
	О	ОВ		О	ОВ
Гібриди 1-го типу			Гібриди 2-го типу		
117 x 128	279	4	118 x 148	23	0
118 x 128	102	0	121 x 128	100	0
132 x 146	54	0	148 x 128	154	3
121 x 146	243	4	121 x 117	224	5
122 x 148	39	0	140 x 146	24	0
137 x 128	52	2	122 x 139	120	2
128 x 137	192	2	128 x 148	19	4
132 x 122	311	1	132 x 117	165	9
137 x 118	49	1	146 x 140	13	1
138 x 118	72	1			
146 x 121	78	1			

Частота появи неочікуваного фенотипу (остеподібні відростки) серед гібридів першого типу була удвічі менша ($1,08 \pm 0,27$ %), ніж серед гібридів другого типу ($2,77 \pm 0,56$ %). Схоже, що у першому випадку такі рослини з'являються внаслідок цитологічної нестабільності власне інтрогресивних ліній, що було виявлено при їхньому вивченні [23]. А зростання частки таких рослин серед гібридів другого типу відбувається через наявність унівалентних хромосом у мейозі гібридів F₁. При цьому не обов'язково досліджуваний ген повинен знаходитися у складі унівалентної хромосоми. Розрахунки показують [835], що загальна нестабільність мейозу гібрида з унівалентними хромосомами призводить до формування у нього різних за хромосомним складом гамет, що може відбиватися на розщепленні за різними генами, в тому числі і за тими, які з унівалентними хромосомами прямо не пов'язані. Проте наслідки цитологічної

нестабільності інтрогресивних ліній для результату генетичного аналізу стають очевидними перш за все тоді, коли з'являються непередбачені фенотипні класи, як при появі поодиноких рослин з остеподібними відростками при схрещуванні двох остистих рослин. Наслідки нерегулярного розходження хромосом у мейозі можуть бути не такими помітними, якщо відбувається очікуване розщеплення на кілька фенотипних класів, а класифікація рослин за класами може відбуватися з помилками, саме це характерно при оцінюванні рослин за остистістю. Виходячи з цих міркувань, вважаємо, що дані оцінювання першого та другого поколінь від схрещування остистих ліній одна з одною показують, що вони мають однакове генетичне забезпечення щодо ознаки остистість колосу, а поява рослин без розвинених остей пов'язана з особливостями проходження мейозу та формуванням незбалансованих гамет.

Всі гібриди F_1 від схрещування безостих рослин (сорт Аврора і лінія 134) з остистими були з остеподібними відростками (ОВ), а у F_2 спостерігали розщеплення на остисті, безості та рослини з остеподібними відростками. Після перевірки на різномірність результати оцінки декількох комбінацій схрещування були об'єднані з таким спільним результатом розщеплення у F_2 : 262(ОВ) + 144(О) + 83(Б). Від схрещування $B1B1b_nb_n \times del\ del\ Awn1\ Awn1$ у F_2 очікуємо 8 (ОВ) : 5(О) : 3(Б), виходячи з таких відповідноостей між генотипом та фенотипом рослин:

1 $del\ del\ Awn1\ Awn1$ (О)	1 $B1B1\ Awn1Awn1$ (ОВ)	2 $delB1Awn1Awn1$ (О)
2 $del\ del\ Awn1b_nb_n$ (О)	2 $B1B1Awn1b_nb_n$ (Б)	4 $del\ B1\ Awn1b_nb_n$ (ОВ)
1 $del\ del\ b_nb_nb_n$ (ОВ)	1 $B1B1\ b_nb_nb_n$ (Б)	2 $del\ B1\ b_nb_nb_n$ (ОВ)

Емпіричне розщеплення 246 (ОВ) + 154 (О) + 92 (Б), $\chi^2=3,01$, від теоретичного не відрізняється. Якщо брати до уваги, що хромосоми з одним з критичних для ознаки остистість генів не формують бівалент і в заплідненні беруть участь лише еуплоїдні чоловічі та всі жіночі гамети, співвідношення фенотипних класів буде 16 (ОВ) : 10 (О) : 6 (Б), тобто таке саме (табл. 6.25).

Таблиця 6.25

Дані до формування співвідношення розщеплення за ознакою остистості¹⁾ за умов наявності у М1 мейозу двох унівалентів, участі у заплідненні лише еуплоїдних чоловічих та всіх жіночих гамет та життєздатності всіх зигот з кількістю хромосом 41-43

Склад і частота гамет		<i>bn B1</i>	<i>Awn B1</i>	<i>bn del</i>	<i>Awn del</i>
чоловічих		0,25	0,25	0,25	0,25
жіночих					
<i>bn Awn1 B1</i>	0,0313	0,007813	0,007813	0,007813	0,007813
<i>bn B1</i>	0,0938	0,023438	0,023438	0,023438	0,023438
<i>Awn1 B1</i>	0,0938	0,023438	0,023438	0,023438	0,023438
<i>B1</i>	0,2813	0,070313	0,070313	0,070313	0,070313
<i>bn Awn1 del</i>	0,0313	0,007813	0,007813	0,007813	0,007813
<i>bn del</i>	0,0938	0,023438	0,023438	0,023438	0,023438
<i>Awn1 del</i>	0,0938	0,023438	0,023438	0,023438	0,023438
<i>del</i>	0,2813	0,070313	0,070313	0,070313	0,070313

¹⁾Примітка

Колос безостий	Колос з остеподібними відростками	Колос остистий
----------------	--------------------------------------	----------------

Однак сумнівним для нас щодо фенотипної оцінки залишається клас *2 delB1Awn1Awn1(O)*. Остистими ми вважаємо рослини з таким генотипом тому, що вони наповнюють до потрібної кількості клас остистих так, щоб співвідношення 8 (OB) : 5(O) : 3(B) наближається до того, що спостерігається нами. Насправді зрозуміло, що ми можемо помилятися у фенотипній оцінці рослин, і рослини, які мають бути оцінені як з остеподібними відростками, помилково відносяться нами до безостих чи остистих. Уточнити результат фенотипної оцінки рослин F₂ можна лише за фенотипами їхніх нащадків F₃, чого зроблено не було. І очікуване співвідношення розщеплення так і залишилось 8 (OB) : 5(O) : 3(B).

Лінія res 115 з остеподібними відростками при схрещуванні з Авророю має F_1 з остеподібними відростками, а гібриди двох інших ліній з таким самим фенотипом, res 127 та res 135 — безості. Це вказує на різну генетичну основу ознаки у згаданих ліній. Якщо гібриди F_1 безості, лінії мають генотип $B1B1 Awn1Awn1$ і гібрид безостий, тому, що гомозиготний за геном $B1$. Якщо гібрид напівостистий, він гемізіготний за геном $B1$, отже лінія res 115 має генотип $del\ del\ b_n b_n$. Тоді у F_2 від схрещування лінії res 115 ($del\ del\ b_n b_n$) з безостими рослинами буде розщеплення 3 ОВ : 1 Б. Дійсно, емпіричне розщеплення 48 (ОВ) + 19 (Б) від такого не відрізняється ($\chi^2=0,40$) серед F_2 від схрещування res 115 x res 134. Те саме стосується F_2 від схрещування res 115 з Авророю: 72 ОВ + 23 Б ($\chi^2=0,03$). Від схрещування res 135 (ОВ) x res 134 (Б) у F_2 очікується 1 (ОВ) : 3 (Б). Спостерігаємо 19 (ОВ) + 54 (Б), $\chi^2=0,04$.

Проте ніяк не можна виключити можливість того, що вивчені лінії з однаковим фенотипом (остисті) мають деякі генетичні відмінності одна від одної, зважаючи на складну та мало вивчену генетичну природу остистості. Не можна бути впевненим, що геном *Ae. sharonensis* має тільки один промотор остистості, як ми припускаємо за даними нашого дослідження, у хромосомі 6S^{sh}. Не можна також виключити, що субгеном D пшениці несе промотор остеподібних утворень не тільки у хромосомі 6D. З'ясування цього питання потребує подальшого дослідження з залученням у схрещування інших остистих та напівостистих інтрогресивних ліній пшениці, похідних як Аврозису, так і інших геномно-заміщених амфідиплоїдів.

6.2.3. Генетичний аналіз інтрогресивних ліній за остистістю колосу.
Лінії – похідні Авролати. Для хромосомної локалізації генів, що контролюють ознаку остистість, було обрано дві інтрогресивні лінії — похідні Авролати: остиста лінія res206 та безоста res211. ДНК ліній та їхніх гібридів F_1 та F_2 використали для отримання електрофоретичних спектрів з праймерами мікросателітних локусів, специфічних до хромосом 5A, 6B та 6D (табл. 6.26). Безоста лінія res211 навряд чи відрізняється від сорту Аврора за генами $B1$ та b_n . Остиста лінія res206 отримала від егілопсу промотор остистості *Awn1* у

складі цілої хромосоми егілопса чи транслокації хромосоми егілопса на хромосому пшениці.

Таблиця 6.26

**Спектри ампліфікації ДНК інтрогресивних ліній, Аврори та Авролати з
праймерами SSR- локусів, специфічних до хромосом 5A, 6B та 6D**

SSR-локус та локалізація	Опис електрофоретичних компонентів при ампліфікації геномної ДНК			
	Аврори	Авролати	лінії res206	лінії res211
<i>Xbarc141-5A</i>	поодинокий	як у Аврори слабкий	немає	як у Аврори
<i>Xwmc705-5AL</i>	поодинокий слабкий	як у Аврори слабкий	немає	як у Аврори
<i>Xwmc410-5A</i>	поодинокий	Немає	як у Аврори слабкий	як у Аврори
<i>Xwmc110-5A</i>	поодинокий	як у Аврори	як у Аврори	як у Аврори
<i>Xcfa2155-5A</i>	поодинокий	як у Аврори	як у Аврори	як у Аврори
<i>Xwmc105-6B</i>	поодинокий	як у Аврори	як у Аврори	як у Аврори
<i>Xbarc134-6B</i>	поодинокий	як у Аврори	три специфічні компоненти	три специфічні компоненти
<i>Xbarc24-6B</i>	поодинокий	як у Аврори	як у Аврори	як у Аврори
<i>Xbarc178-6B</i>	поодинокий	як у Аврори	як у Аврори	як у Аврори
<i>Xcfa2110-6B</i>	поодинокий	поодинокий специфічний	немає	як у Аврори + як у Авролати
<i>Xgwm219-6B</i>	поодинокий	як у Аврори	як у Аврори	як у Аврори
<i>Xcfd132-6D</i>	поодинокий слабкий	як у Аврори	як у Аврори	як у Аврори слабкий
<i>Xcfd33-6D</i>	немає	поодинокий специфічний	як у Авролати	немає

SSR-локус та локалізація	Опис електрофоретичних компонентів при ампліфікації геномної ДНК			
	Аврори	Авролати	лінії res206	лінії res211
<i>Xcfd76-6D</i>	поодинокий	немає	немає	як у Аврори
<i>Xcfd60-6D</i>	поодинокий	немає	немає	як у Аврори
<i>Xcfd188-6D</i>	всі спектри різні			
<i>Xcfd5-6D</i>	поодинокий	немає	як у Аврори слабкий	як у Аврори
<i>Xcfd49-6D</i>	поодинокий	немає	немає	поодинокий специфічний
<i>Xcfd45-6D</i>	поодинокий	немає	немає	як у Аврори
<i>Xcfd95-6D</i>	поодинокий	немає	немає	як у Аврори
<i>Xcfd287-6D</i>	немає	немає	поодинокий	немає

Беручи до уваги склад геномів вихідних генотипів, схрещування яких дало початок інтрогресивним лініям — AABBUU та AABBD, — варто очікувати, що заміщення відбулось за хромосомами геному D. Авролати, хоча має гомозиготний промотор остистості *Awn1*, характеризується остеподібними відростками через наявність гена *B1* (хромосома 5A). Щоб бути остистою, лінія res206 має відрізнятися від Авролати за геном *B1*. Це можливо через делецію термінального регіону довгого плеча хромосоми 5A, де локалізований ген *B1*, або мутацію у цьому гені, яка зробила його не функціональним.

За даними вивчення мейозу в МКП гібрида F₁ між лініями та Авророю, геном лінії res206 характеризується декількома змінами стосовно геному Аврори. Два облігатні уніваленти свідчать про наявність у геномі лінії або заміщеної чужинної хромосоми або великої хромосомної перебудови, такої як транслокація з участю чужинної хромосоми. Телоцентричних хромосом чи дицентриків немає. Лінія res211 не має відмінностей у хромосомному наборі стосовно Аврори (табл. 4.4 та 4.5).

Для вивчення структури геномів інтрогресивних ліній щодо хромосом, які містять задіяні у контролі остистості гени, стосовно хромосом генотипу Аврора було використано мікросателітний аналіз із застосуванням мікросателітів, специфічних до хромосом 5A та 6B, в яких локалізовано відомі інгібітори остистості у м'якої пшениці *B1* та *B2*, а також хромосоми 6D, оскільки, за нашими попередніми даними [53,61], в цій хромосомі розташований промотор остистості *b_n*.

При порівнянні спектрів ампліфікації з праймерами, специфічними для хромосоми 6B, очікувані результати отримано для локусів *Xwmc105-6B*, *Xbarc178-6B*, *Xbarc24-6B*, *Xgwm219-6B*: продукти ампліфікації всіх чотирьох зразків ДНК не відрізнялись один від одного. Праймери локуса *Xbarc134-6B* з ДНК інтрогресивних ліній утворюють три компоненти замість одного, притаманного геномам Аврори та Авролати. Якщо це свідчить про якусь перебудову хромосоми 6B в цих лініях, перебудова не зачіпає ген, що впливає на остистість, оскільки досліджувані лінії контрастні за цією ознакою. Праймери локуса *Xcfa2110-6B* дали різні результати ампліфікації у всіх чотирьох зразках.

Продукти ампліфікації ДНК чотирьох вивчених генотипів з праймерами локусів *Xwmc110-5A* та *Xwmc2155-5A* були однаковими. А з праймерами локусів *Xwmc705-5AL* та *Xbarc141-5A* ДНК лінії *res206* ампліфікації не дала на відміну від ДНК Аврори, Авролати та лінії *res211*. Локуси *Xwmc705-5AL* та *Xbarc141-5A* картовані на довгому плечі хромосоми 5A, так само, як ген-інгібітор остистості *B1*, хоча і на деякій відстані від нього [625]. Отримані дані свідчать на користь припущення про делецію термінальної ділянки плеча 5AL або його перебудову, яка зачіпає і ген *B1*, і мікросателітний локус. В обох випадках у МІ мейозу гібриду F₁ лінії з сортом Аврора може спостерігатися гетероморфний або відкритий бівалент або два уніваленти замість нього, що і мало місце (табл. 4.4).

З 10 перевірених SSR-локусів хромосоми 6D специфічними були лише шість. Кожен з них дав продукти ампліфікації з ДНК Аврори та лінії *res 211*,

але не з ДНК Авролати та лінії res 206. Тому було припущено, що лінія res206 має заміщення 6D/6U, чим і пояснюється наявність двох облігатних унівалентів у МІ мейозу МКП гібридів res206 x Аврора та res211 x res206 (табл. 4.4, 4.5).

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

За результатами мікросателітного аналізу ліній та їхніх гібридів та з урахуванням прийнятих нами у попередньому пункті дисертації припущень про генетичний контроль остистості можна запропонувати такі гаплотипи досліджуваних ліній:

лінія res206: *b1* (або делеція *delBl*) (5A) *Awn1* (6U);

лінія res211: *Bl* (5A) *b_n* (6D).

Як вказувалось у попередньому пункті роботи, *Bl* – домінантний інгібітор остистості сорту Аврора, локалізований у хромосомі 5A, *Awn1* – домінантний промотор розвитку остей, наявний у хромосомі 6U та гіпостатичний до гена *Bl*, у присутності останнього ості редукуються до добре виражених остеподібних відростків, *b_n* – промотор остеподібних відростків, які розвиваються тільки у відсутності домінантного алеля *Bl*. Оскільки *b_n*

розташований у хромосомі 6D, гомеологічної до 6U, можна припустити його алельність до *Awn1* та позначити як *awn1*.

Колос гібрида F_1 від схрещування *res206* x *res211* має остеподібні відростки. Серед нащадків F_2 від дигібридного схрещування (розщеплюються гени *Awn1-awn1* та *B1-b1*, домінування повне) гени інгібітор і промотор остистості та остеподібних відростків будуть зустрічатися в різних комбінаціях та мають сформувані такі співвідношення між фенотипними класами: 9 частин *B1-Awn1-* та 1 частина *b1b1 awn1 awn1* — колос з остеподібними відростками, 3 частини *B1- awn1 awn1* — колос безостий, 3 частини *b1b1 Awn1-* колос остистий. Фактично спостерігали 25 безостих, 15 остистих та 37 з остеподібними відростками, що очікуваному співвідношенню не відповідає ($\chi^2=10,32$, $p<0,01$).

Хоча ознака остистість колоса вважається якісною та такою, що піддається альтернативній оцінці, її оцінка не завжди є однозначною в тому плані, що впевнено відрізнити остистий фенотип від напівостистого, коли остеподібні відростки виражені добре, не завжди можна. Точно так, можна помилитися та віднести до безостих форм рослини із слабо вираженими остеподібними відростками. Перевірити, чи правильно оцінено фенотип рослини F_2 , можна за даними розщеплення у F_3 . Так, виходячи з нашої гіпотези генетичного контролю ознаки, безості рослини не мають мати серед нащадків рослин з остеподібними відростками, тим більш, з остями. Якщо такий випадок спостерігався і серед рослин F_3 , нащадків від самозапилення рослини F_2 , безостої за нашою оцінкою, переважали рослини з остеподібними відростками, або зустрічалася остиста рослина, фенотип рослини F_2 був визначений як безостий помилково — рослина мала бути класифікована як рослина з остеподібними відростками (табл. 6.27). Остисті рослини F_2 серед нащадків F_3 не мали мати такі з остеподібними відростками чи безості. Якщо нащадки були з остеподібними відростками чи безостими, рослина F_2 була класифікована як остиста неправильно, її слід віднести до класу рослин з остеподібними відростками. Із 77 рослин F_2 за фенотипом F_3 було перевірено 68, і нове

співвідношення між фенотипами виглядало як 13 безостих, 10 остистих, 45 з остеподібними відростками, що цілком відповідає нашій гіпотезі про генетичний контроль ознаки ($\chi^2 = 0,75$, $p > 0,05$).

Перевірка правильності класифікації рослин F_2 за даними оцінювання розщеплення у F_3 виявилась дуже доречною при спробі зв'язати дві ознаки, остистість колосу та спектр ампліфікації ДНК гібридів F_2 з праймерами мікросателітних локусів, специфічних до хромосом 5A, 6B та 6D. 76 рослин F_2 було оцінено за електрофоретичними спектрами продуктів ампліфікації, отриманих з праймерами мікросателітних локусів *Xwmc705-5A*, *Xwmc105-6B*, *Xcfd45-6D*. Різниця між спектрами ліній res206 та res211 у всіх випадках полягала у відсутності компонента спектра для лінії res206, так що мікросателітний локус у розщепленні поведився як домінантний з очікуваним співвідношенням 3 «1» (у спектрі компонент у наявності) : 1 «0» (у спектрі компонент відсутній). Для мікросателітів *Xwmc705-5A* та *Xcfd45-6D* фактичні обсяги класів «1»-«0» відповідали очікуваному 3:1, а для локуса *Xwmc105-6B* $0,01 < p < 0,05$ — результат виявився неоднозначним (табл. 6.28). Перевірка комбінування алелів різних локусів підтвердила його незалежність при передачі, що впливає із локалізації мікросателітних локусів.

Таблиця 6.27

Результати перевірки фенотипу рослин F_2 за розщепленням у F_3

Рослини F_2 , які перевіряли		Фенотип рослин F_3		
		безості	остисті	ост.відростки
Безості	13	81	0	0
	10	15	19	29
Остисті	10	0	70	0
	2	1	4	5

Для мікросателіта *Xcfd45-6D* серед 68 рослин F_2 , оцінку яких за остистістю було перевірено за даними розщеплення у F_3 , було 58 рослин з наявним у спектрі компонентом та 18 рослин без компонента ($\chi^2 = 0,02$). Далі

розглядали два варіанти сполучення ознак остистість колосу та спектр компонентів ампліфікації. Хай ген *awn1* (чи b_n , як його позначено при аналізі ліній – похідних Аврозису) розташований у будь-якій хромосомі, відмінній від хромосоми 6D, яку маркує мікросателіт *Xcfd45-6D*. Розщеплення у F_2 відповідає співвідношенню 3 безостих, 10 остеподібні відростки, 3 остистих. Вільне комбінування градацій ознаки остистість та компоненти мікросателітних спектрів має дати розщеплення, наведене у табл. 6.29.

Таблиця 6.28

**Співвідношення між фенотипними класами мікросателітних локусів
серед 76 рослин F_2 від схрещування *res206* x *res211***

SSR-локус	Кількість рослин з таким спектром		χ^2 для співвідношення 3(1):1(0) ¹⁾	P
	компонент є (1)	компоненту немає (0)		
<i>Xwmc705-5AL</i>	53	23	0,86	>0,05
<i>Xwmc105-6B</i>	66	10	5,07	>0,01
<i>Xcfd45-6D</i>	52	24	1,42	>0,05

Примітка: ¹⁾ Розраховано з поправкою Єйтса

Результати порівняння фактичних та теоретичних частот свідчать, що незважаючи на низьку імовірність існування первинної таблиці (табл. 6.29), яка відбиває отримані нами дані, повна величина точного критерію Фішера, $p=0,349$ засвідчує, що градації ознаки остистість та алелі мікросателітного локуса, специфічного до хромосоми 6D, мають розглядатися як такі, що сполучаються незалежно.

Другий варіант сполучення градацій ознаки та компонентів спектра варто розглянути виходячи з припущення, що ген *awn1* (b_n) локалізований у хромосомі 6D. Тоді, беручи до уваги нашу гіпотезу про дигенний контроль ознаки, очікуємо таке сполучення градацій ознаки остистість та компонентів спектра. Серед безостих рослин з генотипом *B1-awn1awn1* всі будуть мати

компонент «1», тому що він властивий компоненту схрещування (res211) з геном *awn1*. Серед остистих рослин 1/3 будуть мати компонент «0», це носії генотипу *b1b1Awn1Awn1*, а 2/3 – компонент «1», це носії генотипу *b1b1Awn1awn1*. Серед рослин з остеподібними відростками 3/16 генотипів *B1-Awn1Awn1* (*2B1b1Awn1Awn1* + *1B1B1Awn1Awn1*) будуть мати «0» у спектрі, 6/16 генотипів *B1-Awn1-* (*2 B1B1Awn1awn1* + *4 B1b1Awn1awn1*) та 1/16 генотипів *b1b1awn1awn1* будуть мати «1» у спектрі. Тобто 7/16 рослин з «1» та 3/16 з «0». Оскільки співвідношення рослин з «1» та «0» серед рослин з різними градаціями остистості очікується різне, розглянемо окремо дві чотирипільні таблиці емпіричних та очікуваних величин (табл. 6.30).

Таблиця 6.29

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

Фенотипні класи	Градація за остистістю	Компонент у спектрі ампліконів	Кількість рослин генотипного класу ¹⁾	
			фактична	теоретична
1	Безостий	1	13	10
2	Безостий	0	0	3
3	Остистий	1	7	10
4	Остистий	0	3	3
5	Остепод.відр.	1	28	31
6	Остепод.відр.	0	17	10

Примітка: ¹⁾ Через замалу кількість рослин у класах 2 та 4 замість методу χ^2 використано точний критерій Фішера [575]. Імовірність вихідної таблиці $0,0007 < 0,01$, імовірність за двобічним критерієм – $0,349 > 0,05$.

Порівняння результатів, наведених у таблицях 6.29 та 6.30 показує, що імовірності отримання фактичних даних за другим варіантом набагато вищі, ніж за першим, навіть для початкових таблиць $p \gg 0,05$. Отже, ген-промотор остистості локалізований у хромосомі 6D. Причому в цій хромосомі

локалізовано його рецесивний алель *awn1* (b_n), який у гомозиготному стані спричинює розвиток остеподібних відростків за відсутності інгібітора остистості *Bl*, а алель *Awn1* увійшов до складу геному інтрогресивної лінії разом з хромосомою 6U. Хромосоми 6D та 6U не кон'югують у профазі мейозу, оскільки не гомологічні. Тому розрахувати зчеплення, якщо воно наявне між геном *Awn1* та мікросателітним локусом *Xcfd45-6D*, специфічним для хромосоми 6D, на цьому матеріалі неможливо.

Таблиця 6.30

Порівняння теоретичного та емпіричного співвідношень розщеплення у F_2 , виходячи з припущення про локалізацію гена остистості у хромосомі 6D

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

Примітка: ¹⁾ Перше значення у стовпчику розраховане для початкової таблиці, друге – результат двобічного точного критерію Фішера.

Було визначено генотипи рослин F_2 за алелями мікросателітного локусу *Xwmc705-5AL*, специфічного до хромосоми 5A. Обґрунтовуючи гіпотезу про генетичний контроль остистості, ми припускали, що лінія *res206* має або термінальну делецію на довгому плечі цієї хромосоми, яка включає ген *Bl*, або мутантний алель цього гена, який втратив здатність інгібувати ген – промотор остистості. У іншому разі рослини лінії не були б остистими. Спектр ампліфікації геному лінії *res211* з праймерами цього мікросателітного локусу представлений одним компонентом «1», у спектрі лінії *res206* компонента немає. Здавалося б, що відсутність компонента ампліфікації з праймерами мікросателітних локусів, специфічних до хромосоми 5A, у спектрі остистої лінії може свідчити на користь припущення про делецію термінальної ділянки цієї хромосоми у складі геному лінії *res206*. Тоді серед нащадків F_2 мають з'явитися чотири фенотипні класи: остисті з «0» за мікросателітом, з остеподібними

відростками з «0», з остеподібними відростками з «1» за мікросателітом та безості з «1». Фактично спостерігається 6 класів, які включають крім перелічених остисті рослини з «1» та безості рослин з «0», які не мали б з'являтися, якщо мікросателітний локус знаходиться у ділянці хромосоми 5A, яка делетована у остистої лінії res206. Отже, ми маємо припустити, що відсутність прояву гена *B1* у складі лінії res206 пояснюється не відсутністю частини хромосоми з цим геном (делеція), а якоюсь перебудовою хромосоми, яка призвела до мутації гена *B1* у нефункціональний алель *b1*, а також до утворення нульового алелю за мікросателітним локусом *Xwmc705-5A*, наявність компоненту за яким було констатовано як для геному Аврори, так і Авролати. Порівняння фактичного розподілу рослин за фенотипними класами (перший рядок табл. 6.31) з теоретичними, які очікувались із припущення про незалежне комбінування гена *B1* та локуса *Xwmc705-5A* (другий рядок табл. 6.31), показує надлишок остистих рослин з фенотипом «0» за мікросателітним локусом і безостих рослин з фенотипом «1» за мікросателітним локусом та нестачу остистих рослин з фенотипом «1» та безостих рослин за фенотипом «0».

Порівняння фактичного розподілу за фенотипними класами з очікуваним, розрахованим із припущення про незалежне комбінування гена *B1* та мікросателітного локуса *Xwmc705-5A* наводить на думку про наявність зчеплення між вказаними генами у фазі *B1*«1» (*b1*«0»). Для визначення величини зчеплення θ максимальну правдоподібність розраховували за формулою
$$L = \frac{N! p^a q^b u^c v^d r^e s^f}{a! b! c! d! e! f!}$$
. Теоретичні частоти фенотипів $p \dots s$ та їхні кількості, що спостерігалися, $a \dots f$, наведені у таблиці 6.31. Шукали найбільший логарифм відношення двох імовірностей, L_θ та $L_{0,5}$, коли у знаменнику відношення стоїть імовірність для $\theta=0,5$ а у чисельнику – для $0,1 < \theta < 0,5$ [218]. Максимальну оцінку $LOD = 3,36$ отримали при $\theta=0,15$. Такому значенню θ відповідає відстань між генами, розрахована за функцією Косамбі [438], 15,5сМ.

Таблиця 6.31

Розрахунок очікуваних частот фенотипних класів за ознаками остистість та спектром ампліфікації з праймерами локуса 705-5A за $\theta = 0,15$

генотип гамет ¹⁾ ♂		<i>B1B3"1"</i>	<i>b1B3"0"</i>	<i>B1B3"0"</i>	<i>b1B3"1"</i>	<i>B1b3"1"</i>	<i>b1b3"0"</i>	<i>B1b3"0"</i>	<i>b1b3"1"</i>
генотип ♀	частота гамет за $\theta=0,15$	0,2125	0,2125	0,0375	0,0375	0,2125	0,2125	0,0375	0,0375
<i>B1B3"1"</i>	0,2125	0,0425²⁾	0,0425	0,01063	0,01063	0,0425	0,0425	0,01063	0,01063
<i>b1B3"0"</i>	0,2125	0,0425	0,0425	0,01063	0,01063	0,0425	0,0425	0,01063	0,01063
<i>B1B3"0"</i>	0,0375	0,0075	0,0075	0,00188	0,00188	0,0075	0,0075	0,00188	0,00188
<i>b1B3"1"</i>	0,0375	0,0075	0,0075	0,00188	0,00188	0,0075	0,0075	0,00188	0,00188
<i>B1b3"1"</i>	0,2125	0,0425	0,0425	0,01063	0,01063	<i>0,0425</i>	<i>0,0425</i>	<i>0,01063</i>	<i>0,01063</i>
<i>b1b3"0"</i>	0,2125	0,0425	0,0425	0,01063	0,01063	<i>0,0425</i>	0,0425	0,01063	0,01063
<i>B1b3"0"</i>	0,0375	0,0075	0,0075	0,00188	0,00188	<i>0,0075</i>	0,0075	0,00188	<i>0,00188</i>
<i>b1b3"1"</i>	0,0375	0,0075	0,0075	0,00188	0,00188	<i>0,0075</i>	0,0075	<i>0,00188</i>	0,00188
p=0,5225	остеподібні відростки "1"		a=36	v=0,1025	остеподібні відростки "0"		d=9		
<i>q=0,1675</i>	безості "1"		b=12	r=0,02	безості "0"		e=1		
<i>u=0,06</i>	остисті "1"		c=3	s=0,1275	остисті "0"		f=7		

Примітки: ¹⁾ для короткості ген *Awn1* позначено як *B3*, *awn1* – як *b3*; ²⁾ фенотипи зигот за остистістю у кожній клітинці позначені через особливості шрифту (жирний, курсив, звичайний) для зигот з мікросателітним алелем «1» (48 клітинок з 64-х) та особливості заливки клітинок для зигот з мікросателітним алелем «0» (16 клітинок з 64).

Показники точного критерію Фішера для ініціальної таблиці та для двобічного варіанту критерію свідчать, що імовірність варіанту теоретичного розподілу рослин за фенотипними класами, розрахована за умов незалежного комбінування гена *B1* та мікросателітного локуса *Xwmc705-5A* (0,00015 та 0,597, другий рядок табл. 6.32) набагато менша відповідних імовірностей, розрахованих за умов зчеплення між вказаними генами на величину $\theta=0,15$ (0,00092 та 0,978, третій рядок табл. 6.32).

Таблиця 6.32

Розподіл рослин F_2 за фенотипними класами за ознакою остистість та спектр ампліконів, що утворюється праймерами мікросателітного локусу *Xwmc705-5A*

Розподіли	Кількість рослин у фенотипних класах					
	Безості		Остисті		3 остепод. відростк.	
	«1»	«0»	«1»	«0»	«1»	«0»
Фактичний	12	1	3	7	36	9
Очікуваний при $\theta=0,5$	10	3	8	5	33	9
Очікуваний при $\theta=0,15$	11	1	4	9	36	7

За результатами виконаного дослідження, остиста інтрогресивна лінія *res206*, яка походить від схрещування між безостим сортом озимої м'якої пшениці Аврора та геномно-заміщеної форми Авролата 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* на хромосомі 6D, який спричинює розвиток остеподібних відростків за відсутності домінантного інгібітора остистості *B1*, локалізованого на 5A хромосомі генотипу Аврора та лінії *res211*. Лінія *res206* має мутацію гена-інгібітора, алель

b1, який не впливає на розвиток остей. Мікросателітний локус *Xwmc705-5A* 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 неперебудованої хромосоми 5A.

6.3. Генетичний аналіз ліній за ознакою забарвлення зрілої луски

Такі ознаки морфології колоса пшениці як забарвленість та опушення колоскової луски є важливими для таксономічного описання, розрізнення підвидів і локальних варіантів пшениці, оцінки їхнього різноманіття, вони можуть впливати на адаптивність пшениці [420]. Колоскова луска пшениці може класифікуватися як «біла», хоча насправді це забарвлення виглядає як солом'яно-жовте. І може класифікуватися як «забарвлена»: червона (найбільш звичайна), коричнева, сіра та чорна.

Гени, що контролюють забарвлення луски у пшениці (*Rg* гени), локалізовані на коротких плечах хромосом першої гомеологічної групи (1A, 1B та 1D) [738]. Різні алелі *Rg* генів визначають чорне забарвлення луски у диплоїдної та тетраплоїдної пшениці, та чорне, червоне (коричнєве) і сіре забарвлення луски у гексаплоїдної пшениці [421]. Червоне і чорне забарвлення луски у пшениці домінує над білим забарвленням луски [421]. Забарвлення луски контролюється серією гомеолокусів *Rg-A1*, *Rg-B1* та *Rg-D1*. На час їхньої ідентифікації та хромосомної локалізації ці гени називалися *Bg* (black glume) (Burnham, 1962; Law, Chapman, 1974 – цит. за [420]), *Rg1* та *Rg2* (red glume), (Unrau, 1950; Kerber, Dusk, 1969– цит. за [420]). Один з алелів гена *Rg-D1* (*Rg2*) визначає сірий колір луски [422]. Інший алель гена *Bg*, локалізованого у хромосомі 1A, це *Rg3* (Yelokhina, 1989 – цит. за [420].]

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 нами було відібрано 42-хромосомні лінії, цитологічно майже стабільні (див. табл. 3.1–3.3). Принаймні, частота знаходження анеуплоїдних паростків (41 або 43 хромосоми) була не вище, ніж у Аврори. Для порівняння геномної структури компонентів схрещування стосовно наявності великих чужинних включень, які можуть вплинути на перебіг мейозу, вивчали метафазу мейозу 1 МКП F₁ всіх комбінацій схрещування (див. таблиці підрозділу 4.1). Було отримано та оцінено за кольором зрілої луски гібриди F₁ та F₂ 13 комбінацій схрещування (табл. 6.33).

Таблиця 6.33

Розщеплення рослин F₂ за ознакою забарвлення зрілої колоскової луски

Комбінація схрещування	Кількість рослин з градацією			
	1	2	3	4
1) res12 (3) ¹⁾ x Аврора (1)	20	22	15	0
[res12 (3) x Аврора] x res 12	19	19	0	0
2) res17 (3) x Аврора (1)	15	33	16	0
3) res53(2) x res19(1)	34	70	0	0
4) res217 (3) x Аврора (1)	53	48	11	0
5) res177 (1) x res221/1 (3)	30	26	7	0
6) res196(3) x res143(1)	25	36	25	0
7) res206(4) x res142 (1)	23	25	32	40
8) res207(4) x res142 (1)	14	21	21	25
9) res211(4) x res215(1)	11	32	22	25
10) res206 (4) x res211(4)	4	2	9	51
11) res226(1) x res237(4)	28	0	0	67
12) res207(4) x res7(3)	6	7	21	27
13) res189 (4) x res221/1 (2)	26	29	4	37

Примітка: ¹⁾У дужках вказано градацію прояву ознаки.

Забарвлення зрілої луски рослин F₁ у всіх комбінаціях схрещування, що включали контрастні за градацією ознаки лінії, було темнішим, ніж у лінії з

більш світлим забарвленням, та світлішим, ніж у лінії з більш темним забарвленням. Отже, алель темного забарвлення луски не домінує повністю над алелем червоного забарвлення. Градація ознаки «4», чорний, відрізнялась від градацій «2» та «3» якістю відтінку. Градації «2» та «3» — різним ступенем насиченості коричневого кольору. Крім того, завжди є небезпека сплутати градації «1» та «2», і «2» та «3». Розщеплення рослин популяцій F_2 за забарвленням колоскової луски наведено в таблиці 6.33.

Розщеплення у комбінаціях *res12* (3) x Аврора (1) та *res17* (3) x Аврора (1), у яких брали участь лінії – похідні Авродесу, відповідає моногенному з напівдомінуванням між алелями ($\chi^2=3,84$ та $\chi^2=0,09$, відповідно, $p>0,05$). Те, що колір луски контролюється одним напівдомінантним геном підтверджується даними розщеплення у беккросній популяції від схрещування з Авророю лінії *res12*, $\chi^2=0,00$ (табл. 6.33). Обидві лінії утворюють гібрид з Авророю з бівалентною кон'югацією хромосом у мейозі. Відомо, що гени ортологічної серії *Rg* локалізуються на хромосомах 1-ої гомеологічної групи пшеницевих. Судячи з даних про глідинові спектри вказаних ліній (табл. 5.2), ген, що розщеплюється у цих комбінаціях схрещування, є саме *Rg* геном. Таке саме розщеплення спостерігали у комбінації *res53*(2) x *res19*(1) ($\chi^2=3,28$). Авродес характеризується коричневою лускою і можна припустити, що лінії *res12*, *res17*, *res53*, а також *res7*, про яку йдеться далі, мають алель гена *Rg* у складі чужинної ділянки хромосоми 1S, отриманої від Авродесу.

Більш складну для аналізу картину спостерігали у розщепленнях, де одна з ліній була похідною Авролати. Хоча сама Авролата за кольором зрілої луски від Авродеса майже не відрізняється, серед отриманих за її участю інтрогресивних ліній виявилось чимало з чорною лускою (градація 4), яких не було серед ліній іншого походження. Хоча були і лінії з градацією 3. В F_2 від комбінації *res217* (3) x Аврора (1) для моногібридної моделі спостерігається значний надлишок рослин із світлим забарвленням луски та нестача таких з темним ($\chi^2=33,79$, $p<0,001$). Із таблиці 4.4 (підрозділ 4.1) видно, що лінія *res217* має пару гомологів, які не утворюють бівалент у гібриді з Авророю. Це пара

або чужинних, або значно перебудованих щодо гомологу Аврори хромосом. Якщо чужинний ген *Rg*, що контролює темне забарвлення луски лінії *res217*, розташований саме в цій хромосомі, це може бути причиною деформації розщеплення проти очікуваного при моногенному контролі ознаки, адже замість бівалента у $M1$ утворюються два уніваленти. Як цей феномен впливає на частоти утворення анеуплоїдних гамет, вже згадувалось у пункті 6.1.1 (табл. 6.2). У таблиці 6.34 наведено частоти генотипів, що формуються за умов функціонування гамет з різною кількістю хромосом, на підставі чого можна порахувати очікувані обсяги фенотипних класів з різними градаціями забарвлення [6].

Таблиця 6.34

**Очікувані частоти генотипних та фенотипних класів серед F_2 гібриду
res217 x Аврора**

Частота гамет (вказаного складу)	D (0,19)	U (0,19)	DU (0,06)	0 (0,56)
0,19(20 +D) ¹⁾	0,0361	0,0361	0,0114	0,1064
0,19 (20+U)	0,0361	0,0361	0,0114	0,1064
0,06 (20+D+U)	0,0114	0,0114	0,0036	0,0336
0,56 (20)	0,1064	0,1064	0,0336	0,3136
	0,5625 світлі луски градація 1			
	0,375 градація 2			
	0,0625 градація 3			

Примітка: ¹⁾ 20 хромосом, які будуть утворювати біваленти з гомологами у сформованій рослині F_2 , D – та хромосома геному D, яка не мала гомолога у гібриді F_1 , її партнером була чужинна (або значно перебудована) хромосома U і вони були унівалентами.

За умов однакової життєздатності всіх гамет та зигот очікувані частки рослин із червоними та темними лусками з градаціями 2 та 3 становлять 0,5625, 0,375 та 0,0625, відповідно, тобто 63, 42 та 7 для вибірки 112 рослин. Це не відрізняється від емпіричного розподілу за фенотипними класами: 53, 48 та 11

($\chi^2=4,73$, $p>0,05$). Звідси можна припустити, що ознака контролюється одним геном, розташованим у такій хромосомі темно забарвленої лінії, яка не кон'югує з гом(е)ологом Аврори. Проте слід розглянути ще один аспект, який неминуче виникає, коли мова йде про формування анеуплоїдних гамет та зигот пшениці. Відомо, що пшениця через свою алополіплоїдну природу досить толерантна до втрати окремих хромосом та набуття зайвих проти 42. Проте такі гамети та зиготи все ж поступаються життєздатністю порівняно з еуплоїдними аналогами. На великому експериментальному матеріалі, моносоміках за різними хромосомами, Сірсом [744], було показано, що кількість нулісомиків серед нащадків з рецесивним фенотипом рослин F_2 від схрещування пшениці з чужинно-заміщеною лінією (як в нашому випадку) складала від 1 до 7% у залежності від заміщеної хромосом, а середній відсоток за всіма вивченими хромосомами він оцінив як 5%. З таблиці 6.34 видно, що теоретично, якщо 20-хромосомні гамети беруть участь у заплідненні так само часто, як еуплоїдні, і всі зиготи мають однакову життєздатність, утворюється 31% нулісомиків. Тобто, беручи до уваги експериментальні дані Сірса, ми помиляємось у шість разів, коли користуємось результатами розрахунків, приклад яких наведено у таблиці 6.34. Джерел такої помилки два: не всі гамети (див. табл. 6.34) мають однакову імовірність взяти участь у заплідненні; не всі утворені зиготи мають однакову імовірність дійти у онтогенезі до стадії оцінки (зрілості). У таблицях 6.35 та 6.36 наведені розрахунки, які показують, які теоретичні розподіли слід очікувати, якщо нежиттєздатними є:

всі чоловічі анеуплоїдні гамети (табл. 6.35, теоретичний розподіл за фенотипними класами 42 (1) + 56 (2) + 14 (3), $\chi^2=4,67$, $p>0,05$);

всі чоловічі 20-хромосомні гамети (табл. 6.36, 36 (1) + 60 (2) + 16 (3), $\chi^2=11,99$, $p<0,01$).

Судячи з отриманих теоретичних розподілів, перша таблиця (6.35) з двох дає кращий результат щодо наближення до емпіричного розподілу, хоча наш досвід роботи з гібридами свідчить, що друга таблиця (6.36) більш реалістична.

Таблиця 6.35

Очікувані частоти генотипних та фенотипних класів серед F_2 за умов участі у заплідненні тільки еуплоїдних чоловічих гамет

Частота гамет (вказаного складу)	D (0,50)	U (0,50)
$0,19(20 + D)^{1)}$	0,095	0,095
0,19 (20+U)	0,095	0,095
0,06 (20+D+U)	0,03	0,03
0,56 (20)	0,28	0,28
	0,375 світлі луски градація 1	
	0,5 градація 2	
	0,125 градація 3	

Таблиця 6.36

Очікувані частоти генотипних та фенотипних класів серед F_2 за умов участі у заплідненні 21- та 22-хромосомних чоловічих гамет

Частота гамет (вказаного складу)	D (0,43)	U (0,43)	DU (0,14)
$0,19(20 + D)^{1)}$	0,0817	0,0817	0,0266
0,19 (20+U)	0,0817	0,0817	0,0266
0,06 (20+D+U)	0,0258	0,0258	0,0084
0,56 (20)	0,2408	0,2408	0,0784
	0,33225 світлі луски градація 1		
	0,535 градація 2		
	0,1425 градація 3		

Звідси можна припустити, що не варто нехтувати другим можливим джерелом викривлення емпіричного розподілу щодо теоретичного для моногенного розщеплення. Спираючись на таблицю 6.34, розрахуємо три додаткові ситуації:

нулісомики (у таблиці їхня частота 0,3136) нежиттєздатні всі, тоді теоретичний розподіл 41 (1) + 61 (2) + 10 (3), $\chi^2=6,68$, $0,05 > p > 0,01$;

життєздатна тільки половина нулісомиків, 54 (1) + 50 (2) + 8 (3), $\chi^2=0,96$, $p > 0,05$);

життєздатні дві третини нулісомиків, 57 (1) + 47 (2) + 8 (3), $\chi^2=1,66$, $p > 0,05$).

Бачимо, що два останніх результати однаково добрі, проте вважаємо, що насправді така кількість нулісомиків, половина чи дві третини від очікуваної кількості, якщо і утвориться, то не дійде у онтогенезі до стадії оцінювання, адже такі рослини часто бувають слабкими. Звичайно, було б непогано мати результати підрахунку хромосомних чисел у рослин F_2 , проте цієї інформації не було отримано. Тому було зроблено спробу підійти до оцінки життєздатності зигот з іншого боку.

Працюючи з гібридами F_1 та F_2 , ми завжди оцінюємо їхню фертильність як відношення кількості зернин до кількості колосків, маючи на увазі, що колосок м'якої пшениці у середньому має дати 3 зерна. Отже, при повній фертильності це відношення має бути 3. Якщо воно менше, це означає, що не всі жіночі гамети дали початок зиготі, або не всі зиготи виявилися життєздатними. Крім того, кількість рослин, які оцінюються в полі, завжди менша кількості висіяних зернин. У дослідженнях Жирова та Бессараб [31] було показано, що кількість нулісомиків, які утворюються від самозапилення моносомиків, завжди менша теоретично очікуваної вже на стадії визначення числа хромосом у паростках, і кількість нулісомиків має падати впродовж онтогенезу. Показник фертильності при самозапиленні рослин F_1 гібрида *res217* x *Аврора* був 2,08. Тобто кожна третя квітка не утворила насіння. Кількісно це збігається з теоретичною часткою нулісомиків, 0,3136. Проте ми думаємо, що це випадковий збіг і частина нулісомиків все ж утворюється, а нежиттєздатними можуть бути зиготи з іншими хромосомними числами. Єдиним висновком, який можна зробити на отриманих даних – ознака контролюється одним геном, а відхилення співвідношення розщеплення від теоретично очікуваного для

моногенного спричинюється різною життєздатністю гамет та зигот з кількістю хромосом, яка відхиляється від еуплоїдних чисел 21 та 42, відповідно. Гамети з незбалансованими хромосомними наборами утворюються через порушення у перебігу мейозу гібриду F_1 , не всі хромосоми якого утворюють біваленти. І саме в таких хромосомах має бути розташований ген, який контролює ознаку, що розглядається. Отже, лінії *res12*, *res17*, *res53* та *res217* відрізняються від генотипу Аврори за одним геном забарвлення луски. Проте у геномах ліній *res12*, *res17* та *res53* ген чужинного походження, що викликає темне забарвлення луски, входить до складу хромосоми, яка кон'югує з гомологом Аврори, так що уніваленти не утворюються, а в лінії *res217* ген розташований у хромосомі, яка не кон'югує з гомологом Аврори. Утворюються уніваленти, і спотворюється співвідношення розщеплення проти такого, яке має виникати при моногенній різниці між компонентами схрещування. Якщо не враховувати геномну структуру досліджуваної лінії, можна було б тестувати іншу модель генетичного контролю і помилково визнати таку модель адекватною.

Аналогічні результати отримали, вивчаючи розщеплення у F_2 комбінації *res177(1)* x *res221/1(3)*. Тобто можна було б прийняти модель контролю ознаки одним геном, розташованим у хромосомі, яка не кон'югує зі своїм гомологом ($\chi^2=4,58$, $p>0,05$) і нулісомики не життєздатні. Але результат виявляється кращим, коли припускаємо, що або не всі спермії беруть участь у заплідненні ($\chi^2=2,78$, $p>0,05$), або половина нулісомиків не доживають до зрілості ($\chi^2=1,31$, $p>0,05$). Отже лінія *res221/1* з забарвленою лускою відрізняється від лінії *res177* з незабарвленою лускою одним геном, і він має бути розташованим у складі чужинної хромосоми або великої транслокації, що сприяє утворенню в мейозі двох унівентів замість бівалента.

У F_2 комбінації *res196 (3)* x *res143 (1)* спостерігали розщеплення $1(1):2(2):1(3)$ ($\chi^2=2,28$, $p>0,05$), хоча у метафазі мейозу 1 гібриду F_1 було 4 облігатних унівенти та 2 відкритих біваленти. Рослини характеризувалися зниженою фертильністю. Те, що фактичне розщеплення не відрізнялось від моногенного, може свідчити про те, що ген, критичний для забарвлення луски

лінії res193, розташований у хромосомі, яка утворює бівалент з гомологом лінії res143.

Картина успадкування значно ускладнюється у комбінаціях, де один з компонентів схрещування мав чорну луску. Було три комбінації (7–9 табл. 6.33), де чорноколосі лінії схрестили з лініями з червоною лускою. F_1 класифікували як чорні, хоча насиченість кольору поступалась батьківським лініям. Серед F_2 крім чорних та червоних були рослини зі світло- та темно-коричневою лускою (табл. 6.33). Таке розщеплення ми ніяк не могли пояснити моногенною моделлю і вимушені були припустити, що у розщепленні беруть участь два гени. Один з них, *Rg*, хромосоми 1-ої групи, забезпечує у гомозиготі темно-коричневий колір, у гетерозиготі світло-коричневий, як це було показано при аналізі похідних Авродесу. Інший ген, локалізація якого невідома, забезпечує чорний колір луски у гомозиготі. Щодо гетерозиготи, а також фенотипного прояву при його сполученні з геном *Rg*, ми могли це лише припускати, спираючись на емпіричні розщеплення. Другий ген позначаємо *Bg2* (black glume). Всі три фенотипні розщеплення у F_2 виявилися однаковими при попарному порівнянні їх методом багатопільного χ^2 -квадрата (4 x 2): 7–8, $\chi^2=0,74$, 7–9, $\chi^2=6,25$, 89, $\chi^2=2,20$, $p>0,05$ з урахуванням поправки Бонферроні для множинних порівнянь. Тому розщеплення були об'єднані: 48(1) + 78(2) + 75(3) + 90(4).

Тестувалась модель дигібридного розщеплення за генами, які комбінуються незалежно і розташовані в хромосомах, представлених гомеологами, що не формують біваленти. В мейозі гібридів F_1 від вказаних схрещувань спостерігали від 2 до 6 облігатних унівалентів у залежності від комбінації (табл. 4.5). Отже, модель було потрібно будувати з урахуванням припущення про участь у заплідненні анеуплоїдних гамет. Як формуються гамети за наявності у метафазі чотирьох унівалентів, два з яких мають чужинне походження, а два є їхніми пшеничними гомеологами, наведено у таблиці 6.37. Ми не могли занадто ускладнювати модель, оскільки для її перевірки не мали жодних даних, крім цих трьох розщеплень. Тому припустили, що жіночі гамети

функціонують 20-22-хромосомні, а чоловічі лише 21-хромосомні. Результат нормалізації частот гамет та частоти зигот, утворених за їхньою участю, наведено у таблиці 6.38. З цієї ж таблиці отримано частоти фенотипних класів, виходячи з припущень про фенотипний прояв різних сполучень генів *Rg* та *Bg2*, які ми зробили, спираючись на наявні фенотипні розщеплення та багаторічні спостереження за забарвленням зрілої луски у інтрогресивних лініях пшениці.

Таблиця 6.37

Макет розрахунку частот гамет, які формуються гібридом за наявністю чотирьох унівалентів в мейозі, двох чужинних, U1 та U2 та двох пшеничних гомеологів, D1 та D2

Формування сполучень хромосом, коли не кон'югують пари D-U1, D-U2		D2U2	D2	U2	Немає
		0,06	0,19	0,19	0,56
D2U1	0,06 ¹⁾	0,0036	0,0114	0,0114	0,0336
D2	0,19	0,0114	0,0361	0,0361	0,1064
U1	0,19	0,0114	0,0361	0,0361	0,1064
немає	0,56	0,0336	0,1064	0,1064	0,3136
		сума частот гамет = 1			
гамети з кількістю хромосом	частоти гамет з вказаною кількістю хромосом				
19	0,3136				
20	0,4256				
21	0,2116				
22	0,0456				
23	0,0036				
сума частот гамет = 1					

Примітка. ¹⁾ як отримуються вказані частоти, показано у таблиці 6.2 підрозділу 6.1.

Таблиця 6.38

Макет розрахунку частот рослин з різними фенотипами за кольором зрілої луски та перевірки відповідності емпіричного та очікуваного розподілів рослин за фенотипними класами

Склад та частоти жіночих та чоловічих гамет ¹⁾		D1 або D2	D2 U1	D1 U2	U1 U2	сума= 1
		0,1706	0,3294	0,3294	0,1706	
D1 або D2	0,3117	0,0532	0,1027	0,1027	0,0532	
U1	0,1558	0,0266	0,0513	0,0513	0,0266	
U2	0,1558	0,0266	0,0513	0,0513	0,0266	
D1 D2	0,0529	0,009	0,0174	0,0174	0,009	
D2 U1	0,1021	0,0174	0,0336	0,0336	0,0174	
D1 U2	0,1021	0,0174	0,0336	0,0336	0,0174	
U1 U2	0,0529	0,009	0,0174	0,0174	0,009	
D1 D2 U1	0,0167	0,0028	0,0055	0,0055	0,0028	
D1 D2 U2	0,0167	0,0028	0,0055	0,0055	0,0028	
D1U1U2 або D2U1U2	0,0334	0,0057	0,011	0,011	0,0057	
	сума=1	сума частот зигот = 1				
0,6828 та 0,2116 умови нормалізації частот жіночих та чоловічих гамет, відповідно						
Рослини матимуть колір луски ²⁾ :	Емпіричні обсяги фенотипних класів	Частоти зигот	Теоретичні обсяги фенотипних класів	Розрахунок χ^2		
червона	48	0,1457	42,38	0,744		
світло-коричнева	78	0,2301	66,97	1,8184		
темно-коричнева	75	0,2562	74,55	0,0028		
чорна	90	0,368	107,11	2,7317		
Сума	291	1	291	5,2968		

Примітки: ¹⁾ U1 – хромосома Авролати (або значна транслокація у пшеничній) у складі геному інтрогресивної лінії з геном *Rg*, U2 – хромосома

Авролати або значна транслокація у пшеничній) з геном *Bg2*, *D1* та *D2* пшеничні гомеологи вказаних хромосом.

2) Червону луску мають рослини без хромосом *U1* *U2*, а також половина рослин з хромосоною *U1*, якщо наявний пшеничний гомеолог (це наслідок помилок у оцінці, у гратці помічено як); світло-коричневу луску мають половина рослин з хромосоною *U1* за наявністю пшеничного гомеолога () та всі рослини, що мають одну хромосому *U2*; темно-коричневу луску мають рослини з одною чи двома хромосомами *U1*, якщо хромосома *U2* наявна лише одна; чорне, як у батьківській лінії, забарвлення утворюється, якщо наявні дві хромосоми *U2*.

Не важко зрозуміти, що модель описує картину успадкування тільки у загальних рисах. По-перше, реально існуючий пул гамет за своїми частотами буде відрізнятися від розрахованого через різну функціональну здатність різних гамет. По-друге, буде йти певний добір проти зигот з незбалансованим хромосомним набором. По-третє, і це дуже важливо, безпомилково вказати градацію рослини F_2 за кольором луски в тих комбінаціях, де беруть участь лінії з градацією «4» – завдання нереальне, якщо тільки не отримати та не оцінити родини нащадків F_3 . На жаль, нами це було зроблено для невеликої кількості комбінацій і досліджувані гібриди в цю роботу не потрапили через відсутність інформації про поведінку хромосом у гібридах F_1 . Тим не менш, отримані результати дають підстави думати, що розщеплення відбувається не за одним, а за двома генами чужинного походження, які комбінують незалежно та беруть участь у контролі ознаки колір зрілої луски.

Крім трьох згаданих причин, чому вивчення успадкування чужинного генетичного матеріалу у гібридах на підставі результатів гібридологічного аналізу призводить лише до припущень про модель, але не може надати остаточних доказів про генетичний контроль ознаки, нам здається важливим феномен генетичного драйву, який визначають як будь-яку зміну нормального перебігу мейозу, в результаті чого гетерозиготний за двома альтернативними

генетичним станами організм продукує ефективний гаметичний пул з ексцесом одного з двох альтернативних типів [942]. Механізми та наслідки драйву обговорюються активно [497]. У нашому випадку такою альтернативою є наявність чи відсутність у гаметі чужинного хроматину. Принаймні розщеплення у комбінації 10, де обидві лінії характеризуються чорним кольором, не можна пояснити чимось іншим. Судячи з аналізу трьох попередніх комбінацій, лінії *res206* та *res211* мають однакову генетичну основу для ознаки забарвлення зрілої луски. Рослини з оцінками «1», «2», «3» сплутати з чорними не можна, тобто вони реально були. Такі рослини можуть з'явитися від участі у заплідненні гамет, хоча б одна з якої не містила одного (оцінка «3» через генотип *RgRg*) чи двох (оцінка «2» через генотип *Rgrg*) генів *Bg2*. Якщо і гени *Rg* втрачено, колос буде червоний.

У всіх фенотипних розподілах, описаних у цьому підрозділі, без жодного виключення в емпіричних класах червоноколосих рослин завжди прослідковується надлишок у порівнянні з очікуваною частотою. На наш погляд, це прямо вказує на втрату чужинного хроматину при формуванні гамет гібридними рослинами як на характерну рису гібридних популяцій, створених за участю інтрогресивних ліній.

В комбінації *res226(1)* x *res237(4)* розщеплення відбувається за одним геном ($\chi^2=1,01$), судячи з фенотипу темної лінії – за геном *Bg2*. Знову бачимо надлишок червоного колосся проти очікуваного. Також за одним геном мають розщеплюватися гібриди у комбінації 12, оскільки ми вже визначили лінію *res207* як таку, що має два гени кольору луски, *Rg* та *Bg2*. Формально чекаємо 3(3):1(4) на підставі висунутих вище припущень про вплив на фенотип сполучення генів *Rg* та *Bg2*. Спостерігаємо надлишок чорних рослин, скоріше за все через помилки у оцінці при сполученні генів *Rg* та *Bg2*, тим більш, що у схрещуванні бере участь лінія – похідна Авродесу, а не Авролати, і ген *Rg* в них має різне походження. А колосся з червоним кольором з'являється як наслідок втрати чужинного хроматину внаслідок генетичного драйва.

Розщеплення у комбінації *res189* (4) x *res221/1* (2) можна прокоментувати на користь того, що *res189* має лише *Bg2*, а ген *Rg* лінії *res221/1* дає не темно-коричневу, а світло-коричневу луску, як це видно з фенотипу лінії. Тоді як червоні ми оцінимо гетерозиготи за цим геном *Rg*, темно-коричневими будуть луски лише тих рослин, які мають один алель *Bg2* разом з двома алелями *Rg*. Як світло-коричневі виглядали не тільки гомозиготи за *Rg*, в цей же клас (помилково, через нестачу досвіду) було віднесено і рослини з одним алелем *Bg2*. Чорними будуть луски рослин з двома алелями *Bg2* та будь-яким алельним складом за геном *Rg*, а також рослини зі сполученням двох домінантних алелів за обома генами. Тоді очікується розщеплення 23(1) + 27(2) + 6(3) + 41(4), яке не відрізняється від емпіричного ($\chi^2=1,41$, $p>0,05$).

Крім генів *Rg* (*Bg* для хромосоми 1A), локалізованих на хромосомах 1-ої гомеологічної групи пшениці та *Ae. tauschii*, у літературі є повідомлення про ген *Pbc* на хромосомах 3В та 5В, який також надає чорний відтінок лусці, ген шоколадної луски *cc*, локалізований на хромосомі 7BS. Ген *Bg* зчеплений з геном опушення *Hg* [579]. І хоча ідентифікований нами ген *Bg2* також здається зчепленим з геном опушення [67], схоже, що це інший ген і розташований він не в на хромосомі 1-ої групи. По-перше, всі лінії з чорною лускою, відрізняються від безостої Аврори розвитком або повноцінних остей (*res206*, *res207*, *res237*) або остеподібних відростків (*res189*). За отриманими нами результатами генетичного аналізу остистих інтрогресивних ліній (підрозділ 6.2), поява остистих утворювань на колосі пов'язана зі зміною хромосоми 5A Аврори через заміщення, транслокацію або делецію. Ген антоціанового забарвлення *An5*, який може викликати утворення чорного пігменту на зрілій лусці, локалізований на хромосомі 5R *Secale cereale*, на цій же хромосомі розташований ген опушення стебла під колосом, такий саме ген локалізовано на 5BS [579] пшениці. Крім того, на хромосомі 5AL пшениці локалізовано ген опушення стеблових вузлів *Hn*, зчеплений з геном остистості *B1* [579]. Можливо, що гіпотетичний ген *Bg2* розташований на хромосомі 5-ої гомеологічної групи, хоча це припущення потребує перевірки.

6.4. Ознака стійкість до борошнистої роси

6.4.1. Сучасний стан проблеми щодо генетики стійкості до борошнистої роси пшениці. Одним з найбільш помітних та шкодочинних захворювань пшениці, розповсюджених у країнах з помірним кліматом та опадами, які починаються у вегетаційному сезоні рано, є борошниста роса [194]. Захворювання викликається грибом *Blumeria graminis* (DC) E.O. Speer f. sp. *tritici* Em. Marchal (*Bgt*) (syn. *Erysiphe graminis* DC f. sp. *tritici* Marchal), obligатним паразитом [129]. Найбільш ефективним заходом для боротьби з борошнистою росою пшениці завжди вважалося вирощування сортів з генетичною стійкістю до цього захворювання [129]. У сучасній літературі, присвяченій генетичному забезпеченню стійкості пшениці до грибних захворювань, зокрема, інтрогресії відповідних генів, не перше місце висунулись статті, присвячені борошністій росі, що вказує на зростання уваги дослідників до цього захворювання та генетичних заходів боротьби з ним. До цього часу у пшениці м'якій та її родичів локалізовано не менш 80 генів (алелів), розташованих у 50 локусах, що запобігають розвитку спор борошнистої роси на листі пшениці, забезпечуючи тим самим стійкість рослини до збудника [579]. З них 13 генів розташовано на хромосомах субгеному А, 23 – субгеному В та 12 – субгеному D пшениці м'якої [349,490,579,650,664]. Більшість з них є компонентами системи ген-на-ген [829], представниками генів *R*, які мають спеціальну назву *Pm* та обумовлюють вертикальну стійкість рослин. Стійкість, що цими генами забезпечується, закономірно та швидко долається завдяки природній еволюції збудника, в якого на тлі певного селективного тиску відбираються мутанти зі зміненим геном вірулентності, який вже не розпізнається геном стійкості, і рослина стає чутливою до ураження [194,641]. Особливо помітним цей процес є для генів стійкості, широко розповсюджених у світі, які входять до складу геному більшості сортів, стійких до борошнистої

роси [367]. Саме з цим пов'язана необхідність постійного поновлення запасу генів стійкості у генетичному пулі м'якої пшениці.

Розвиток захворювання залежить від генотипу сорту не тільки за генами вертикальної стійкості, а також за генами, які забезпечують нерасоспецифічну, часткову або горизонтальну стійкість рослини до захворювання [194]. Горизонтальна стійкість, як правило, забезпечується кількома генами і називається кількісною на відміну від якісної, що контролюється генами *Pm* [194].

Переважає більшість генів *Pm* зареєстровані як такі, що домінують над своїми алелями, які спричинюють розвиток чутливого фенотипу рослин. Рецесивну природу алелів, що забезпечують стійкість, показано для генів *Pm5*, *9*, *26*, *PmLK906* та *Pm2026* [129,360,368,633,884]. Кілька з відомих *Pm* генів представлені декількома алелями стійкості. Так, ген *Pm5* має принаймні три алелі, ген *Pm3* – сім [626,868,893]. Поліморфними є гени *Pm1*, *Pm4*, *Pm8* [367,868].

На сьогодні встановлено нуклеотидну послідовність принаймні 60-ти *R*-генів рослин, що дало змогу не тільки встановити амінокислотні послідовності білків, які цими генами кодуються, а й класифікувати ці білки у кілька груп залежно від наявності в їхній структурі тих чи інших загальних доменів. Більшість з секвенованих *R* генів рослин кодують сайт зв'язування з нуклеотидами (NBS) та домен, збагачений на лейцин-кодувальні повтори (LRR) [561,646].-Серед *Pm* генів секвеновано тільки один, *Pm3b* [893].

У нашому дослідженні були задіяні інтрогресивні лінії – похідні геномно-заміщених амфідиплоїдів Авродесу, Аврозису та Авролати, кожен з яких мав у складі геному тетраплоїдний компонент ААВВ сорту Аврора і геноми S, S^{sh} та U. Інформацію про ці види егілопсів щодо стійкості до грибних листових захворювань пшениці наведено у підрозділі 2.1. Кожен з видів вже відомий як джерело генів стійкості *Pm* до борошнистої роси пшениці. Ураження сорту Аврора борошнистою росю у польових умовах оцінюється 3–4 балами. Отже,

природно було припустити, що стійкість досліджуваних інтрогресивних ліній до борошнистої роси може забезпечуватися генами чужинного походження.

6.4.2. Оцінка інтрогресивних ліній за стійкістю до борошнистої роси.

Лінії, наведені у табл. 6.39–6.41, було виділено серед наявної різноманітності інтрогресивних ліній як такі, що виявляють стійкість до ураження польовою популяцією рас збудника борошнистої роси при вирощуванні у м. Києві (2008–2014 рр.) та м. Одесі у (2001–2002 рр.). Із 27 стійких ліній, що пішли від Аврозису, три (res113, res114, res125) не підтвердили свою стійкість з часом, а ще шість (res102, res120, res141, res143, res146, res147) було оцінено більш низьким балом у порівнянні з первинною оцінкою. Решта 18 ліній демонструють стійкість до збудника протягом всього часу спостережень. Серед них лінії res 115, 117, 118, 121, 122, 132, 139, 148 з оцінкою 9, решта з оцінкою 7–8.

Таблиця 6.39

Оцінка стійкості ліній – похідних Аврозису до ураження польовою популяцією рас збудника борошнистої роси у балах, м. Київ

Лінія res	2008	2009	2010	2011	2014	Лінія res	2008	2009	2010	2011	2014
102	9	9	7	7	7	132	9	9	9	9	9
106	9	8-7	9	8	8	134	9	8	8	8	8
113	7	7	5	5	5	135	9	8	8	7	8
114	8	7-6	7	6	6	137	8	8	7	7	7
115	9	9	9	9	9	138	8	7	7	7	7
117	9	9	9	9	9	139	9	9	9	9	9
118	9	9	9	9	9	140	9	9	9	7	7
120	8	8	7	7	7	141	9	7	7	7	7
121	9	9	9	9	9	142	7	7	7	7	7
122	9	9	9	9	9	143	9	7	7	7	7
125	7	5	5	5	5	146	9	9	9	7	7
127	9	8	8	8	8	147	9	9	8	7	7

Лінія res	2008	2009	2010	2011	2014	Лінія res	2008	2009	2010	2011	2014
128	9	8	8	8	8	148	9	9	9	9	9
130	8	8	8	7	8						

Наявність стійких ліній серед похідних Авролати була неочікуваною, оскільки ураження збудником самого амфідиплоїда оцінюється на рівні 5-6 балів, вражається також сам *Ae. umbellulata*. Тем не менш, серед 29 ліній, первинно оцінених як стійкі, частина виявилась константною за проявом стійкості на рівні 9–8 балів (res151, res193, res211, res250) або 8-7 балів (res163, res165, res176, res177, res190, res196, res212, res215, res216, res243, res254, res258) (табл. 6.40). Інші характеризувались падінням балу стійкості або до 7, все ще вважаючись стійкими (res164, res182, res207, res226, res237) або до 5, тобто уражалися борошнистою росою (res166, res166, res195, res202, res206, res217, res221, res222).

Таблиця 6.40

**Оцінка стійкості ліній — похідних Авролати до ураження польовою
популяцією рас збудника борошнистої роси у балах, м. Київ**

Лінія res	2008	2009	2010	2011	2014	Лінія res	2008	2009	2010	2011	2014
151	9	9	9	9	9	207	8	7	7	7	7
163	7	7	7	7	7	211	9	9	9	9	9
164	8	7	7	7	7	212	7	7	7	7	7
165	7	7	7	7	7	215	7	7	7	7	7
166	8	6	5	5	5	216	7	7	7	7	7
176	7	7	7	7	7	217	8	7	7	5	5
177	7	7	7	7	7	221	8	7	7	7	5
182	8	7	6	7	7	222	8	7	7	7	5
189	9	7	7	7	7	226	8	8	7	7	7
190	7	7	7	7	7	237	8	7	7	7	7

Лінія res	2008	2009	2010	2011	2014	Лінія res	2008	2009	2010	2011	2014
193	9	9	9	9	9	243	7	7	7	7	7
195	8	7	7	5	5	250	9	9	9	9	9
196	7	7	7	7	7	254	7	7	7	7	7
202	8	5	5	5	5	258	7	7	7	7	7
206	8	7	5	5	5						

Авродес характеризується повною резистентністю до борошнистої роси. Серед 34 стійких ліній, які походять від Авродесу, константну стійкість на рівні 8–9 балів показали п'ять ліній (res2, res26, res38, res42, res45), на рівні 7 балів — 12 ліній (res8, res16, res17, res19, res22, res28, res31, res44, res46, res53, res55, res70). Шість ліній виявились несталими за рівнем стійкості, який зменшився до 7 балів (res3, res32, res37, res51, res80, res83), ще 11 ліній (res4, res5, res6, res7, res12, res25, res33, res34, res39, res67, res79), оцінених спочатку як стійкі, отримали надалі бали 6–5 (табл. 6.41).

Таблиця 6.41

**Оцінка стійкості ліній — похідних Авродесу до ураження польовою
популяцією рас збудника борошнистої роси у балах, м. Київ**

Лінія res	2008	2009	2010	2011	2014	Лінія res	2008	2009	2010	2011	2014
2	8	8	8	8	8	33	8	5	5	5	5
3	8	7	7	7	7	34	8	7	6	6	5
4	7	5	5	5	5	37	8	8	8	8	7
5	8	8	6	6	6	38	8	8	8	8	8
6	7	6	6	6	6	39	8	8	8	6	6
7	8	6	5	5	5	42	9	9	9	9	9
8	7	7	7	7	7	44	7	7	7	7	7
12	7	7	7	5	5	45	8	8	8	8	8
16	7	7	7	7	7	46	7	7	7	7	7
17	7	7	7	7	7	51	8	7	7	8	7

Лінія res	2008	2009	2010	2011	2014	Лінія res	2008	2009	2010	2011	2014
19	7	7	7	7	7	53	7	7	7	7	7
22	7	7	7	7	7	55	7	7	7	7	7
25	7	5	5	5	5	67	7	7	6	6	6
26	8	8	8	8	8	70	7	7	7	7	7
28	7	7	7	7	7	79	8	6	6	6	6
31	7	7	7	7	7	80	8	8	7	7	7
32	8	8	7	8	7	83	8	8	7	8	7

Для встановлення генетичної основи стійкості, яка забезпечується чужинними генами, що потрапили до геному ліній м'якої пшениці, потрібно було отримати гібриди F_1 від схрещування фенотипів, контрастних за ознакою, що розглядається, та однакових за цією ознакою. Результати оцінювання таких гібридів дають змогу вказати на природу гена стійкості (домінантний чи рецесивний) і в окремих випадках зробити висновок щодо ідентичності генетичної основи стійкості при схрещуванні ліній з однаковим фенотипом. До схрещувань було залучено більшість стійких ліній. Не вдалося схрестити резистентні лінії res2, res26, res45, res151 та res250 через їхню пізньостиглість. Лінії res4, res7, res12, res25, res39, res195, res206, res217, res221, res222 на час отримання гібридів F_1 (2009 рік) вважались стійкими, пізніше стійкість була втрачена.

6.4.3. Гібридологічний аналіз ліній – похідних Аврозису. Найбільш ретельно за допомогою гібридологічного аналізу досліджувались лінії – похідні Аврозису через їхню високу стійкість [4,39,548,834]. Далі у підрозділі стане зрозумілим, що вибір наш не був вдалим. Лінії – похідні Аврозису було залучено до великомасштабного гібридологічного експерименту, і отримані результати через свою неочікуваність на кілька років відтермінували роботу зі стійкими лініями – похідними інших геномно-заміщених амфідиплоїдів. Лінії res – похідні Аврозису, стійкі до борошнистої роси на рівні 8–9 балів за даними оцінювання у м. Одеса (res 115, 117, 118, 121, 122, 127, 128, 132, 134, 135, 137,

138, 139, 140, 146, 148), було залучено до схрещування з сортом Аврора та одна з одною, хоча всі комбінації виконати не вдалося. Гібриди F_1 та F_2 та деякі F_3 оцінювали у 2000, 2001 та 2002 роках. За даними оцінювання протягом трьох вегетаційних періодів рослини F_1 від схрещування стійких ліній із сортом Аврора борошнистою росою не уражувалися. Це показує, що стійкість досліджуваних ліній контролюється домінантним геном (генами). Рослини оцінювались у польових умовах, і питання расоспецифічності гена стійкості навіть не ставилося. Появу трьох уражених рослин F_1 серед загальної кількості гібридів 418 по всіх комбінаціях ($0,71 \pm 0,42$) від схрещування сорту Аврора з лініями res 128, 135, 137 можна пояснити або втратою чужинного генетичного матеріалу через відхилення від нормального перебігу мейозу. Або якимись змінами у регуляції експресії генів, які властиві геномам гібридного походження [341,681], але для обговорювання їх ми не маємо експериментальних даних.

Гібриди F_1 від схрещування ліній з Авророю характеризувались значною стерильністю. Показник фертильності коливався від 0,36 до 1,37. Лише кілька комбінацій від схрещування ліній з Авророю дали достатньо насіння F_2 , щоб можна було б досліджувати розщеплення за стійкістю до борошнистої роси (табл. 6.42).

Таблиця 6.42

Розщеплення у F_2 від схрещування інтрогресивних ліній із сортом Аврора за стійкістю до борошнистої роси

F_2	Всього	Стійкі	Сприйнятливі
res115 x Аврора	103	83	20
res121 x Аврора	77	72	5
res122 x Аврора	99	99	0
res132 x Аврора	79	78	1
res148 x Аврора	74	74	0

Розщеплення у комбінації res115 x Аврора відрізняється від інших та відповідає теоретичному 3 стійких : 1 сприйнятливих ($\chi^2 = 1,71$). В мейозі гібриду F₁ наявні чотири облігатних уніваленти. Звісно, можна припустити, що стійкість контролюється геном, який локалізований в хромосомі, яка кон'югує з гомологом Аврори. Одночасно цікаво перевірити, які результати дасть розрахунок теоретичного розщеплення з урахуванням тих вище наведених міркувань про формування гамет з різною кількістю хромосом та життєздатністю зигот, які виникають з припущення, що критичний ген розташований у хромосомі, яка не кон'югує з гомологом.

Результати розрахунків з урахуванням 4-х унівалентів наведено в табл. 6.43. Підрахунок частот зигот, які дадуть стійкі (0,625) та сприйнятливі (0,375) рослини, показує, що теоретично співвідношення (64 стійких та 39 сприйнятливих, $\chi^2 = 22,41$) не відповідає емпіричному через надлишок у останньому стійких рослин. Зважаючи на результати, наведені у підрозділі 6.1, це не є несподіванкою. Схоже, що має місце післядія зниженої життєздатності анеуплоїдних жіночих гамет, що містять тільки пшеничні хромосоми, та сформованих з них зигот. За результатами підрозділу 4.4 (табл. 4.14), лінія res115 має гаметоцидну хромосому (довге плече) 4S^{sh}, переважну передачу якої нащадкам давно доведено [259,426]. Саме це дасть у результаті зниження частки сприйнятливих нащадків у поколіннях, що розщеплюються. Наступне теоретичне розщеплення було розраховано з таких припущень: 19- та 20-хромосомні жіночі гамети без чужинних хромосом не функціонують (відповідні клітинки у табл. 6.43 затемнено); життєздатність зигот, що не містять жодної чужинної хромосоми (у табл. 6.43 клітинка у рамці) складає $V=0,1$, як це було експериментально визначено у пункті 6.1.2. Після відповідного корегування частот зигот отримали такі частки рослин у F₂: 0,773 стійких та 0,227 сприйнятливих, що відповідає величинам емпіричних класів рослин (теоретичні значення 80 та 23, проти 83 і 20 емпіричних, $\chi^2 = 0,39$). Формально ми мали прийняти першу гіпотезу про локалізацію гена стійкості у хромосомі, яка кон'югує, хоча значення хі-квадрата в цьому випадку було

вищим. Проте друга гіпотеза додатково ускладнена, і це її недолік. Тому можна зробити єдиний висновок: на підставі тестування емпіричного розщеплення за двома різними моделями ми не можемо віддати перевагу жодній з них. Отже щодо лінії res115, ми не можемо надати доказ на користь локалізації гену стійкості в хромосомі, яка кон'югує чи не кон'югує з хромосомою пшениці.

Таблиця 6.43

Макет розрахунку частот зигот від самоzapилення гібриду F_1 від схрещування інтрогресивної лінії з двома чужинними хромосомами та генотипу Аврора

Гамети та їхні частоти ¹⁾		$19+\Pi_1+\Pi_2$	$19+\Pi_1+ч$	$19+\Pi_2+ч$	$19+\Pi_1+ч_к$	$19+\Pi_2+ч_к$	$19+ч+ч_к$
		0,0352	0,0352	0,0352	0,0352	0,0352	0,0352
$19+\Pi_1+\Pi_2+ч+ч_к$	0,0039	0,0007	0,0007	0,0007	0,0007	0,0007	0,0007
$19+\Pi_1+\Pi_2+ч$	0,0117	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
$19+\Pi_1+\Pi_2+ч_к$	0,0117	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
$19+\Pi_1+ч+ч_к$	0,0117	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
$19+\Pi_2+ч+ч_к$	0,0117	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
$19+\Pi_1+\Pi_2$	0,0352	0,0059	0,0059	0,0059	0,0059	0,0059	0,0059
$19+\Pi_1+ч$	0,0352	0,0059	0,0059	0,0059	0,0059	0,0059	0,0059
$19+\Pi_2+ч$	0,0352	0,0059	0,0059	0,0059	0,0059	0,0059	0,0059
$19+\Pi_1+ч_к$	0,0352	0,0059	0,0059	0,0059	0,0059	0,0059	0,0059
$19+\Pi_2+ч_к$	0,0352	0,0059	0,0059	0,0059	0,0059	0,0059	0,0059
$19+ч+ч_к$	0,0352	0,0059	0,0059	0,0059	0,0059	0,0059	0,0059
$19+\Pi_1$	0,1055	0,0176	0,0176	0,0176	0,0176	0,0176	0,0176
$19+\Pi_2$	0,1055	0,0176	0,0176	0,0176	0,0176	0,0176	0,0176
$19+ч$	0,1055	0,0176	0,0176	0,0176	0,0176	0,0176	0,0176
$19+ч_к$	0,1055	0,0176	0,0176	0,0176	0,0176	0,0176	0,0176
19	0,3164	0,0527	0,0527	0,0527	0,0527	0,0527	0,0527
Сума частот гамет=1				Сума частот зигот доводиться до 1 як описано у підрозділі 6.1			

Примітка: ¹⁾ $ч_1$, $п_1$ – чужинна хромосома без гена стійкості та її пшеничний гомеолог, з яким вона не кон'югує; $ч_2$, $п_2$ – чужинна хромосома з геном стійкості (критична) та її пшеничний гомолог, з яким вона не кон'югує

Лінії res 121, 122, 132 та 148 характеризуються однаковою картиною кон'югації хромосом у М1 МКП гібридів F_1 з Аворою (табл. 4.2 підрозділу 4.1). Два облігатних уніваленти показують, що у мейоцитах завжди у наявності дві хромосоми, що не кон'югують. Отже вказані лінії мають одну пару хромосом або чужинних, або значно перебудованих стосовно хромосом сорту Аврора. Судячи з таблиці 4.14, це може бути хромосома $2S^{sh}$. В той же час, ця пара хромосом є однаковою для чотирьох ліній, оскільки у М1 МКП гібридів F_1 між будь-якою парою ліній з чотирьох названих обов'язкових унівалентів не реєструвалось (табл. 4.3 з підрозділу 4.1). Тому ці лінії можна використовувати у генетичному аналізі за ознакою, що контролюється чужинними генами, як одне ціле.

Серед рослин F_2 від схрещування ліній res 121, 122, 132 та 148 з Аворою було 329 стійких рослин та 6 вражалися борошнистою росою (табл. 6.42). Це така сама частка сприйнятливих рослин ($1,79 \pm 0,72$), що спостерігалась серед F_1 , покоління, яке взагалі має бути однорідним ($z = 1,3$ при $z_{0,05} = 1,96$). Тому було висунуте припущення, що поява сприйнятливих рослин серед F_2 має ту саму природу, що і серед F_1 . Тобто ми не маємо розщеплення у F_2 від схрещування ліній з домінантним геном (генами) стійкості та сприйнятливого генотипу Аврора.

Велику кількість комбінацій схрещування для стійких ліній одна з одною було виконано для порівняння генетичного забезпечення стійкості в цих лініях (табл. 6.44). Якщо наші припущення про появу сприйнятливих рослин не в результаті розщеплення за геном стійкості, а в результаті цитологічної нестабільності ліній (гібридів) чи інших мало зрозумілих причин генетичних змін у нащадків є правильними, слід очікувати появу таких нащадків і від схрещування стійких ліній з однаковою генетичною обумовленістю ознаки. У

табл. 6.44 наведено дані оцінки F_2 від схрещування стійких інтрогресивних ліній одна з одною за два роки. Всі гібриди F_1 від таких схрещувань без жодного виключення були стійкими. Схоже, що в цьому випадку результат оцінювання залежить від того, які батьки дали гібрид. Якщо батьківські лінії належать до однієї групи за геномною структурою (див. підрозділ 4.1, у таблиці 6.44 такі комбінації не підкреслено) або до будь-яких різних, крім групи 1, сприйнятливі рослини серед нащадків з'являються дуже рідко: 9 сприйнятливих рослин серед 1434 гібридів F_2 у 2000 році ($0,63 \pm 0,21$ %) та 7 сприйнятливих рослин серед 3368 у 2001 році ($0,21 \pm 0,08$ %). Частки не відрізняються, $z = 1,88$ при $z_{0,05} = 1,96$, $z_{0,01} = 2,58$. Після об'єднання за обидва роки частка сприйнятливих рослин $0,33 \pm 0,08$. В мейозі 1 гібриду від схрещування таких ліній спостерігається або бівалентна кон'югація, або два облігатних уніваленти. Якщо одним з батьків гібриду є лінія з групи 1, в тому числі *res121*, *122*, *132*, *146*, *148* (підкреслено у табл. 6.44), гібриди F_1 як з Авророю, так і з іншими стійкими лініями мають чотири облігатних уніваленти і сприйнятливих рослин у F_2 з'являється більше: 15 з 806 ($1,86 \pm 0,48$ %) у 2000 році та 20 з 1277 ($1,57 \pm 0,35$ %) у 2001 році. Частки не відрізняються, $z = 0,50$ при $z_{0,05} = 1,96$, $z_{0,01} = 2,58$. Після об'єднання за роками частка сприйнятливих рослин $1,68 \pm 0,28$. Частки $0,33 \pm 0,08$ та $1,68 \pm 0,28$ відрізняються ($z = 4,59$ при $z_{0,05} = 1,96$, $z_{0,01} = 2,58$). Доводиться припустити, що поява стійких рослин від схрещування стійких ліній є наслідком формування анеуплоїдних гамет та нежиттєздатних зигот, частота яких зростає разом з кількістю унівалентів. Якщо це відбивається на фенотипному розщепленні, значить критичний ген розташований у хромосомі, яка не кон'югує з гомологом у рослин F_1 . Тому розрахунки часток різних гамет ми зробили, маючи на увазі 4 можливих уніваленти. Тоді у популяції F_2 від схрещування двох стійких ліній, стійкість яких обумовлено одним та тим же геном чужинного походження, будуть з'являтися сприйнятливі рослини. Це не пов'язано з розщепленням за критичним геном, а обумовлено наявністю у метафазі мейозу унівалентних хромосом замість бівалентів. Якщо унівалентів чотири, функціонують лише

еуплоїдні чоловічі гамети, жіночі – ті, що мають не менше 21-хромосоми, очікуване розщеплення 0,978 стійких : 0,022 сприйнятливих. Фактично спостерігали 791 та 15 у 2000 році ($\chi^2 = 0,62$) та 1257 і 20 у 2001 році ($\chi^2 = 2,34$). Поява сприйнятливих рослин серед нащадків F_2 від схрещування ліній з майже однаковою структурою геному (див. табл. 4.3 та 6.44) показує, що і в цьому випадку можуть утворюватися еуплоїдні гамети, позбавлені критичної хромосоми з геном стійкості, та об'єднуватися у життєздатні зиготи, хоча така подія і досить рідкісна. Ситуація ускладнюється додатково, якщо наше припущення про локалізацію гена стійкості у хромосомі $2S^{sh}$ та інформація [258,819] про гаметоцидну природу цієї хромосоми є правильними. Тоді поява сприйнятливих рослин у F_2 від схрещування стійких ліній з однаковою генетичною основою стійкості, з одного боку, та ненормально рідкісна поява сприйнятливих рослин в F_2 від схрещування рослин з альтернативним виразом має пояснюватися не лише формуванням анеуплоїдних гамет та нежиттєздатних зигот, а і наслідком наявності у гаметах гаметоцидної хромосоми. Як можна взяти до уваги вплив гаметоцидної хромосоми на розщеплення за критичним геном, якщо він знаходиться в цій хромосомі, було докладно описано у пункті 6.1.1.

Таблиця 6.44

Розщеплення за стійкістю у F_2 від схрещування інтрогресивних ліній res, стійких до борошнистої роси, одна з одною

Комбінація схрещування	2000 рік		2001 рік		Комбінація схрещування	2000 рік		2001 рік	
	ст ¹⁾	сп ²⁾	ст	сп		ст	сп	ст	сп
115x117	—	—	355	0	<u>127x132</u>	29	2	—	—
<u>115x121</u>	79	3	—	—	128x137	52	1	166	1
<u>115x132</u>	—	—	46	13	<u>128x148</u>	21	1	—	—
115x134	74	0	—	—	<u>132x117</u>	100	1	103	0
115x138	41	0	—	—	132x146	70	0	—	—
115x139	69	0	158	0	132x121	—	—	143	0
<u>115x148</u>	—	—	157	1	132x122	—	—	368	0
117x128	54	0	297	0	132x146	—	—	282	0
117x134	128	1	—	—	134x117	45	3	239	0

Комбінація схрещування	2000 рік		2001 рік		Комбінація схрещування	2000 рік		2001 рік	
	ст ¹⁾	сп ²⁾	ст	сп		ст	сп	ст	сп
117x135	90	0	—	—	135x128	56	0	—	—
118x115	44	1	—	—	135x936	75	0	—	—
118x128	116	0	—	—	137x117	—	—	369	0
<u>118x148</u>	38	0	—	—	137x118	54	1	—	—
<u>121x117</u>	44	2	182	0	138x117	66	0	—	—
<u>121x127</u>	7	0	—	—	138x118	87	2	—	—
<u>121x128</u>	30	1	70	0	139x117	77	1	—	—
<u>121x134</u>	10	0	—	—	139x127	42	0	—	—
121x146	—	—	344	0	139x128	64	0	136	1
121x148	—	—	38	0	<u>146x118</u>	59	1	—	—
<u>122x134</u>	48	1	—	—	146x121	93	0	—	—
<u>122x139</u>	42	0	114	0	<u>146x139</u>	—	—	315	4
122x148	44	1	111	0	<u>146x140</u>	14	1	—	—
127x117	80	0	—	—	<u>148x117</u>	—	—	228	4
127x118	72	0	—	—	<u>148x128</u>	43	1	110	0
127x128	59	0	—	—	148x146	—	—	287	2

Примітки: ¹⁾ ст – стійкі, ²⁾ сп – сприйнятливі.

У цілому, використання ліній – похідних Аврозису, стабільно резистентних до борошнистої роси виявило їхню непридатність для генетичного гібридологічного аналізу через практично повну відсутність розщеплення за критичною ознакою у популяціях F₂. Тим не менш, деякі з них, не залучені у описаному гібридизаційному циклі, було використано надалі для схрещування з інтрогресивними лініями – похідними Авродесу та Авролати.

6.4.4. Успадкування гібридами стійкості до борошнистої роси у комбінаціях схрещування за участю інтрогресивних ліній різного походження. До схрещувань залучили лінії — похідні всіх трьох геномно-заміщених амфідиплоїдів, стійкість яких стабільно оцінювалась в 7 балів або на початку досліджень (2000-01 роки) як 9-8 балів, але протягом наступних генерацій стійкість спала до 7 балів і навіть зовсім була втрачена. Серед похідних Аврозису було залучено п'ять ліній, res113, 120, 141–143, для інших

похідних – переважна частина ліній з числа вивчених за стійкістю (табл. 6.40–6.41). У таблиці 6.45 наведено 52 комбінації схрещування інтрогресивних ліній одна з одною, з сортом Аврора і кількома іншими сортами селекції Одеського Селекційно-генетичного інституту (Одеса), для яких було отримано та вивчено генерацію F₂. Гібриди F₁ всіх комбінацій схрещування були стійкими, що дає підстави вважати гени, які забезпечують стійкість ліній, домінантними та чекати у F₂ розщеплення, яке може базуватися на моно- чи дигібридному успадкуванні ознаки. В останньому випадку слід очікувати співвідношення 15 стійких : 1 сприйнятлива рослина в тих комбінаціях, де компоненти схрещування мають два різних гени стійкості хоча б через те, що є інтрогресивними похідними від різних геномно-заміщених амфідиплоїдів. Звичайно, перш за все припускається найпростіша схема успадкування, коли до уваги не беремо можливість локалізації гена стійкості у хромосомі, яка не утворює у M1 мейозу бівалента з однойменною хромосомою партнера за схрещуванням.

Таблиця 6.45

Результати вивчення гібридів від різних комбінацій схрещування за участю інтрогресивних ліній за стійкістю до борошністої роси

Комбінація схрещування ¹⁾	Оцінка батьків та F ₁			Оцінка рослин F ₂			Обсяг популяції F ₂
	♀	♂	F ₁	стійкі з оцінкою 9	стійкі з оцінкою 7	сприйнятливі	
res 12 x Аврора	7	3	7	0	0	75	75
res17 x Аврора	7	3	7	0	0	123	123
res113 x Аврора	7	3	7	0	1	108	109
res 164 x Аврора	7	3	7	0	0	82	82
res 190 x Аврора	7	3	7	0	1	85	86
res 212 x Аврора	7	3	7	0	1	92	93

Комбінація схрещування ¹⁾	Оцінка батьків та F ₁			Оцінка рослин F ₂			Обсяг популя цій F ₂
	♀	♂	F ₁	стійкі з оцінкою 9	стійкі з оцінкою 7	сприйня тливі	
res 216 x Аврора	7	3	7	0	2	114	116
res 217 x Аврора	7	3	7	0	0	165	165
res 221 x Аврора	7	3	7	0	0	90	90
res 222 x Аврора	7	3	7	0	0	62	62
res 243 x Аврора	7	3	7	6	13	62	81
res 70 x res 7	7	5	8	0	1	108	109
res 222 x res 202	7	5	7	0	3	73	76
res 28 x Одеська 267	7	5	7	0	2	110	112
res 55 x Одеська 267	7	5	7	0	0	125	125
res 141 x Одеська 267	7	5	7	0	1	116	117
res 143 x Одеська 267	7	5	7	0	10	71	81
res 216 x Одеська 267	7	5	7	0	48	50	98
res 217 x Одеська 267	7	5	7	0	0	105	105
res 221 x Одеська 267	7	5	7	0	0	93	93
res 254 x Одеська 267	7	5	7	0	0	100	100
res 25 x Тіра	5	5	7	0	41	56	97
res 28 x Тіра	7	5	7	0	17	108	125
res 254 x Тіра	7	5	8	0	32	81	113
res 258 x Тіра	7	5	7	0	0	79	79
res 166 x Селянка	7	5	7	0	4	101	105
res 216 x Селянка	7	5	7	0	8	110	118
res 221 x Селянка	7	5	7	0	5	89	94

Комбінація схрещування ¹⁾	Оцінка батьків та F ₁			Оцінка рослин F ₂			Обсяг популя цій F ₂
	♀	♂	F ₁	стійкі з оцінкою 9	стійкі з оцінкою 7	сприйня тливі	
res 258 x Селянка	7	5	7	0	2	99	101
res 53 x res 19	7	7	7	0	0	123	123
res 164 x res 254	7	7	7	0	0	102	102
res 165 x res 163	7	7	7	0	8	71	79
res 176 x res 177	7	7	7	0	0	117	117
res 176 x res 221	7	7	7	0	0	113	113
res 177 x res 221	7	7	7	0	6	76	82
res 189 x res 221	7	7	7	0	44	67	111
res 195 x res 143	7	7	7	0	0	125	125
res 195 x res 254	7	7	7	2	1	38	41
res 196 x res 143	7	7	7	0	2	122	124
res206 x res142	7	7	7	1	9	111	121
res 42 x Аврора	9	3	7	0	9	71	80
res 83 x Аврора	8	3	7	0	11	101	112
res 207 x res 7	8	5	7	0	32	67	99
res 38 x Одеська 267	8	5	7	0	62	77	139
res 38 x Тіра	8	5	8	0	43	60	103
res 39 x Одеська 267	8	5	7	0	6	106	112
res 120 x res 143	8	7	7	0	4	91	95
res207 x res142	8	7	7	0	19	105	124
res 226 x res 237	8	7	7	15	82	10	107
res 206 x res 211	7	9	7	0	11	66	77

Комбінація схрещування ¹⁾	Оцінка батьків та F ₁			Оцінка рослин F ₂			Обсяг популя цій F ₂
	♀	♂	F ₁	стійкі з оцінкою 9	стійкі з оцінкою 7	сприйня тливі	
res 211 x res 215	9	7	7	0	0	120	120
res 38 x res120	8	8	7	4	45	28	77

Примітка.¹⁾ лінії res 7–83 є похідними Авродеса, res 113–143 є похідними Аврозиса, res 166–258 є похідними Авролати.

У всіх комбінаціях спостерігали одне і те ж саме відхилення від теоретично очікуваної кількості стійких рослин у бік її зменшення [63,108]. Більше того, від схрещування стійких ліній різного походження одна з одною у F₂ з'являлись сприйнятливі рослини геть до повної відсутності стійких. Навіть якщо припустити, що стійкість є результатом взаємодії кількох генів, при домінуванні у F₁ серед рослин F₂ частка стійких буде падати досить повільно від 0,56 до 0,32 при кількості комплементарних генів два та чотири, відповідно. Частка стійких рослин сягає 0,3 та навіть наближається до 0,5 лише у незначній кількості комбінацій схрещування за участі, переважно, ліній – похідних Авролати (res 189, 207, 216, 226, 234, 254) та трьох ліній – похідних Авродесу (res 7, 25, 38). Лінії – похідні Аврозису, залучені до схрещувань, були іншими, ніж ті, що брали участь у низці циклічних схрещувань, описаних у попередньому пункті, та характеризувались більш низьким балом стійкості, а також її втратою у поколіннях принаймні для одної з них, res 113. Якщо у пункті 6.4.3 ми констатували практично повну відсутність сприйнятливих рослин серед нащадків F₂ при залученні до схрещуванні інших ліній, серед рослин F₂ за участі ліній res 113, 141, 143 майже не було стійких рослин.

Коли у схрещуваннях беруть участь лінії інтрогресивного походження і у поколінні, що розщеплюється, спостерігається відхилення від теоретичного очікуваного співвідношення між фенотипними класами, перше, що видається чинником такого відхилення, це розташування критичного гена у хромосомі, яка у гібриді F_1 , який продукує гамети для отримання F_2 , не утворюють бівалент з гомологом партнера за схрещуванням і частково втрачається через свій унівалентний стан та неупорядковану поведінку у анафазі. Цю ситуацію було нами неодноразово прораховано у попередніх підрозділах розділу 6. Тут наводимо лише узагальнюючу таблицю, де наведені результати розрахунку співвідношення стійких та сприйнятливих рослин при всіх гіпотетичних варіантах формування та функціонування гамет та утворення життєздатних зигот, які дійдуть до стадії оцінки на стійкість до борошнистої роси (табл. 6.46). Фактичні співвідношення характеризуються екстремально великою кількістю сприйнятливих рослин. Максимальне очікуване співвідношення 1,5 сприйнятливих : 1 стійка для моногібридного розщеплення очікується за умов функціонування всіх жіночих та еуплоїдних чоловічих гамет, якщо нулісомики за пшеничною хромосомою нежиттєздатні. Фактичні співвідношення у F_2 від схрещування стійкого та сприйнятливого компонентів схрещування навіть не наближаються до такого співвідношення (табл. 6.45, рис. 6.9). Отже, навіть якщо ген стійкості входить до складу хромосоми, яка не утворює бівалент у мейозі гібриду F_1 , цей чинник не може призвести до результатів, які отримано. У цілому видно, що більше стійких рослин було в комбінаціях за участі ліній з оцінкою 8–9 порівнянно з такими з оцінкою 7 (рис. 6.9).

Таблиця 6.46

Співвідношення фенотипних класів «сприйнятливі» –«стійкі» у F₂ за умов формування різних гамет та функціонування різних зигот, коли ген стійкості знаходиться у хромосомах, що не формують бівалент

Функціонують гамети	Частка рослин		Відношення сприйнятливі:стійкі
	стійких	сприйнятливих	
Функціонують всі зиготи			
1. Всі	0,4375	0,5625	1,29
2. Лише 21-хромосомні	0,75	0,25	0,33
3. Жіночі всі, чоловічі 21-хромосомні	0,625	0,375	0,6
4. Жіночі 21-22- хромосомні, чоловічі 21- хромосомні	0,7857	0,2143	0,27
Не функціонують зиготи, нулісомні за пшеничною хромосомою			
1. Всі	0,4375	0,5625	1,29
2. Лише 21-хромосомні	0,6667	0,3334	0,5
3. Жіночі всі, чоловічі 21-хромосомні	0,4	0,6	1,5
4. Жіночі 21-22- хромосомні, чоловічі 21- хромосомні	0,7273	0,2727	0,375
Не функціонують зиготи, нулісомні за парою гомеологів			
1. Всі	0,64	0,36	0,5625
2. Лише 21-хромосомні	0,75	0,25	0,33
3. Жіночі всі, чоловічі 21-хромосомні	0,625	0,375	0,6
4. Жіночі 21-22- хромосомні, чоловічі 21- хромосомні	0,7857	0,2143	0,2727

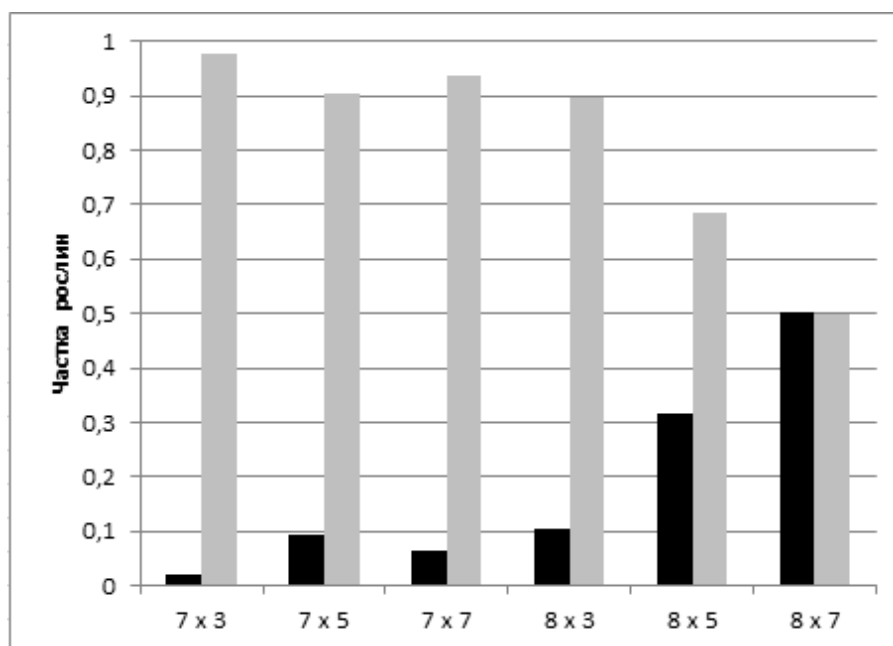


Рис. 6.9. Частки стійких (чорні стовпчики) та сприйнятливих (сірі стовпчики) рослин серед гібридів F_2 , отриманих від схрещування компонентів з балом стійкості, вказаних у підпису до горизонтальної осі.

Кількість стійких рослин була найменшою у комбінаціях, де м'якою пшеницею був сорт Аврора, стійкість якого значно поступається стійкості сортів Одеська 267 та Тіра (рис. 6.10). У цілому лінії – похідні Авродесу, більш успішно передавали нащадкам у популяціях, що розщеплюються, стійкість до борошнистої роси порівнянно з лініями – похідними Аврозису та Авролати (без доведення статистичної значущості різниці) (рис. 6.11). Авродес та Аврозис є резистентними до борошнистої роси, а Авролата вражається в окремі роки з балом 5-4. І все ж серед ліній – похідних Авролати є кілька, повністю стійких до захворювання і саме ці лінії при схрещуванні як з сортами м'якої пшениці, так і одна з одною дають найбільшу частку стійких рослин у порівнянні з інтрогресивними лініями іншого походження.

Гістограма на рисунку 6.9 формує враження, що стійкість носить кількісний характер. Видно, що кількість стійких рослин збільшується разом зі збільшенням стійкості другого (нестійкого) компоненту схрещування. Хоча сорти з балом 3 (Аврора) та балом 5-6 (Тіра) вважаються сприйнятливими, серед нащадків від схрещування стійких інтрогресивних ліній з сортом Тіра

стійких рослин помітно більше, ніж серед нащадків від схрещування з Авророю. І це не можна пояснити просто тим, що гени *Pm*, які забезпечують стійкість ліній, та гени, які підвищують оцінку стійкості з трьох (Аврора) до п'яти–шести балів (Тіра) комбінують у нащадках F_2 та дають більш високий рівень оцінки, оскільки оцінка стає вищою порівнянно з сортами пшениці: стійкими вважаємо рослини з балом 7–9, а не 5–6, як у Тіри. Отже, крім генів *Pm*, які забезпечують вертикальну стійкість до певних рас збудника і ця стійкість є повною, якісною, у сортів пшениці, не таких сприйнятливих, як Аврора, формується расонеспецифічна горизонтальна стійкість, яка може забезпечувати стійкість рослин на рівні 7 балів. Отже, для прояву генів стійкості генетичне тло, на якому відповідний ген буде експресуватися до критичної ознаки, не є нейтральним та вносить свої корективи.

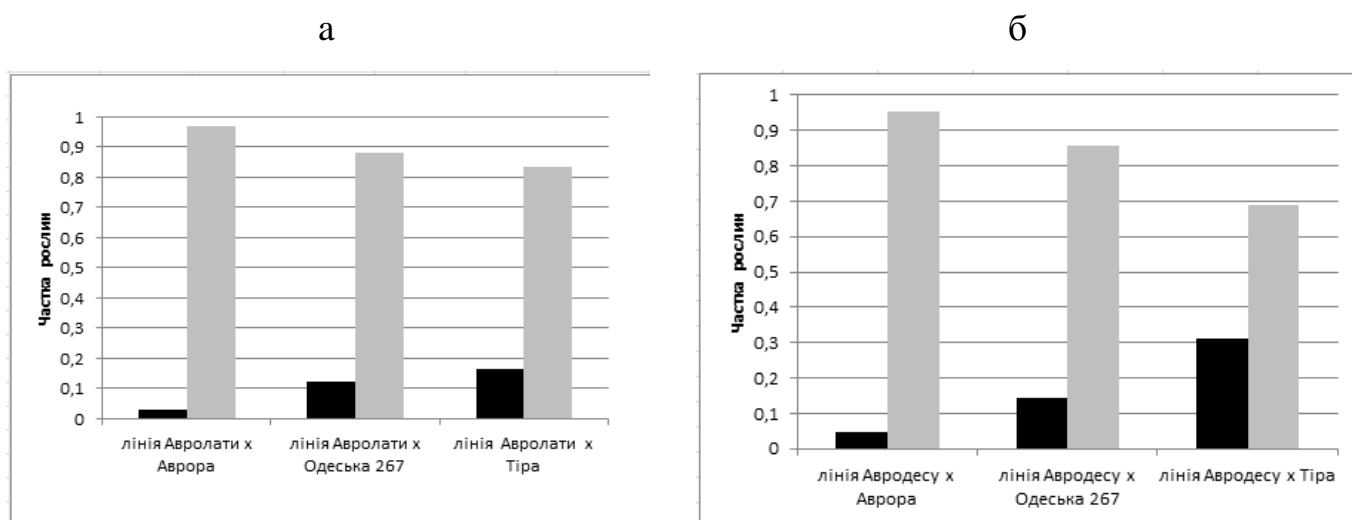


Рис. 6.10. Частки стійких (чорні стовпчики) та сприйнятливих (сірі стовпчики) рослин серед гібридів F_2 . Комбінації схрещування сортовані за стійкістю сортів пшениці м'якої від найменшої (Аврора) до найбільшої (Тіра), з якими схрещувались лінії Авролати (а) чи Авродесу (б)

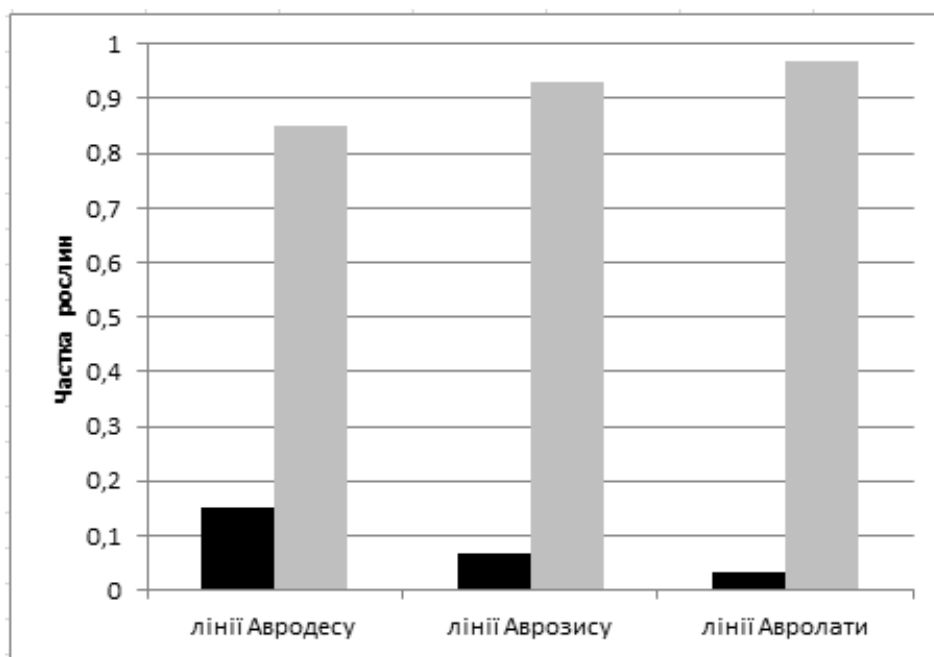


Рис. 6.11. Частки стійких (чорні стовпчики) та сприйнятливих (сірі стовпчики) рослин серед гібридів F_2 . Комбінації схрещування сортовані за походженням ліній (від Авродесу, Аврозису, Авролати), які схрещувались з сортами пшениці м'якої.

Наведені 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 окремо, попередньо оціненої на стійкість. 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 кілька молекулярних механізмів, які призводять до зміни експресії генів без втручання до його нуклеотидної основи (пункти 1.1.2 та 1.1.3 огляду літератури). Це

метилування промотора, гетерохроматизація чужинного хроматину внаслідок ремоделювання, РНК-опосередкована інтерференція експресії гена, активація транспозонів, що супроводжує відповідь рослин на різні стреси, в тому числі гібридизацію. І всі ці зміни експресії спрямовані на замовчування гена, що на фенотипному рівні призводить до зменшення частки стійких рослин проти очікуваної та залишає враження про втрату інтрогресивного матеріалу у рослинах, які мають гібридне походження.

І генетиками, і селекціонерами час від часу відмічалось повне або часткове пригнічення прояву стійкості у міжвидових та міжродових гібридів. Було помічено, що при створенні міжвидових гібридів гексаплоїдної пшениці із дикорослим родичем, чий геном має меншу плоїдність, фенотипний прояв стійкості бував меншим, ніж у донора генів стійкості – дикорослого родича [580]. У інших випадках, гібриди пшениці або похідні амфіплоїди бували повністю чутливими до стресу, що вказувало на генетичне пригнічення стійкості [532]. Припускається, що причиною цього феномену можуть слугувати модифікатори чи часткові інгібітори, наявні у аллополіплоїдному геномі пшениці. Іншою гіпотезою ефекту зменшення рівня стійкості є асиметрія геномів – коли прояв певної ознаки забезпечується переважною експресією генів одного субгеному і замовчуванням гомеологічних генів інших субгеномів [269]. Зокрема для злаків показано на синтетичних гексаплоїдах пшениці, створених від схрещувань стійкого *Triticum turgidum* із чутливим *Aegilops tauschii*, пригнічення стійкості до жовтої іржі через наявність генів-супресорів в А та/чи В субгеномів *Triticum turgidum*. А стійкість до листової іржі, зумовлена дією гена *Lr23*, локалізованого на 2BS хромосомі гексаплоїдної пшениці, пригнічується супресором *SuLr23*, локалізованим у гомеологічному локусі на 2DS хромосомі. Комбінація генів стійкості до корончатої іржі *Pc-62* та *Pc-38* у лініях вівса показала пригнічення *Pc-62*-опосередкованої відповіді. Ця супресія мала домінантний характер та дозо-залежний ефект. Проте в нашому випадку таке зручне пояснення феномену зникнення стійкості не спрацьовує: стійкими були амфидиплоїди, що об'єднували субгеноми АВ

м'якої пшениці з геномом егілопса, стійкими були лінії, які добирали для схрещування, стійкими були гібриди F_1 . Стійкість зникала, коли ці гібриди утворювали гамети. Негативний добір проти зигот з чужинним матеріалом також може сприяти викривленню співвідношення розщеплення у бік зростання обсягу генотипного класу сприйнятливих рослин.

Однак при схрещуванні ліній з інтрогресивним геном стійкості зовсім не завжди спотворення розщеплення у гібридних популяціях відбувається як ексцес сприятливих рослин. Так, ми знайшли інформацію про надлишок стійких рослин у популяції F_2 за участі інтрогресивної лінії пшениця м'яка-*Thinopyrum intermedium*, в якій, за даними [535] новий рецесивний ген стійкості до борошнистої роси WE99, увійшов до складу хромосоми 2BS і переважно передається гібридним нащадком разом зі зчепленими з ними мікросателітними локусами. Незчеплені з ним SSR-локуси тієї самої хромосоми передавались як годиться у співвідношенні 1 : 2 : 1. Це феномен нагадує те, що ми отримали при схрещуванні з пшеницею інтрогресивних ліній зі стійкістю від Аврозиса.

Чи то відбувається втрата чужинного генетичного матеріалу при формуванні гамет та утворенні життєздатних зигот через негативний добір елементів репродукції з поганою пристосованістю, чи то чужинний матеріал нормально передається гібридами своєму насінневому потомству, проте у подальшому припиняється експресія критичного гена, результат маємо один: у гібридних поколіннях, що розщеплюються, кількість стійких рослин проти очікуваної зменшується на порядок та більше. В нашому випадку виявилось, що беккрос зі стійким компонентом схрещування, тобто повторне схрещування з інтрогресивною лінією, погіршує результати щодо частки стійких рослин навіть у порівнянні з F_2 . Пояснити це, спираючись лише на звичні поняття комбінаторної генетики, не можна. Такі результати оцінки гібридних популяцій 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.

Спроба встановити характер успадкування стійкості до борошнистої роси, яка контролюється генами чужинного походження, переданими до м'якої пшениці від трьох видів егілопсів, виявилась невдалою. Модель успадкування не може бути побудована на основі традиційних уявлень про комбінаторику альтернативних алелів, що увійшли до складу гібриду F_1 . Враховування факту можливих наслідків неповної кон'югації хромосом у гібриді F_1 для розрахунку очікуваних співвідношень фенотипних класів покращує ситуацію, але не розв'язує проблему остаточно.

Список публікацій, оприлюднених за результатами досліджень, викладених у розділі 6

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):10-9.

Vdovychenko ZhV, Antonyuk MZ, Ternovskaya TK. Genetic analysis of the *T. aestivum/Ae. sharonensis* introgressive lines of common wheat for resistance to powdery mildew. *Tsitol Genet.* 2005;39(3):67-74.

Вдовиченко ЖВ, Антонюк МЗ, Терновская ТК. Воздействие гаметоцидной хромосомы 4Sl на соотношение фенотипического расщепления при генетическом анализе мягкой пшеницы. *Цитология и генетика.* 2003;37(5):49-56.

Прокопик ДО, Ющук АІ, Антонюк МЗ, Терновська ТК. Гомеологічна належність генів, що контролюють остистість в інтрогресивних ліній м'якої пшениці. *Наукові записки НаУКМА. Випуск Біологія та екологія.* 2009;93:10-6.

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):10-7.

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.

Антонюк МЗ, Штефюк ТВ, Терновська ТК. Мікросателітний аналіз стійких до борошнистої роси інтрогресивних ліній м'якої пшениці різного походження. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць. Київ: Логос, 2015; 6:21–5.

Штефюк ТВ, Михайлик СЮ, Антонюк МЗ, Терновська ТК. Характеристика генетичної різноманітності інтрогресивних ліній пшениці за консервативними регіонами генів стійкості. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць. Київ: Логос, 2016;19:55–60.

Терновская ТК., Антонюк МЗ, Вдовиченко ЖВ. Генетичний аналіз інтрогресивних ліній м'якої пшениці за остистістю колоса. Наукові записки Тернопільського педуніверситета. Серія біологія. 2007;4(34):80-3.

Терновська ТК, Антонюк МЗ, Мартиненко ВС. Гени — промотори остистості у геномах *Triticinae*. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць. Київ: Логос, 2013;12:164-8.

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.

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 book, 2009: ITMI2009_005.

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"; 21–24 вересня, 2010; Львів. Тези доповідей. Львів, 2010, с.17.

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"; 21–24 вересня, 2010; Львів. Тези доповідей. Львів, 2010, с.54.

Prokoryk 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; 24-27 April 2010; Bologna, Italy. Abstract book, 2010, p.89.

Antonyuk M. Segregation distortion problem in genetic analysis of plant material with alien chromatin introgressions. The 9th Plant Genomics European Meeting; May 4–7, 2011; Istanbul, Turkey, Europe; Abstract book, 2011, p.34.

Терновська ТК, Антонюк М., Штефюк ТВ, Мартиненко ВС. Неканонічне успадкування стійкості до борошнистої роси у інтрогресивних лініях м'якої пшениці. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць. Київ: Логос, 2017;21:41-6.

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. Зб. наукових праць. Київ: Логос, 2017;21:17-22.

РОЗДІЛ 7

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. Це були геномно-заміщені амфідиплоїди Авродес, Аврозис, Авролата, що їхніх 42-хромосомних похідних від схрещування з пшеницею м'якою Аврора ми вивчали в чинному дослідженні. Амфідиплоїд такого самого походження Авротіка (AABBTT), за створенням ліній за його участю ми спостерігаємо зараз. Геномно-додані амфідиплоїди, в яких до геному пшениці твердої AABB був доданий геном D від *Ae. tauschii* (амфідиплоїди D³⁻⁹⁰¹) та геном M^t від *Ae. comosa*, з якими велась робота у нашій дослідницькій групі для з'ясування питання, чому у поколіннях інших генерацій домінантна ознака відсутність воскової осуги на рослині змінюється на рецесивну ознаку наявність осуги. Як було показано у підрозділі 5.1 дисертації амфідиплоїди та частина створених на їхній основі інтрогресивних ліній демонструвала нестабільність за проявом морфологічних ознак, а саме за остистістю колосу, його формою, забарвленням зрілої колоскової луски, опушенням колоскової луски, вдавленістю у основі колоскової луски, жорсткістю колоскової луски, розподілу пігменту на колосковій лусці, а також ламкістю колосового стрижня. Мінливість серед амфідиплоїдів була обмежена лише двома з перелічених ознак морфології: остистість у Авротіки та наявність/відсутність воскової осуги у всіх перелічених амфідиплоїдів. Мінливість за рештою з названих ознак морфології ми спостерігали серед розмаїття інтрогресивних ліній – похідних Авродесу, Аврозису і Авролати. Про таку мінливість для Авротіки також повідомлялось [69,110]. 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'явився 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.

Про подібне повідомляється у літературі у останні роки. Цілком наближається до отриманих нами результатів такий приклад. Вивчали три різні лінії – амфідиплоїди ячменю та пшениці твердої, від геномної структури яких очікувалась стабільність та однаковість через спільне походження. Лінії відрізнялись одна від однієї та від батьківських геномів за кількома цитогенетичними та молекулярними маркерами [210]. Про появу серед ліній інтрогресивного походження ознак, взагалі не властивих компонентам схрещування, тобто нових, як ми називаємо такі ознаки у нашій роботі, писали ще в декількох статтях, що цитувалися у підрозділі 1.2.4 [222,295,393, 642,502,505,514,858]. Першу частину нашого огляду літератури присвячено висвітленню питання про твердо встановлений на сьогодні факт формування геному гібридного походження від віддаленого схрещування (гібрид чи амфідиплоїд) не як суми геномів батьківських видів. Перш за все це було встановлено при порівнянні кількості ДНК у батьківських та гібридних геномів, потім відстежували зміни на хромосомному рівні – делеції, варіювання у кількості повторів тощо. Було показано в цілому, що і картина експресії генів в таких геномів не є просто сумою експресії двох об'єднаних геномів. Серед молекулярно-генетичних механізмів, що лежать в основі задокументованих змін, називають метилювання ДНК і модифікацію гістонів, що у сукупності призводить до ремоделювання хроматину та зміні експресії генів, дію маленьких РНК, як міРНК, так і кіРНК, які впливають на експресію генів як безпосередньо, так і через ремоделювання хроматину та замовчуванні повторів,

та рух транспозонів, активація яких у гібридних геномів є одним з найбільш помітних явищ, можливо через те, що розроблено чимало методів для відслідковування такого руху (пункт 1.1.3 дисертації). Переконавшись у факті перманентної мінливості амфідиплоїдів, з якими працюємо, та частини отриманих за їхньою участю ліній, ми здійснили спробу з'ясувати, які саме молекулярно-генетичні чинники викликали такі зміни.

Працювали з лініями, створеними як цитологічно стабільні гексаплоїди з певними інтрогресіями на початку 90-х років. Зареєстрована нами фенотипна мінливість частини з них перш за все викликала сумнів в їхній цитологічній стабільності та ініціювала перевірку їхніх хромосомних формул, що докладно описано у підрозділі 3.1. Було встановлено, що серед паростків інтрогресивних ліній зустрічаються особини з хромосомними кількостями, що відрізняються від 42, особливо серед похідних Аврозису. Проте, по-перше, частоти таких рослин не відрізняються від частоти появи анеуплоїдів у реципієнтного сорту Аврора. А по-друге, не було встановлено, що лінії, які характеризуються перманентною мінливістю за деякими морфологічними ознаками, відрізняються за цитологічними характеристиками від ліній, для яких таку мінливість не виявлено. Звичайно, вивчення М1 мейозу в МКП інтрогресивних ліній має значення в плані проорокування цитологічної стабільності чи нестабільності. Можна припускати, що наявність у М1 унівалентів та мультівалентів не є прикметою цитологічної стабільності. Проте дані, наведені у підрозділі 3.1, свідчать про більшу цитологічну стабільність ліній, ніж можна було б очікувати за результатами вивчення мейозу. Здається, що анеуплоїдні гамети, якщо вони і утворюються рослинами інтрогресивних ліній, відкидаються негативним добором на користь еуплоїдних гамет, які переважно беруть участь у заплідненні, та зигот, які формують життєздатне насіння. Непрямо ця думка підтверджується зниженою фертильністю практично всіх інтрогресивних ліній. Тобто зернівки утворюються не трьома квітками колоска, як це буває у сортів пшениці, а меншою їхньою кількістю. Найбільш цікавим для нас, з погляду на можливості використання інтрогресивних ліній для

генетичного аналізу, є питання про те, чи випадковим чином (стохастично) утворюються анеуплоїдні гамети, які не беруть участі у заплідненні? Чи на перспективу гамети взяти участь у заплідненні може впливати наявність (відсутність) у складі її геному чужинного матеріалу і таким чином здійснюється мейотичний драйв. До вивчення цього питання ми ще не приступали.

Зрозуміло, що використовуючи для оцінки стабільності ліній лише ознаки морфології, ми втрачаємо частину інформації, тому що мінливість може відбиватися на інших характеристиках фенотипу. Тому аналізу були піддані лінії, що їхню геномну структуру встановлювали для хромосомної локалізації інтрогресій, пов'язаних з ознаками остистість та стійкість до борошнистої роси, використовуючи всі біохімічні маркерні ознаки, придатні для такого вивчення (підрозділ 4.3). Серед цих ліній були такі, електрофоретичний спектр яких відповідав спектру геномно-заміщеного амфідиплоїда або сорту Аврора. Лінії, які не виявили повну подібність до одного з батьків, склали дві інші групи: лінії, спектр яких відрізняється від спектру Аврори відсутністю певних компонентів, властивих останньому; лінії, в спектрі яких було виявлено нові компоненти, не властиві спектрам жодному з прабатьківських генотипів. Крім цього для запасних білків було виявлено такі спектри, що в них частина компонентів спектру відповідає спектру Аврори, частина – Авродесу. До того ж, мікросателітний аналіз ДНК інтрогресивних ліній, стійких до борошнистої роси, також виявив поліморфізм електрофоретичних спектрів, який виходить за межі батьківських форм ініціальних гібридів (пункт 4.4.2). Спостерігалися спектри, частково ідентичні до спектру одного із 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, повну відсутність очікуваного компоненту у спектрі. 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.

У розділі 5 наведено результати дослідження, спрямованого на встановлення того, які саме молекулярні механізми мінливості геномів гібридного походження з тих, що інтенсивно досліджуються зараз (огляди [132,269] та зміст пункту 1.1.3 дисертації), є чинниками тих змін, що ми спостерігали у досліджуваному матеріалі. Встановлення таких механізмів 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. Наразі ми переживаємо період накопичення інформації, яка має пояснити молекулярні механізми тих змін, що відбуваються при маніпулюванні геномами та їхніми частинами. На наш погляд, кластери генів, що кодують компоненти електрофоретичного спектру гліадинів, є придатною моделлю для дослідження цих механізмів.

Як видно із наведених у підрозділах 4.3 та 5.2 результатів, електрофоретичні спектри гліадинів інтрогресивних ліній зовсім не відповідають очікуванню, виходячи з походження ліній, характеристикам спектрів та відрізняються від результатів їхнього вивчення, виконаного 15 років тому. Крім чужинних компонентів зрозумілого походження спостерігали появу нових компонентів, не властивих ні спектру Аврори, ані спектру егілопсу, який брав участь у створенні амфідиплоїда. Крім того, спостерігали втрату компонентів, властивих спектру Аврори без появи у спектрі нових компонентів. Серед ліній – похідних всіх геномно-заміщених амфідиплоїдів більшість ліній виявились стабільними за електрофоретичними спектрами гліадинів, і ми їх не

вивчали далі. Інша частина ліній характеризувалась міжгенераційною мінливістю. Внутрішньогенераційну мінливість демонстрували чотири лінії – похідні Авродесу. Отже, факт мінливості частини ліній на фенотипному рівні, представленому компонентами гліадинового спектра, було доведено. Потрібно було з'ясувати, чи супроводжується фенотипна мінливість змінами будови гена на рівні послідовності нуклеотидів.

Структуру генних кластерів, що кодують компоненти гліадинового спектра, на сьогодні добре вивчено. Міжгенні ділянки, розташовані між окремими генами, утворені із повторів [304], містять ретроелементи та складають до 70% послідовностей гліадинових кластерів [327]. Повтори самі по собі створюють сайти з підвищеною рекомбінаційною активністю, в тому числі ектопічною. А транспозони можуть сприяти підвищенню внутрішньогеномної мінливості, якщо переходять до активного стану [327]. Крім того, до складу гліадинових генів входять поліглутамінові ділянки, які кодуються кодонами САА та САG. Ці триплети перетворюються на стоп-кодонами при С – Т транзиції [94,881], що не може не впливати на рухливість компонента спектра, що продукується мутантним алелем. Ці послідовності відомі як мікросателіти, здатні до утворення шпильок поодиноким ланцюгом ДНК в момент реплікації, що призводить до збільшення кількості триpletних повторів [323,881]. Це в свою чергу дає продукт з іншою електрофоретичною рухливістю у спектрі. Мутагенна активність поліглутамінових сайтів підвищується також через нерівний кросинговер, який характерний для мікросателітних повторів [443]. Отже, сама структура гліадинових кластерів робить їх потенційними сайтами для мута- чи рекомбіногенезу, а активація транспозонів у гібридному геномі перетворюють цю потенцію на реальні події. Результати сиквенсу поліморфних компонентів гліадинового спектра показали, що формування більш важкого продукту можна пояснити збільшенням кількості повторів у мікросателітному локусі, а послідовність, що дає продукт, легший за очікуваний, має кілька невеликих делецій від одного нуклеотиду до восьми. Є певна кількість однонуклеотидних мутацій, як транзицій, так і трансверсій.

Щоб з'ясувати, чи має якийсь стосунок до змін у гліадинових кластерах рух транспозонів, застосували метод REMAP до ретротранспозону родини *Sukkula*, оскільки її відносять до родин з найвищою активністю до переміщень по геному [462,549]. Переважна більшість ліній, що досліджувалися, мали відмінності у спектрі REMAP або у цілому за лінією, або у окремих генераціях, або у окремих зернівках (пункт 5.3.5). Це можна трактувати як свідчення значної рухливості 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 ми стали спостерігати серед деяких ліній через деякий час після їхнього створення як цитологічно стабільних гексаплоїдних ліній, слід вважати рух ретротранспозонів.

Другою моделлю у спробах вийти на молекулярний механізм (епі)генетичних змін, що спричинюють появу неочікуваних фенотипів серед нащадків інтрогресивних ліній стали гени бета-амілази (пункт 5.4.2). По-перше, електрофоретичний спектр цього ферменту зовсім нескладний, генетичний контроль всіх компонентів на досліджених генотипах нами давно встановлений. По-друге, ми ретельно вивчали лінії з гаметоцидною хромосоною $4S^{sh}$ та гібриди за їхньою участю, щоб оцінити шанс появи серед гібридних нащадків рослин без гаметоцидної хромосоми. А ця хромосома несе ген $\beta\text{-Amy-S}^{sh} 1$. Тому ми отримали великий обсяг різноманітного гібридного матеріалу, який оцінили за успадкуванням генів $\beta\text{-Amy-D1}$ та $\beta\text{-Amy-A1}$. І було встановлено, що в рослинах, які мають в своєму геномі хромосома $4S^{sh}$ чи її частину з геном $\beta\text{-Amy-S}^{sh} 1$ відбувається певний процес, що призводить до зміни алелів гена бета-амілази на такі, які не входили до складу компонентів ініціального схрещування. За результатами оцінки рослин F_2 в деяких

гібридних комбінаціях складалось враження, що гібрид F_1 , чийх нащадків F_2 ми вивчали, мав у своєму вкладі не 2, як має бути, а три алелі за будь-яким з двох досліджуваних генів бета-амілази, β -*Amy-D1* та β -*Amy-A1*. Однак аналіз даних з розщеплення щодо сполучення окремих алелів серед нащадків показав, що алель виникав саме при формуванні гамет і з'являвся у нащадків.

Мінливість гена бета-амілази у лініях – похідних Аврозису, було досліджено на рівні послідовності ДНК за допомогою ПЛР з внутрішньогенними праймерами для гена β -*Amy* (підрозділ 5.5). Мінливість у спектрах ампліконів серед ліній була така сама, яку спостерігали і на спектрах білкових компонентів: відсутність батьківського компоненту на спектрах з одним компонентом, відсутність одного або обох батьківських компонентів для двокомпонентних спектрів, поява нового компоненту, не властивого батьківським формам. Порівняння спектрів ампліконів, отриманих із праймерами до різних частин гена бета-амілази для ДНК Аврори, Аврозиса, егілопса Шарона та інтрогресивних ліній, які демонструють у своїх спектрах зазначену фенотипну мінливість, показало, що нуклеотидні послідовності гена у деяких ліній відрізняються одна від одної у гені β -*Amy-D1* та, можливо, гені β -*Amy-A1*. Сиквенс продуктів ампліфікації, отриманих з праймером, який дає поліморфні спектри для Аврори та Аврозису, виявив транспозон другого класу *Stowaway*-MITE у генах β -*Amy-A1*, β -*Amy-S^{sh} 1* та його відсутність у гені β -*Amy-D1*. Можливо, наявність транспозону у гені бета-амілази є джерелом його підвищеної мінливості, яка реєструється нами. Крім того транспозони можуть працювати як регуляторні елементи генів, біля яких розташовані [208,266,272,345,620,700,856,865]. Раніше вже було показано поліморфізм за геном бета-амілази, спричинений наявністю *Stowaway*-MITE у четвертому інтроні цього гена у представника *Triticeae* [565]. Поліморфні гени містять повну або усічену послідовність MITE, а також слід від її вирізання або порожній сайт. Важкі амплікони Аврозиса та лінії res117 містять повнорозмірну послідовність MITE, яку пшениця м'яка успадкувала, очевидно, від *T. urartu*, донора субгенома А. Легкий амплікон послідовності MITE не містить.

Вивчаючи деякі егілопси, чий геноми увійшли до складу досліджуваних нами амфідиплоїдів, ми виявили, що *Ae. comosa* (M^tM^t) має відмінний, важчий від Аврориного компонент ампліфікації праймерами NAmu5 [105]. У Міози (AABVM^tM^t [105]), всупереч складу його геному, ДНК не давала компоненту ампліфікації, властивого *Ae. comosa*. Оскільки Міоза є штучним амфідиплоїдом, імовірно, що зникнення послідовності транспозону MITE з гена бета-амілази Міози пов'язане або просто з її елімінацією, або із активацією і переміщенням цього елемента, так що у складі гена бета-амілази Міози він не виявляється. За нашими даними, локалізація елемента MITE у генах бета-амілази сорту Аврора та егілопсу Шарона з одного боку та *Ae. comosa* – з іншого, різна: у четвертому інтроні у геномі *Ae. comosa* та у третьому інтроні у пшениці м'якої (як у *T. urartu*). Раніше було показано, що в ході еволюції *Triticinae* елемент MITE кілька разів зазнавав делецій та інсерцій у четвертий інтрон гена бета-амілази [564]. За нашими даними, крім четвертого інтрону елемент може локалізуватися у третьому інтроні гена бета-амілази пшениці. Отже, наявність у гені бета-амілази транспозону та його задокументований рух може викликати зміни у продуктах експресії гена. Справді, транспозон локалізований у інтронах. Проте, за сучасними даними [208,266,272,345,865], можливий вплив транспозонів на експресію генів слід брати до розгляду.

Інтрогресивні лінії є привабливим матеріалом для їхнього залучення до генетичного аналізу щодо ознак, градації яких відрізняються від таких, які властиві зразкам пшениці м'якої і тим самим збільшують фенотипний поліморфізм пшениці, доволі одноманітної перш за все за ознаками морфології колосу та вегетативної частини рослин. Звичайно, це стосується і до такої важливої для генетиків та селекціонерів ознаки як стійкість до збудників захворювань. Завжди приймається, що та градація ознаки, яка відрізняє інтрогресивну лінію від фенотипу реципієнтного зразку пшениці, контролюється геном (генами) чужинного походження, які увійшли до складу геному лінії у якомусь обсязі чужинного хроматину. Крім того вважається, що, як правило, заміщення чужинним хроматином пшеничного відбувається у

гомеологічних частинах геному. Тому багато уваги в нашому дослідженні було надано вивченню геномної структури інтрогресивних ліній щодо гомеологічної належності та обсягу включеного до їхнього геному чужинного хроматину.

Для генетичного аналізу взагалі і для вивчення геномної структури зокрема прагнули обирати лінії без внутрішньолінійної мінливості за ознаками, які вивчалися. Звичайно, що запоруки в тому, що лінії стабільні щодо інших ознак, які залишались поза межами доступних нам методів дослідження такої мінливості, не було ніколи. Щодо визначення гомеологічної належності інтрогресій з генами, що впливають на ознаку інтересу, використовували молекулярно-генетичні маркери, хромосомна локалізація яких відома. Це були гени, що кодують запасні білки та ферменти, і мікросателітні локуси, специфічні для хромосом різних гомеологічних груп пшениці. Звичайно завжди брали до уваги ознаки морфології пшениці з відомою хромосомною локалізацією генів, що їх контролюють.

Першою та найбільш, на нашу думку, вдалою спробою встановити геномну структуру інтрогресивних ліній щодо обсягу та гомеологічної належності чужинних включень, було вивчення 26-ти ліній – похідних Аврозису, стійких до борошнистої роси. Певний конструктивний результат, досягнутий у цьому циклі робот, визначався правильним підходом до послідовності застосованих аналітичних методів. Спочатку було вивчено хромосомні конфігурації при максимальній асоціації хромосом в M1 МПК гібридів від схрещування ліній з рекурентним генотипом Аврора. Це вказало на кількість та обсяг інтрогресій в лініях. Наступні циклічні схрещування ліній одна з одною та вивчення мейозу у F_1 дало можливість згрупувати лінії стосовно подібності чи різниці структури їхніх геномів щодо наявності та подібності інтрогресій. І тільки після цього приступили до встановлення гомеологічної належності тих п'яти хромосом, які виявились заміщеними поодиночці чи в різних сполученнях в сформованих групах, та транслокацій, наявність яких було очевидно виходячи з картини поведінки хромосом (підрозділи 4.1 та 4.4). Хоча така картина сама по собі і не показує, який

хроматин взяв участь у транслокації, чужинний чи пшеничний. Використання морфологічних та біохімічних (гени білків) хромосомно-специфічних маркерів дало неочікувані для нас результати: майже всі стійкі лінії у якості цілої чужинної хромосоми включали хромосому $2S^{sh}$, в той час як ми, за аналогією з хромосомною локалізацією гена *Pm* у геномі *Ae. longissima*, джерелом гена стійкості припускали хромосому $3S^{sh}$. Гаметоцидну хромосому $4S^{sh}$ чи її плече з гаметоцидним геном мала тільки половина ліній. Це комплексне і доволі тривале дослідження надало нам два практично важливих висновки. По-перше, похідні Аврозису зовсім не завжди несуть гаметоцидну хромосому, отже, є перспектива їхнього використання у якості джерела корисних генів. По-друге, не варто розпочинати вивчення структури інтрогресивних ліній, минаючи етап цитологічного дослідження мейозу гібридів F_1 від схрещування з рекурентним генотипом та між самими лініями. Брак інформації про кон'югацію хромосом може звести нанівець результати всіх інших аналізів, сучасних, ефективних, широко вживаних, наприклад мікросателітного аналізу, і залишити поле для сумнівів.

Нема сумнівів, що отримання і цитологічне вивчення гібридів F_1 від великої кількості комбінацій, результати чого ми тільки що обговорили, є задача складна і її рішення вимагає високої кваліфікації виконавців через цитологічні методики. Набагато простіше виконувати скринінг рослинного матеріалу, відокремленого серед інших ліній за якою-небудь однією ознакою, щодо ознак наявності чужинного хроматину у геномі. Таку роботу ми виконали для ознак опушення краю листової піхви (пункт 4.2.2), остистість колосу (пункт 4.3.2) та для стійкості до борошнистої роси для похідних Авродесу (пункт 4.3.3) з використанням біохімічних генів-маркерів хромосом різних гомеологічних груп. В цілому результати цих досліджень дали конкретні результати. Виявилось, що ген – промотор опушення краю листової піхви локалізований на хромосомі $4S^{sh}$, ген-промотор остистості знаходиться у складі хромосоми $6U$. Це було підтверджено нами у подальших дослідженнях з генетичного аналізу інтрогресивних ліній за вказаними ознаками (підрозділ 6.1

та пункт 6.2.3). А ген стійкості до борошнистої роси, за даними скринування за хромосома-специфічними маркерами, знаходиться у складі хромосоми 6S. І це збігається з інформацією [387] про розташування гена *Pm12 Ae. speltoides* у хромосомі 6S. Отже така послідовність аналітичних кроків також виявилась прийнятною: спочатку вирішуємо питання про гомеологічну належність інтрогресій, а потім обираємо лінії для подальшого генетичного аналізу і вже ці лінії піддаємо цитологічному вивченню у конкретних комбінаціях схрещування. Саме так ми і поступали у подальшому. Як буде видно у розділі 6, всі інтрогресивні лінії, залучені до генетичного аналізу, обов'язково вивчались щодо кон'югації хромосом в мейозі їхніх гібридів F₁.

Наша спроба використати хромосомно-специфічні мікросателітні маркери для скринування наборів ліній – похідних Авродесу і Авролати (Аврозису – лише три лінії), стійких до борошнистої роси, з метою встановити гомеологічну належність хроматину з геном стійкості дала менш певні результати (пункт 4.4.2). З одного боку було підтверджено, що ген стійкості від Аврозису увійшов до складу геному пшениці м'якої як хроматин 2-ої гомеологічної групи, а від Авродесу – 6-ої групи. Хоча в останньому випадку було зареєстровано ще участь хромосоми 3S. Щодо Авролати, серед стійких ліній – її похідних виявлено наявність чужинного хроматину 1, 2, 3 та 6 гомеологічних груп. З іншого боку, нашу увагу привернув значний поліморфізм електрофоретичних спектрів ДНК ліній, який виходить за межі батьківських форм ініціальних гібридів. Деякі з компонентів, властиві спектрам батьківських рослин, зникали. І часто з'являлись інші компоненти, які ми називаємо новими та яких не було у спектрах ДНК батьківських рослин. Жодна із досліджуваних ліній за своїм набором мікросателітних локусів по усім досліджуваним хромосомам не відповідала ні Аврорі, ні амфідиплоїду, від якого пішла. Останнє ще можна пояснити відсутністю заміщення пшеничної хромосоми на чужинну. Однак як можна зрозуміти відсутність в геномі ліній інтактних пшеничних хромосом за всіма гомеологічними групами? Подібні результати було отримано нами недавно при мікросателітному аналізі інтрогресивних ліній Авротіки [375].

Аналізували хромосоми геному D і показали мозаїчність їхньої будови, заміщення цілих хромосом чи їхніх плечей зустрічались рідко. Однак в цьому випадку це зрозуміло, хромосомами D та T кон'югують, отже між ними можлива рекомбінація. В тих амфідиплоїдів, чиїх інтрогресивних похідних ми досліджували, з пшеничними хромосомами кон'югують хромосоми лише *Ae. speltoides* у складі геному Авродесу. Саме там можна очікувати мозаїчні хромосоми рекомбіногенного походження. В двох інших випадках мозаїчність мала виникати через транслокації. Транслокаційний мозаїцизм, на нашу думку, має бути більш унікальною подією у порівнянні з рекомбіногенним, хоча про випадки появи таких мозаїчних хромосом в результаті інтрогресивної гібридизації повідомлялось [391]. За нашими результатами мікросателітного аналізу цей феномен виявляється звичайним. Здається, в даному дослідженні, при використанні великого набору SSR-локусу для кожної хромосоми, ми зіштовхнулися з обмеженою роздільною здатністю мікросателітного аналізу для ідентифікації інтрогресивного хроматину. Виявлений високий поліморфізм за мікросателітними локусами усередині геномів інтрогресивних ліній та, особливо, поява нових алелів, не властивих жодному з компонентів ініціального схрещування, наводить на думку, що цей різновиду аналізу є високочутливим до будь-яких перебудов у геномі поза залежності від того, яким чином вони відбуваються: через наявність у геномі інтрогресивного хроматину чи через зміни у нуклеотидних послідовностях реципієнтного геному пшениці. Корисним виявилось порівняння результатів мікросателітного аналізу з отриманою іншими дослідниками та нами інформацією про хромосомну локалізацію генів, що кодують ознаки морфології (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 вдавненість основи луски для 2-ої групи, наявність остей для хромосом 6-ої групи). Для деяких ліній таке зіставлення підтверджує припущення про мозаїчну будову хромосом у геномах досліджених ліній з залученням різних транслокацій (рекомбінацій) чужинних хромосом до різних хромосом пшениці, а також гомеологічну

належність цих транслокацій, виявлену мікросателітним аналізом. У цілому, на нашу думку, мікросателітний аналіз окремо від інших методів скринування геномів гібридного походження не є надійним інструментом 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.

Наші дослідження щодо вивчення геномів інтрогресивних ліній сформувало в нас переконання в необхідності комплексного підходу у спробах встановлення геномної структури інтрогресивних ліній щодо наявності, обсягу (хромосома – плече – інтрогресивний сегмент) та гомеологічної належності наявних в них інтрогресій. На першому місці має стояти вивчення кон'югації хромосом у гібрида F_1 між лінією, що вивчається, та генотипом, стосовно геному якого шукаємо зміни. Ідентифікація гомеологічної належності має визначатися за допомогою перш за все морфологічних та біохімічних маркерів, тому що фенотип за такими ознаками свідчить про функціональне збереження переданого гена, отже – про наявність у геномі певного обсягу чужинного хроматину. Висловимо малопопулярну думку про те, що геномна та флуоресцентна *in situ* гібридизація, які є наразі головним методичним інструментом вивчення геномів [236,283,285,336,404,600,603,746,874,879, 899,915,929], носять перш за все демонстраційний характер у доведенні факту наявності чужинного хроматину у геномі у певному обсязі. Щодо визначення гомеологічних властивостей хроматину, вона можлива лише через застосування зондів, специфічних до хромосом [618,699,735] чи до цільових генів, які шукаємо у інтрогресивному геномі [204]. Результати вивчення хромосомних конфігурацій у мейозі гібрида F_1 між пшеницею та лінією також дають інформацію про обсяг чужинного хроматину. А висновок про його гомеологічну належність робиться при зіставленні даних вивчення мейозу та даних про наявність маркерних для хромосоми певної гомеологічної групи ознак морфології та біохімії. Хочеться підкреслити, що аналіз в такий спосіб

дає можливість скринувати велику кількість ліній з на порядки меншими матеріальними затратами у порівнянні з *in situ* гібридизацією. Щодо мікросателітів, їхня роздільна здатність як маркерів гомеологічних груп, за нашим досвідом, значно зменшується через високу чутливість молекулярного фенотипу (спектр ампліконів, отриманий з певною парою праймерів) до навіть незначних генетичних змін, які можуть виникати як за рахунок переданого чужинного хроматину, так і у самому резидентному геномі.

Наш багаторічний досвід роботи з лініями пшениці, що мають інтрогресивне походження, сформував тверду впевненість, що такий матеріал незважаючи на всю свою привабливість через наявність поліморфізму, не властивого сортам м'якої пшениці, є невичерпним джерелом артефактів, якщо використовувати його у генетичному аналізі без урахування особливості геномів таких ліній, спричинених їхнім походженням. Для отримання результатів, які б викликали довіру, ми виконували генетичний аналіз лише за ознаками, що мають статус «маркерних», тобто ознаки, за якими можна класифікувати рослини за генотипом, спираючись на їхній фенотип, достатньо надійно. Крім того, такі ознаки мають кодуватися 1-2 генами. Такий вибір ознак дає нам можливість бачити несумісність результатів, які отримуємо, з відомостями про успадкування обраних ознак і досліджувати чинники, які викликають цю несумісність.

Перший досвід у розумінні того, що вивчення генетичного контролю ознаки з боку гена, чужинного для пшениці, з використанням стандартних співвідношень розщеплення за певною кількістю генів (n) через розкриття біному $(3:1)^n$ у F_2 та $(1:1)^n$ не дає результату, який би хоча б здавався адекватним, було отримано у спробі зрозуміти, як контролюється опушення краю листової піхви. Ця домінантна ознака контролюється чужинним геном $Hs-S^{sh}$ у складі хромосоми $4S^{sh}$, гаметоцидної. При моногенному успадкуванні 75% рослин мають бути з опушенням, реально їх було 99%. У гібриді F_1 хромосома не утворює бівалента з пшеничним гомеологом, отже має втрачатися через елімінацію [423], і утворюються анеуплоїдні гамети. Якщо

вони, як часто припускають, не функціонують через знижену конкурентоспроможність, кількість рослин з опушенням все одно очікується 75%, тобто чинник порушення кон'югації хромосом у мейозі не є впливовим у нашому випадку. Однак хромосома $4S^{sh}$ є гаметоцидною, тобто, в ідеалі, виживають та функціонують гамети гетерозиготного (гемізіготного) гібриду лише ті, що мають цю хромосому [41]. Тоді всі рослини F_2 мають бути з опушенням, а частина їх була без опушення. Припустивши, що є певна імовірність p для гамети без гаметоцидної хромосоми взяти участь у формування життєздатної зиготи, ми розрахували, спираючись на експериментальні частоти появи рослин без опушення у різних популяціях F_2 величину p і використали її для розрахунку теоретичних частот таких рослин. Таким чином було пояснено, чому при моногібридному схрещуванні у F_2 замість 0,25 рослин з рецесивним генотипом утворюється близько 0,03. Моногенний характер успадкування зберігається, а чинником спотворення фактичного розщеплення у F_2 проти теоретично очікуваного 3 : 1 є переважна передача гібридами F_1 гаметоцидної хромосоми разом з локалізованим в ній геном інтересу.

При моделюванні співвідношень розщеплення крім умов утворення гамет з різною кількістю хромосом, припущень про їхню участь/неучасть у формуванні зигот завжди постає питання про життєздатність різних зигот – чи мають зиготи з різними генотипами щодо критичного гена однакову життєздатність. Наша спроба хоч якось висвітлити це питання знов базувалась на рослинному матеріалі з хромосомою $4S^{sh}$, в якій міститься ген бета-амілази $\beta\text{-Amy-}S^{sh}1$. Ми скористалися можливістю оцінити наявність рослини з встановленим генотипом за геном бета-амілази двічі: на стадії зернівки F_2 (зернівку розрізали, частину з зародком вирощували для отримання зрілої рослини, другу половинку аналізували за алелями гена амілази) та на стадії дорослої рослини, коли від кожної рослини F_2 брали та вивчали за алельним складом гена бета-амілази чотири зернівки F_3 . Тобто ми оцінювали життєздатність (наявність) рослин з певним генотипом за геном, розташованим

у гаметоцидній хромосомі, на ранній стадії онтогенезу (ембріон) та на стадії його завершення – зріла рослина, яка дала насіння. Встановлений факт стерильності рослин F_2 без гаметоцидної хромосоми не залишає сумніву в тому, що розщеплення у популяції рослин F_2 , генотипи яких визначалися за насіннями F_3 , буде відрізнятися від розщеплення у F_2 , яке визначалось безпосередньо на зернівках F_2 . Рослини F_2 без гаметоцидної хромосоми були, ми бачили це не лише за результатами електрофорезу бета-амілази, а через наявність серед рослин цієї генерації не опушених, тобто без гена $Hs-S^s$, розташованого на тій самій гаметоцидній хромосомі. Отже, є фактор життєздатності зигот, він діє протягом онтогенезу і впливає на оцінку частоти трансмісії гаметоцидної хромосоми. Значить оцінка цієї величини буде залежати від того, на якій стадії онтогенезу рослин ми робимо фенотипну оцінку популяції, що розщеплюється.

Як успадковується остистість колосу, ми вивчали довго та на різному рослинному матеріалі. Наш інтерес до цієї ознаки мав дві складові компоненти. По-перше, у цілому проста фенотипна оцінка, якщо враховувати три градації: колос безостий, колос остистий, колос з осте подібними відростками. По-друге, очевидне протиріччя щодо трактування генетичного контролю ознаки, наявне у літературі досі. Щоб ості розвивались, мають відбуватися якісь події у ранньому онтогенезі, події не можуть відбуватися поза дією генів. А генів – промоторів розвитку остей немає у каталозі МакІнтоша, там є лише гени – інгібітори остистості і вказується їхній домінантний статус. Тим не менш, в статтях минулих років, коли інтенсивно застосовувався моносомний аналіз для локалізації генів пшениці, є інформація про зв'язок розвитку остей з певними хромосомами пшениці без ідентифікації генів (огляд наведено у підрозділі 6.2). За нашими результатами вивчення інтрогресивних ліній – похідних Аврозису, геномну структуру яких щодо гомеологічної належності чужинних включень вивчали за допомогою морфологічних та молекулярно-генетичних маркерів, ген – промотор остистості потрапив до пшеничного геному у складі хромосоми егілопса $6S^{sh}$. За даними [61], ген – промотор розвитку остеподібних відростків

розташованій у хромосомі 6D пшениці м'якої сорту Кавказ, сестринської лінії сорту Аврора [31]. В той же час відомо, що хромосома 6В пшениці м'якої несе домінантний інгібітор остистості *B2* [579]. Постало питання алельності генів – промоторів та інгібіторів остистості. Для його вирішення ми виконали генетичний аналіз кількох зразків пшениці твердої, тому що вона має меншу кількість субгеномів, два замість трьох у пшениці м'якої, а в нас були її зразки зі всіма трьома градаціями розвитку ознаки. За результатами генетичного аналізу було встановлено генотипи п'яти використаних у схрещуванні зразків пшениці твердої щодо двох генів, які беруть участь у контролі ознаки остистість колосу. Мікросателітним аналізом було доведено, що за розвиток остей у остистих зразків відповідає ген, локалізований у хромосомі 6В. Вочевидь, це алель гена *B2*, який у каталозі генів пшениці м'якої значиться як домінантний інгібітор розвитку остей. Другий ген, локалізований у хромосомі 5А, має бути представлений в остистих зразках рецесивним алелем гена *B1*, домінантний алель якого є відомим [579] інгібітором розвитку остей у пшениці м'якій і наявний в тому числі у геномі Аврори (Арбузова, 1994, цит. за [579]).

Наші припущення про хромосомну локалізацію та міжалельну взаємодію генів, що контролюють остистість у пшениці, було підтверджено даними генетичного аналізу із залученням інтрогресивних ліній, похідних Авролати. По-перше, фенотип за остистістю геномно-заміщених амфідиплоїдів та їхніх гібридів з сортом Аврора свідчить переконливо, що домінантний інгібітор остистості *B1*, локалізований у хромосомі 5А і наявний тому у всіх амідиплоїдів та гібридів за їхньою участю, виявляє неповний домінантний епістаз щодо генів – промоторів остистості. Ці гени, звичайно, є у геномах егілопсів зонтичного та Шарона, адже ці егілопси остисті. За нашими даними, ген – промотор остистості локалізований в геномах цих видів в хромосомах 6-ої групи, 6U та 6S^{sh}, відповідно. Ці гени забезпечують розвиток остей в інтрогресивних лініях за умов відсутності пшеничного гена *B1* (5А) в разі його делетування чи дезактивації внаслідок іншої внутрішньохромосомної перебудови. Наявність цього гена призводить до розвитку фенотипу з

остеподібними відростками. В хромосомі 6D Аврори є ген – промотор розвитку остеподібних відростків b_n , гіпостатичний до гена $B1$. Його дія стає помітною в лініях з мутантним геном $B1$. Наша гіпотеза про існування гена b_n та його взаємодію з геном $B1$ в геномі Аврори знайшла підтвердження під час створення інтрогресивних ліній геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка [373]. *Ae. mutica* називається туполусковиком, настільки повною відсутністю остей він характеризується. Авротіка безоста повністю. Незабаром після свого створення як амфідиплоїда (тетра-Аврора х *Ae. mutica*) вона розщепилась на три морфотипи, один з яких мав остеподібні відростки і був константний за цією ознакою [110]. Звідки з'явилися відростки? За нашою гіпотезою, в результаті мутації гена $B1$ у хромосомі 1A. У Авротіці хромосоми 6D з геном – промотором остеподібних відростків b_n немає. Однак цілком можливо, що у хромосомі 6B ген $B2$ представлений не домінантним алелем інгібітора остистості, а рецесивним алелем – промотором розвитку остеподібних відростків, адже за даними моносомного аналізу домінантного алеля $B2$ дійсно немає у геномі Аврори (Арбузова, 1994, цит. за [579]). Таке припущення впливає з ортологічності генів, розташованих у хромосомах однієї і тієї самої гомеологічної групи. Більш того, серед різноманіття створених інтрогресивних ліній, які пішли від схрещування безостого морфотипу Авротіки, з'явилися лінії з остеподібними відростками. Ці лінії, за даними мікросателітного аналізу, виявляли відмінності між хромосомою 5A лінії та хромосомою 5A Аврори (не оприлюднено). На наш погляд, найбільш цікавим фактом, виявленим у описаній серії досліджень, є те, що локус хромосоми 5A поводить себе як «гаряча точка» для мутацій в геномах інтрогресивного походження. Принаймні на похідних Аврозиса, Авролати, Аротіки це виявлено, а похідних Авродеса за остистістю ми не вивчали. В цілому, дослідження остистості колоса показало, що до генетичного аналізу можна залучати лінії інтрогресивного походження та сподіватися на отримання адекватних результатів, якщо такі лінії охарактеризовані щодо обсягу та гомеологічної належності чужинного хроматину та, обов'язково, є інформація про картину кон'югації хромосом у

гібриді F_1 досліджуваної лінії з реципієнтним генотипом (Аврора). Інакше не вдається розрахувати теоретичні співвідношення між фенотипними класами у популяціях, що розщеплюються.

Значення інформації про геномну структуру інтрогресивних ліній стосовно розуміння результатів генетичного аналізу було підтверджено у спробах зрозуміти, які гени в інтрогресивних лініях беруть участь у контролі ознаки забарвлення зрілої луски. Виходячи з інформації про генетичний контроль ознаки у пшениці м'якій (огляд наведено у підрозділі 6.3), припустили, що до геному пшениці ліній з темною лускою у складі інтрогресії потрапляє ген *Rg*, ортологічний генами цієї серії пшениці м'якої. Чітко видно, що моногенне розщеплення у F_2 та беккросах відбувається лише тоді, якщо досліджувана лінія утворює з Аворою гібрид F_1 з бівалентною кон'югацією хромосом. Якщо у такому гібриді утворюється пара унівалентів, як це було показано для одної з ліній – похідних Авролати, доводиться моделювати теоретичне розщеплення з урахуванням утворення анеуплоїдних гамет і зигот. І немає можливості віддати перевагу одній з теоретичних моделей, що враховує різну життєздатність анеуплоїдних гамет та зигот, без додаткової інформації про їхні частки, яку отримати не завжди вдається хоча б через те, що важко спланувати завчасно, яка інформація знадобиться, коли почнеш замислюватися про можливі чинники спотворення емпіричного розщеплення стосовно теоретичного. А заднім числом таку інформацію вже не можна здобути.

Особливо важко трактувати результати аналізу, коли до схрещування залучаються лінії – похідні Авролати з чорним колосом. Зрозумілим було лише те, що розщеплення відбувається за двома генами, один з яких належить до ортологічної серії генів *Rg* (хромосоми 1-ої гомеологічної групи), а другим – ген, названий нами *Bg2*. Свою назву він отримав за аналогією за фенотипним виразом з геном *Bg*, локалізованим на хромосомі 1А пшениці [579]. Обидва гени надають лусці чорний відтінок. Однак в тих комбінаціях від схрещування інтрогресивних ліній з коричневою (*Rg*) та чорною (*Bg2*) лускою гени комбінувались незалежно як такі, що розташовані в різних хромосомах. Крім

того, ознака чорна зріла луска виявляла асоціацію з ознакою опушення луски у всіх лініях – похідних Авролати [67]. Відомості, які існують для локалізації генів, що контролюють ці дві ознаки у інших представників *Triticinae* [579], дають змогу припустити, що обидва гени розташовані на хромосомах 5-ої гомеологічної групи. Ми не могли здобути докази на користь цього припущення тому, що генетичний аналіз ліній за ознакою опушення луски виявився надзвичайно складним через неможливість правильного фенотипування за ознакою опушення. Саме на цій ознаці ми переконались, що правильно фенотипувати рослини F_2 без оцінки родин F_3 , отриманих з кожної рослини F_2 , просто неможливо. Тому результати вивчення лінії за генами опушення в нашій роботі не наводяться і питання генетичного аналізу ліній за цією ознакою складають поле для подальших досліджень.

Зіставлення емпіричних відношень розщеплень у F_2 за ознакою забарвлення колоскової луски з теоретичними, отриманими для різних моделей успадкування з урахуванням факторів конкурентоздатності гамет та життєздатності зигот виявило один і той самий напрямок відхилення емпіричних відхилень від теоретичних: нестачу рослин з тією градацією ознаки, яка контролюється геном чужинного походження, *Rg* чи *Bg2*. Схоже, слід враховувати ще один феномен, який виявляється при роботі з геномами, що мають у своєму складі чужинний хроматин: мейотичний драйв. За [942], мейотичний драйв виявляється у ексцесі гамет з одним з двох альтернативних генетичних станів (в нашому випадку чужинний хроматин у наявності – відсутній), за яким гібрид F_1 є гетерозиготним. Драйв відбувається при формуванні лише жіночих гаметофітів, тому що саме у жіночій статевій сфері лише один з чотирьох продуктів мейозу формує гаметофіт, інші три для кожного конкретного мейоциту від цього усуваються. Якщо вибір цієї єдиної гаплоїдної клітини не є випадковим, а залежить якимось чином від наявності у її геномі чужинного хроматину, може реалізовуватися мейотичний драйв. В результаті серед фенотипів у F_2 ми спостерігатимемо нестачу (як у нашому випадку), рослин, що демонструють чужинну ознаку.

Найбільш складним завданням у нашій роботі виявилось встановлення генетичної основи стійкості до борошнистої роси. Стійкі лінії були серед всіх похідних, Авродеса, Аврозису і навіть Авролати, хоча сама Авролата вражається. Одні і ті самі лінії оцінювались за стійкістю протягом принаймні 10 років і серед всіх похідних були такі, що виявлялись незмінно резистентними з балом 8–9, такі, стійкість яких протягом років дослідження падала до 7 балів, деякі лінії ставали вразливими. Виконавши великий обсяг роботи з генетичного аналізу через схрещування контрастних за ознакою ліній та оцінку популяцій, що розщеплюються, ми практично не спостерігали розщеплень, які б можна було пояснити успадкуванням чужинного гена стійкості в межах, які окреслюються законами Менделя. Працюючи з лініями Аврозису, спостерігали майже повну відсутність розщеплення у F_2 від схрещування контрастних фенотипів. Щоб пояснити ту мізерну кількість сприйнятливих рослин, що з'являлися, потрібно було б припустити, що кожна стійка лінія має кілька генів стійкості з міжгенною неадитивною полімерією, а таке припущення не здавалось нам реальним. Крім того, таку саме частку сприйнятливих рослин реєстрували у F_2 при схрещуванні стійких ліній Аврозису одна з одною. З цими лініями – похідними Аврозису питання пояснюється, на нашу думку, локалізацією гена стійкості у хромосомі $2S^{sh}$, яка є гаметоцидною [258,819], отже переважно передається нащадкам гібрида F_1 разом з геном стійкості. Про локалізацію гена стійкості в цій хромосомі ми ще не знали, коли залучали ці лінії до генетичного аналізу, і вибір ліній для аналізу був невдалим.

З протилежним відхиленням від очікуваного розщеплення, надлишком сприйнятливих рослин, ми зіштовхнулись при залученні до генетичного аналізу ліній – похідних Авродесу, Авролати та кількох ліній Аврозису без фенотипних ознак, що свідчать про наявність в їхньому геномі хромосоми $2S^{sh}$. Як детально було описано у підрозділі 6.4, цей надлишок був таким великим, що його не вдавалось пояснити жодною моделлю успадкування з урахуванням зниженої конкурентоздатності анеуплоїдних гамет чи зниженою життєздатністю анеуплоїдних зигот, які формуються при схрещуванні ліній, чії гомологічні

хромосоми не утворюють бівалентів у мейозі гібридів F_1 . Можна було б залучати різні інші механізми втрати стійкості рослинами, наприклад супресивну взаємодію між генами стійкості. Однак стійкими були не лише амфідиплоїди – прабатьки стійких ліній, стійкими завжди були гібриди F_1 від схрещування стійких та сприйнятливих рослин. На цій стадії нашої роботи ми працювали виключно з окремими рослинами як при отриманні гібридів F_1 , так і з нащадками від їхнього самозапилення для отримання F_2 . Найбільш вражало те, що серед беккросних нащадків стійких F_1 зі стійким компонентом схрещування замість того, щоб продукувати лише стійких нащадків, виявлялась значна кількість рослин сприйнятливих. Якщо б не цей останній факт, можна було б стверджувати, що стійкість зникає, коли гібриди F_1 утворюють гамети, наприклад, через мейотичний драйв, коли перевагу для утворення гаметофіта має лише продукт мейозу без чужинного хроматину. Проте це ніяк не пояснює появу сприйнятливих рослин у беккросі зі стійким компонентом схрещування, адже, за нашими даними, стійкість завжди домінує. Крім того, ми не спостерігали такого тотального викиду чужинного хроматину при дослідженні успадкування інших ознак, що контролювались чужинними генами – остистість, колір луски. Залишається припустити, що відбувається якась епігенетична зміна, внаслідок якої перепиняється експресія гена (генів) стійкості, однак на якому рівні експресії це відбувається, ми навіть припущення висунути поки не можемо. Подальше дослідження цього питання пов'язане, вочевидь, з пошуком внутрішньогенних маркерів для генів стійкості, які допоможуть відстежити наявність чи відсутність конкретного гену у геномі нащадка F_2 . Після цього можна приступати до завдання з'ясувати, яким чином ген перестає бути функціональним.

Головне питання, яке поставило перед нами виконане дослідження і ті результати, що ми представили у дисертації – 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 інтродукованими, 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, як докладно було описано в огляді літератури, 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 [221,295,393,502,509,514,749,843,851,858,875] 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.

РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Лінії інтрогресивного походження, які збираємося вивчати щодо структури геному або використовувати для генетичного аналізу за певними ознаками мають бути завчасно ретельно вивчені стосовно міжгенераційної та внутрішньогенераційної стабільності за фенотипом та кількістю хромосом, фертильністю.

2. Для визначення гомеологічної належності чужинного хроматину як один з найзручніших методів може бути використано мікросателітний аналіз. Оскільки його роздільна здатність у певній мірі обмежена хромосомною групою та сильно залежить від нативності структури пшеничних хромосом, результативність мікросателітного аналізу значно підвищується при одночасному використанні хромосомоспецифічних морфологічних ознак та електрофоретичних спектрів білків.

3. Залучення ліній інтрогресивного походження до генетичного аналізу має перш за все супроводжуватися вивченням поведінки хромосом у M_1 МКП гібрида F_1 , тому що це дає інформацію про перспективу утворення анеуплоїдних гамет та зигот, що може впливати на картину фенотипного розщеплення у популяціях F_2 та аналізуючому беккросі.

4. При виконанні генетичного аналізу доводиться створювати моделі, які мають характеризувати генетичний контроль ознаки, що вивчається, тобто визначити особливості трансмісії та фенотипного виразу генів. Щоб бути впевненими в їхній адекватності, потрібно перш за все робити циклічні схрещування, тоді їхні результати слугуватимуть для перехресної перевірки правильності моделі.

5. Створення гібридів краще базувати на роботі з однією рослиною, починаючи з ініціального схрещування. Одноманітність F_1 не слід вважати апріорною саме через схильність рослин інтрогресивного походження до мінливості. Варто отримувати та оцінювати родини F_3 від F_2 . Це дає змогу

корегувати фенотипну оцінку рослин F_2 , якщо фенотипний вираз ознаки припускає помилки при фенотипуванні рослин у популяції, що розщеплюється.

6. При роботі з гібридним матеріалом варто вести ретельний облік фертильності всіх учасників схеми дослідження. Це може допомогти у побудові та верифікації моделі успадкування.

7. Лінії, які при схрещуванні утворюють гібриди з помітно низькою фертильністю, краще не залучати до генетичного аналізу, тому що важко буде довести адекватність запропонованої моделі розрахунку очікуваних обсягів фенотипних класів.

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 еволюція 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 гдіадинів 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 MITE (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 M1 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 *transferibility*, 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

листяної піхви *Hs-S^{sh}* у геномі Аврозису, ген зернової кислої фосфатази *Acph-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 5A 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* (1A).
13. Гаметоцидна дія гена *Gc* хромосоми 4S^{sh} не є повною. Деякі нащадки гібридів F₁ 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^{sh1}*) спотворює співвідношення розщеплення у F₂ 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 F₁, може впливати на їхню життєздатність протягом онтогенезу.
16. На формування картини розщеплення у F₂ 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 наявністю у M_1 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. 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"; 21–24 вересня, 2010; Львів. Тези доповідей. Львів, 2010, с.17.
2. 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):10-7.
3. 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, т 9. Київ: Логос; 2010, с.3-7.
4. Антонюк МЗ, Вдовиченко ЖВ, Терновская ТК. Цитогенетическое изучение линий мягкой пшеницы, устойчивых к мучнистой росе за счет генов *Aegilops sharonensis*. 11-й Конференция Европейского общества по анеуплоидии пшеницы; 24-28 июля, 2000; Новосибирск, Россия. Тезисы докладов. Новосибирск, 2000:194-5.
5. Антонюк МЗ, Єфіменко ТС, Мартиненко ВС, Терновська ТК. Створення ліній м'якої пшениці з генетичним матеріалом від *Aegilops mutica*. International Scientific Conference "Breeding and Genetics of Agro-cultural Crops: Traditions and Prospects"; October 17-19th, 2012; Odesa, Ukraine. Тези доповідей. Одеса, 2012, с.123-4.
6. 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. Зб. наукових праць, т 21. Київ: Логос; 2017, с.17-22.

7. Антонюк МЗ, Злацкая АВ, Терновская ТК, Мартиненко ВС. Гены зерновой и листовой эстеразы как биохимические маркеры хромосом трех видов эгилопса и пшеницы Мигушевой. *Агроэкологія та біотехнологія. Зб. наук. праць Ін-та агроэкології та біотехнології. Київ, Аграрна наука, 1998;2:169-79.*

8. Антонюк МЗ, Маньковська ОС, Бодильова МВ, Терновська ТК. Генотипний стрес в інтрогресивних лініях як наслідок дії гаметоцидної хромосоми 4S¹. Фактори експериментальної еволюції організмів. *Зб. наукових праць, т 6. Київ: Логос; 2009, с. 34-9.*

9. Антонюк МЗ, Терновская ТК, Злацкая АВ. Идентификация генов зерновой пероксидазы у трех видов эгилопса. *Агроэкологія та біотехнологія. Зб. наук. праць ин-та агроэкології та біотехнології. Київ, Аграрна наука, 1996;1:239-45.*

10. Антонюк МЗ, Терновская ТК, Созинов АА. Идентификация блоков электрофоретических компонентов запасных белков, кодируемых генами трех видов эгилопса. *Физиол биохим культурн раст. 1994;26(5):474-81.*

11. Антонюк МЗ, Терновская ТК, Созинов АА. Идентификация хромосом пырея в чужеродно-замещенных линиях пшеницы с использованием признаков морфологии растений и биохимических маркеров. *Докл Рос акад. сельскохоз наук. 1997;1:4-6.*

12. Антонюк МЗ, Терновская ТК. Изоферменты бета- и альфа-амилазы для идентификации генетического материала трех видов *Aegilops*, включенного в геном мягкой пшеницы. *Цитол генет. 1995; 29(2):3-9.*

13. Антонюк МЗ, Терновская ТК. Использование геномной *in situ* гибридизации для цитогенетического изучения мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. и ее сородичей. *Цитол генет. 2001;35(2):67-76.*

14. Антонюк МЗ, Терновская ТК. Признаки морфологии растений как маркеры гомеологических групп хромосом Triticeae. *Цитол генет. 1997;31(4):105-12.*

15. 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;126-27.

16. 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, с. 368-75.

17. Антонюк МЗ, Штефюк ТВ, Терновська ТК. Мікросателітний аналіз стійких до борошнистої роси інтрогресивних ліній м'якої пшениці різного походження. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць, т 6. Київ: Логос; 2015, с. 21-5.

18. Антонюк МЗ, Штефюк ТВ, Терновська ТК. Поліморфізм інтрогресивних ліній м'якої пшениці за алелями мікросателітних локусів. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць, т 12. Київ: Логос; 2013, с. 97-101.

19. Антонюк МЗ, Михайлик СЮ, Терновська ТК. Мінливість інтрогресивних ліній м'якої пшениці за електрофоретичними спектрами гліадинів. В кн.: Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. Зб. наукових праць ІХ з'їзду УТГіС. Київ: Логос, 2012;4:13-8.

20. Антонюк МЗ, Прокопик ДО, Мартиненко ВС, Терновська ТК. Ідентифікація генів-промоторів остистості в інтрогресивній лінії *Triticum aestivum/Aegilops umbellulata*. Цитол генет. 2012; 46(3):10-9.

21. Вдовиченко ЖВ, Антонюк МЗ. Терновская ТК. Воздействие гаметоцидной хромосомы 4S¹ на соотношение фенотипического расщепления при генетическом анализе мягкой пшеницы. Цитол генет. 2003;37(5):49-56.

22. Вдовиченко ЖВ, Злацкая АВ, Терновская ТК. Новый морфологический маркер хромосом 4-ой гомеологической группы Triticinae. Цитол генет. 2001;1:28-33.

23. Вдовиченко ЖВ, Терновская ТК, Антонюк М.З. Цитогенетическое изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы, устойчивых к мучнистой

росе. Агроекологія та біотехнологія. Зб. наук. праць ин-та агроекології та біотехнології. Київ, 1999, вип. 3, с. 70-78.

24. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. Ю. А. Данилова. Москва: Практика; 1999, 459 с.

25. Голубовская ИН. Цитогенетический анализ неполных пшенично-пырейных амфидиплоидов (НППА)– $2n=56$. В кн.: Хвостова ВВ, редактор. Цитогенетика гибридов, мутаций и эволюция кариотипа. Новосибирск: Наука Сибирское отделение; 1977, 167-194.

26. Ефремова ЕЕ, Майстренко ОИ. Создание линий с межсортовым замещением отдельных хромосом пшеницы на основе чужеродного гена-маркера ржи. Генетика. 1996;32(2):252-8.

27. Єфіменко Т, Антонюк М, Терновська Т. Успадкування морфологічних ознак луски у інтрогресивних ліній м'якої пшениці. Перша конференція молодих вчених «Біологія рослин та біотехнологія»; 5–7 жовтня 2011; Біла Церква, Україна. Тези доповідей, 2011, с.52.

28. 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"; 21–24 вересня, 2010; Львів. Тези доповідей. Львів, 2010, с.54.

29. 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.

30. Жиров ЕГ, Бессараб КС, Губанова МА. Генетическое изучение частичного десинапсиса у мягкой пшеницы. Генетика. 1973; IX(1):18-29.

31. Жиров ЕГ, Бессараб КС. Использование анеуплоидов в цитогенетических исследованиях мягкой пшеницы. В кн.: Селекция и генетика пшеницы. Краснодар; 1982, с.160-84.

32. Жиров ЕГ, Бессараб КС. Цитологические особенности озимой мягкой пшеницы сорта Скороспелка-35. В кн.: Вопросы селекции зерновых,

зернобобовых культур и трав. Зб. науч. трудов. Вып. XIV. Краснодар; 1977, с. 44–52.

33. Жиров ЕГ, Терновская ТК, Бессараб КС. Смешивание геномов в трибе Triticeae. Геном D мягкой пшеницы и геном пырея. Цитология и генетика. 1990;24(4):15-1.

34. Жиров ЕГ, Терновская ТК. Анализ конъюгации хромосом у гибридов пшеницы в связи с происхождением ее геномов. Диплоидные гибриды. Генетика. 1993;29(1):125-34.

35. Жиров ЕГ, Терновская ТК. Передача пшенице *Triticum aestivum* L. хромосомы *Aegilops sharonensis* Eig., придающей ей устойчивость к мучнистой росе. Генетика. 1993;29(4):639-45.

36. Жиров ЕГ, Терновська ТК. Геномная инженерия у пшеницы. Вестник с.-х. науки. 1984;10:58-66.

37. Жиров ЕГ. Геномы пшеницы: исследование и перестройка [дисертація]. Краснодар, Росія; Краснодарській науково-дослідний інститут сільського господарства ім. ПП.Лук'яненка; 1989. 389 с.

38. Злацкая АВ, Антонюк МЗ, Вдовиченко ЖВ, Терновская ТК. Зерновая кислая фосфатаза как генетический маркер хромосом четвертой гомеологической группы хромосом у эгилопсов и пшеницы. Цитол генет. 1999;33(5):42-6.

39. Маньковська О, Терновська Т, Антонюк М. Цитогенетична характеристика стійких до борошнистої роси ліній пшениці з хромосоною 4S^{sh} та без неї і гібридів за їхньою участю. Перша конференція молодих вчених «Біологія рослин та біотехнологія»; 5–7 жовтня 2011; Біла Церква, Україна. Тези доповідей, 2011, с.53.

40. Маньковська ОС, Антонюк МЗ. Гаметоцидні гени представників *Aegilops* L. Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. 2010;8(1):140-53.

41. Маньковська ОС, Терновська ТК, Антонюк МЗ. Цитологічна стабільність та життєздатність інтрогресивних ліній з гаметоцидною

хромосоною 4S¹ та їх гібридів. Наукові записки НаУКМА. Випуск Біологія та екологія. 2009;93:23-6.

42. Методы селекции и оценки устойчивости пшеницы и ячменя к болезням в странах-членах СЭВ. Методические рекомендации. Прага; 1988,321с.

43. 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. Тези доповідей, 2011, с.55.

44. Михайлик СЮ, Антонюк МЗ, Терновська ТК. Генетична варіабельність інтрогресивних ліній м'якої пшениці за генами *Gli*. Наукові записки НаУКМА. Випуск Біологія та екологія. 2011;119:8-14.

45. Михайлик СЮ, Антонюк МЗ, Терновська ТК. Можливі молекулярні механізми мінливості гліадинових генів в інтрогресивних лініях пшениці. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць, т 14. Київ: Логос; 2014, с. 62-6.

46. Михайлик СЮ, Мартиненко ВС, Антонюк МЗ. Варіабельність внутрішньогенних мікросателітних повторів генів α -, β та ω -гліадинів в інтрогресивних лініях пшениці. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць, т 19. Київ: Логос; 2016, с. 33-7.

47. Мощный ИИ, Омельченко ЛИ, Симоненко ВК. Наследование качественных признаков при гибридизации пшеницы с пшенично-элимусным амфиплоидом. Цитол генет. 1997;31(1):20–31.

48. Наваліхіна АГ, Антонюк МЗ, Терновська ТК. Генетична мінливість інтрогресивних ліній м'якої пшениці за геном бета-амілази. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць, т 14. Київ: Логос; 2014, с. 67-71.

49. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. Москва: Агропромиздат; 1988, 271 с.

50. Прокопик ДО, Терновська ТК. Генетичний контроль остистості у твердій пшениці. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць, т 6. Київ: Логос; 2009, с. 216-21.

51. 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;93:10-6.

52. Рибалка ОІ. Чужорідна генетична варіабельність у поліпшенні якості зерна пшениці. Цитол генет. 2008;42(4):18-26.

53. Терновская Т, Антонюк МЗ, Вдовиченко ЖВ. Генетичний аналіз інтрогресивних ліній м'якої пшениці за остистістю колоса. Наукові записки Тернопільського педуніверситета. Серія біологія. 2007;4(34):80-3.

54. Терновская ТК, Антонюк МЗ, Созинов АА. Замещенные линии мягкой пшеницы с одной-тремя парами хромосом *Aegilops sharonensis*. Доповіді НАН України. 1995;12:118-20.

55. Терновская ТК, Антонюк МЗ, Созинов АА. Идентификация чужеродного генетического материала в линиях *T.aestivum* / *Ae.sharonensis*, созданных сочетанием хромосом S¹ и D в рамках одного генома. Агроекологія та біотехнологія. Зб. наук.праць ін-ту агроекології та біотехнології. Київ: Аграрна наука; 1996, с. 216-24.

56. Терновская ТК, Антонюк МЗ. Гены биохимических признаков как маркеры чужеродного генетического материала в геноме пшеницы. Цитол генет. 1996;30(3):71-85.

57. Терновская ТК, Жиров ЕГ. Геном D мягкой пшеницы. Генетический контроль признаков мягкость колосковой чешуи и вдавленность ее основания. Цитол генет. 1993;27(5):78-83.

58. Терновская 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.

59. Терновская ТК, Вдовиченко ЖВ. Зависимость результатов генетического анализа самоопыляющихся видов злаков от природы картирующей популяции. Цитол генет. 2003;37(3):67-79.

60. Терновская ТК, Жиров ЕГ. Геном D мягкой пшеницы. Генетический контроль признаков восковой налет, опушение колосковой чешуи и окраска зрелого колоса. Цитол генет. 1993;27(3):15-20.

61. Терновская ТК. Геном D мягкой пшеницы. Наследование некоторых признаков морфологии колоса. Цитол генет. 1997;31(4):11-8.

62. Терновская ТК. Замещение хромосом генома D мягкой пшеницы хромосомами геномов U или S¹ эгилопсов. Цитол генет. 1994;28(5):50-5.

63. Терновська ТК, Антонюк М., Штефюк ТВ, Мартиненко ВС. Неканонічне успадкування стійкості до борошнистої роси у інтрогресивних лініях м'якої пшениці. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць, т 21. Київ: Логос; 2017, с. 41-6.

64. Терновська ТК, Антонюк МЗ, Мартиненко ВС. Гени — промотори остистості у геномах Triticinae. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць, т 12. Київ: Логос; 2013, с. 164-8.

65. Терновська ТК, Шпильчин В, Антонюк МЗ. Феномен генетичної нестабільності інтрогресивних ліній та амфідиплоїдів пшениці. Abstracts of the International Scientific Conference “Breeding and Genetics of Agro-cultural Crops: Traditions and Prospects”, October 17-19th, 2012, Odesa, Ukraine; Одеса, 2012:197-8.

66. Терновська ТК. Проблема спотворення розщеплення у генетичному аналізі рослинного матеріалу з включеннями чужинного хроматину. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць, т 6. Київ: Логос; 2009, с. 241-5.

67. Терновська ТК, Єфіменко ТС, Антонюк МЗ, Мартиненко ВС. Генетичний контроль морфологічних ознак колосу в інтрогресивних лініях м'якої пшениці. В кн.: Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. Зб. наукових праць IX з'їзду УТГіС. Київ: Логос, 2012;3:175-80.

68. Шпильчин ВВ, Михайлик СЮ, Терновська ТК. Активність транспозона як чинник втрати функції гена *Iw2(T)* у нащадків штучних амфідиплоїдів *Triticinae*. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць, т 6. Київ: Логос; 2009, с. 51-4.

69. 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: 201-5.

70. 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.

71. Штефюк ТВ, Антонюк МЗ. Мікросателітний аналіз хромосом 6D та 7D інтрогресивних ліній пшениці, стійких до борошнистої роси. Фактори експериментальної еволюції організмів, т 14. Зб. наукових праць. Київ: Логос; 2014, с. 86-91.

72. Штефюк ТВ, Михайлик СЮ, Антонюк МЗ, Терновська ТК. Характеристика генетичної різноманітності інтрогресивних ліній пшениці за консервативними регіонами генів стійкості. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць, т 19. Київ: Логос; 2016, с. 55-60.

73. Шулембаева КК, Джалпакова КД. Моносомный генетический анализ качественных и количественных признаков яровой мягкой пшеницы сорта Казахстанская 126.В кн.: Цитогенетика зерновых культур. Таллин; 1990, 178 с.

74. Adams KL, Cronn R, Percifield R, Wendel JF. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:4649-54.

75. Adams KL, Percifield R, Wendel JF. Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. *Genetics* 2004;168:2217-26.

76. Adams KL, Wendel JF. Novel patterns of gene expression in polyploid plants. *Trends in Genetics*. 2005;21:539-43 .

77. Adams KL, Wendel JF. Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2005;8:135-41.
78. Adams KL. Evolution of duplicate gene expression in polyploid and hybrid plants. *J Hered.* 2007;98:136-41.
79. Aghaee-Sarbarzeh M, Ferrahi M, Singh S, Singh H, Friebe B, Gill BS. Ph I -induced transfer of leaf and stripe rust resistance genes from *Aegilops triuncialis* and *Ae. geniculata* to bread wheat. *Euphytica.* 2002;127:377-82.
80. Ainouche ML, Fortune PM, Salmon AQ, Parisod C, Grandbastien M-A, Fukunaga K. Hybridization, polyploidy and invasion: lessons from *Spartina* (Poaceae). *Biol Invasions.* 2009;11:1159-73.
81. Ainsworth CC, Gale MD, Baird S. The genetic control of grain esterases in hexaploid wheat. 1. Allelic variation. *Theor Appl Genet.* 1984;68:219-26.
82. Ainsworth CC, Gale MD, Baird S. The genetics of α -amylase isozymes as wheat. 1. Allelic variation among hexaploid varieties and intra-chromosomal gene locations. *Theor Appl Genet.* 1983;66: 39-49.
83. Ainsworth CC, Miller TE, Gale MD. α -amylase and β -amylase homoeoloci in species related to wheat. *Genet Res Camb.* 1987;49(2):93-103.
84. Akhunova AR, Matniyazov RT, Liang H, Akhunov ED. Homoeolog-specific transcriptional bias in allopolyploid wheat. *BMC Genomics.* 2010;11:505. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-505>
85. Albertin W, Balliau Th, Brabant Ph, Chèvre A-M, Eber F, Maloss Ch, et al. Numerous and rapid nonstochastic modifications of gene products in newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids. *Genetics.* 2006;173:1101-13.
86. ALIGN Query using sequence data [Internet]. Available from: <http://xylian.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>
87. Alix R, Gerard PR, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS. Polyploidy and interspecific hybridization: partners for adaptation, speciation and evolution in plants. *Ann Bot.* 2017;120(2):183-94.
88. Allard RW. Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. *Hilgardia.* 1956;24(10):235-78.

89. Alvarez JG, Guzmán C. Interspecific and intergeneric hybridization as a source of variation for wheat grain quality improvement. *Theor Appl Genet.* 2018;131(2):225-51.
90. An D, Zheng Q, Zhou Y, Ma P, Lv Z, Li L, et al. Molecular cytogenetic characterization of a new wheat-rye 4R chromosome translocation line resistant to powdery mildew. *Chrom Res.* 2013;21(4):419-32.
91. An DG, Zheng Q, Luo QL, Ma PT, Zhang HX, Li LH, et al. Molecular cytogenetic identification of a new wheat-rye 6R chromosome disomic addition line with powdery mildew resistance. *PLoS One.* 2015;10(8):e0134534.
92. Anderson JM, Bucholtz DL, Sardesai N, Santini JB, Gyulai G, Williams CE, et al. Potential new genes for resistance to *Mycosphaerella graminicola* identified in *Triticum aestivum*-*Lophopyrum elongatum* disomic substitution lines. *Euphytica.* 2010;172:251-62.
93. Anderson OD, Greene FC. The characterization and comparative analysis of high-molecular-weight glutenin genes from genomes A and B of a hexaploid bread wheat. *Theor Appl Genet.* 1989;77:697-700.
94. Anderson OD, Greene FC. The α -gliadin gene family. II. DNA and protein sequence variation, subfamily structure, and origins of pseudogenes. *Theor Appl Genet.* 1997;95:59-65.
95. Anderson OD, Hsia CC, Torres V. The wheat γ -gliadin genes: characterization of ten new sequences and further understanding of γ -gliadin gene family structure. *Theor Appl Genet.* 2001;(103):323-30.
96. Anderson OD, Litts JC, Greene FC. The α -gliadin gene family. I. Characterization of ten new wheat α -gliadin genomic clones, evidence for limited sequence conservation of flanking DNA, and Southern analysis of the gene family. *Theor Appl Genet.* 1997;95:50-8.
97. Ang S, Kogulanathan J, Gordon AM, Shewry PR, Tatham AS, Adams GG, et al. Structure and heterogeneity of gliadin: a hydrodynamic evaluation. *Eur Biophys J.* 2010;39:255-61.

98. Anjum FM, Khan MR, Din F, Saeed M, Pasha I, Arshad MU. Wheat gluten: high molecular weight glutenin subunits — structure, genetics, and relation to dough elasticity. *Jour Food Sci.* 2007;72:1750-58.

99. Antonyuk MZ, Ternovskaya TK. Development of alien substitution lines of common wheat by "mixing" chromosomes within a subgenome. In: Mendel Centenary Congress; March 7-10, 2000, Brno, Czech Republic; Abstracts, Votr. *Pflanzenzuchtung*; 2000(47):86.

100. 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; August 31th – September 4th 2009; Clermont-Ferrand, France. Abstract reference: ITMI2009_006.

101. Antonyuk M, Bodylyova M, Ternovska T. Polymorphism of 3D chromosome SSR-loci 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; 24-27 April 2010; Bologna, Italy. Abstract book, 2010, p.23.

102. Antonyuk M, Bodylyova M, Vdovychenko Zh, Ternovskaya T. SSR-markers of gene for resistance to powdery mildew in the common wheat introgressive lines. Conference for Young Scientists, PhD Students and Students on Molecular Biology and Genetics; September 25–27, 2003; Kiev, Ukraine. Abstract Book, 2003:3.

103. 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, p. 33.

104. 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, 2011, p.37.

105. Antonyuk M, Navalikhina A, Ternovska T. Beta-amylase gene variability in introgressive wheat lines. *J Appl Genetics*. 2017; 58(2):143-49.
106. 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; Abstract book, 2012, p.151-2.
107. Antonyuk M, Ternovskaya T, Vdovychenko Zh. Minimization of alien chromatin volume in the introgressive common wheat lines. In: Pogna NE, Romano M, Pogna EA, Galterio G , editors. *Proceedings of the Tenth International Wheat Genetics Symposium*; 1-6 September 2003; Paestum, Italy. Roma: Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura; 2003, p. 869-71.
108. Antonyuk M. Segregation distortion problem in genetic analysis of plant material with alien chromatin introgressions. *The 9th Plant Genomics European Meeting*; May 4–7, 2011; Istanbul. Turkey, Europe; Abstract book, 2011, p.34.
109. Antonyuk MZ, Bodylyova MV, Ternovskaya TK. Genome structure of introgressive lines *Triticum aestivum/Aegilops sharonensis*. *Tsitol Genet*. 2009;43(6):58-67.
110. Antonyuk MZ, Shpylchyn VV, Ternovska TK. Permanent genetic variability in the introgressive lines and amphidiploids of Triticeae. *Cytology and Genetics*. 2013;47(4):242-51.
111. Ashida T, Nasuda S, Sato K, Endo TR. Dissection of barley chromosome 5H in common wheat. *Genes Genet. Syst*. 2007;82:123-33.
112. Autrique E, Singh RP, Tanksley SD, Sorrels ME. Molecular markers for four leaf rust resistance genes introgressed into wheat from wild relatives. *Genome*. 1995;38:75-83.
113. Aversano R, Ercolano MR, Caruso I, Fasano C, Rosellini D, Carputo D. Molecular tools for exploring polyploid genomes in plants. *Int J Mol Sci*. 2012;13:10316-35.
114. Ayala-Navarrete L, Mechanicos AA, Gibson JM, Singh D, Bariana HS, Fletcher J, et al. The Pontin series of recombinant alien translocations in bread

wheat: single translocations integrating combinations of *Bdv2* , *Lr19* and *Sr25* disease-resistance genes from *Thinopyrum intermedium* and *Th. ponticum*. Theor Appl Genet. 2013;126:2467-75.

115. Bai D, Scoles G, Knott D. Transfer of leaf rust and stem rust resistance from *Triticum triaristatum* to durum and bread wheats and their molecular cytogenetic localization. Genome. 1994;37:410-8.

116. Bai D, Scoles GJ, Knott DR. Rust resistance in *Triticum cylindricum* Ces. (4x, CCDD) and its transfer into durum and hexaploid wheats. Genome. 1995;38:8-16.

117. Banks PM, Larkin PJ, Bariana HS, Lagudah ES, Appels R, Waterhouse PM, Brettell RIS, et al. The use of cell cultures for subchromosomal introgressions of barley yellow dwarf virus resistance from *Thinopyrum intermedium* to wheat. Genome. 1995;38:395-405.

118. Banks PM, Xu SJ, Wang RRC, Larkin PJ. Varying chromosome composition of 56-chromosome wheat-*Thinopyrum intermedium* partial amphiploids. Genome. 1993;36:207-15.

119. Bansal M, Kaur S, Dhaliwal HS, Baines NS, Bariana HS, Chhuneja P, et al. Mapping of *Aegilops umbellulata* – derived leaf rust and stripe rust loci in wheat. Plant Pathol. 2016. DOI: 0.1111/ppa.12549.

120. Barbaglia AM, Klusman KM, Higgins J, Shaw JR, Hannah LC, Lal SK. Gene capture by *Helitron* transposons reshuffles the transcriptome of maize. Genetics. 2012;190:965-75.

121. Barker MS , Husband BC, Pires JC. Spreading Winge and flying high: the evolutionary importance of polyploidy after a century of study. Amer J Bot. 2016;103:1139-45.

122. Barreto dos Reis G, Ishii T, Fuchs J, Houben A, Davide LCh. Tissue-specific genome instability in synthetic interspecific hybrids of *Pennisetum purpureum* (Napier grass) and *Pennisetum glaucum* (pearl millet) is caused by micronucleation. Chromosome Res. 2016. DOI 10.1007/s10577-016-9521-0.

123. Barton N. The role of hybridization in evolution. *Mol Ecol.* 2001;10:551-68.

[124. Basic Local Alignment Search Tool \[Internet\]. Available from: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi)

125. Bassam BJ, Gresshoff PM. Silver staining DNA in polyacrylamide gels. *Nat Protoc.* 2007;2(11):2649-54.

126. Baubec T, Dinh HQ, Pecinka A, Rakic B, Rozhon W, Wohlrab B, et al. Cooperation of multiple chromatin modifications can generate unanticipated stability of epigenetic states in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2010;22:34-47.

127. Beaulieu J, Jean M, Belzile F. The allotetraploid *Arabidopsis thaliana*-*Arabidopsis lyrata* subsp *petraea* as an alternative model system for the study of polyploidy in plants. *Mol Genet Genomics.* 2009;281:421-35.

128. Benbouza P, Jacquemin J-M, Baudoin J-P, Mergeai G. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 2006;10(2):77-81.

129. Bennett FGA. Resistance to powdery mildew in wheat: a review of its use in agriculture and breeding programmes. *Plant Pathol.* 1984;33:279-300.

130. Bennetzen JL, Wang H. The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes. *Annu Rev Plant Biol.* 2014;65:505-30.

131. Bennetzen JL, Ma JX, Devos K. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Ann Bot.* 2005;95:127-32.

132. Bennetzen JL, Wang H. The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes. *Ann Rev Plant Biol.* 2014;65:505-30.

133. Bennetzen JL. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Mol Biol.* 2000;42:251-69.

134. Bento M, Gustafson JP, Viegas W, Silva M. Size matters in Triticeae polyploids: larger genomes have higher remodeling. *Genome.* 2011;54:175-83.

135. Bento M, Gustafson P, Viegas W, Silva M. Genome merger: from sequence rearrangements in triticale to their elimination in wheat-rye addition lines. *Theor Appl Genet.* 2010;121(3):489-97.

136. Bento M, Pereir HS, Rocheta M, Gustafson P, Viegas W, Silva M. Polyploidization as a retraction force in plant genome evolution: sequence rearrangements in triticale. *PLoS One* 2008;3(1): e1402. doi:10.1371/journal.pone.0001402. PMID:18167561.

137. Bhullara R, Nagarajana R, Bennypaula H, Sidhua GK, Sidhua G, Rustgia S, et al. Silencing of a metaphase I-specific gene results in a phenotype similar to that of the *Pairing homeologous 1 (Ph1)* gene mutations. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2014;111(39): 14187-92.

138. Birchler JA, Riddle NC, Auger DL, Veitiac RA. Dosage balance in gene regulation: biological implications. *Trends Genet.* 2005;21:219-26.

139. Blanc G, Hokamp K, Wolfe KH. A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the *Arabidopsis* genome. *Genome Res.* 2003;13:137-44.

[140. Blast - Basic Local Alignment Search Tool \[Interet\]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore?term=BLAST](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore?term=BLAST)

141. Bluethner WD, Schubert V, Mettin D. Instability in amphiploids and backcross derivatives of *Triticum aestivum* x *Aegilops caudata* cross. In: Miller TE, Koebner RMD, editors. Proceedings of the Seventh International Wheat Genetics Symposium; 13-19 July 1988; Cambridge, England. Institute of Plant Science Research; 1988, p. 209-13.

142. Bomblies K, Madlung A. Polyploidy in the *Arabidopsis* genus. *Chrom Res.* 2014; 22(2):117-34.

143. Bosch A, Vega C, Benito C. The peroxidase isozymes of the wheat kernel: tissue and substrate specificity and their chromosomal location. *Theor Appl Genet.* 1987;73(3):701-6.

144. Bottley A, Xia GM, Koebner RMD. Because gene silencing in hexaploid wheat. *Plant Jour.* 2006;47:897-906.

145. Bougas B, Normandeau E, Audet C, Bernatchez L. Linking transcriptomic and genomic variation to growth in brook charr hybrids (*Salvelinus fontinalis* Mitchill.). *Heredity*. 2013;110:492-500.
146. Boyko A, Kovalchuk I. Genetic and epigenetic effects of plant–pathogen interactions: an evolutionary perspective. *Molecular Plant*. 2011;4(6):1014-23.
147. Brodersen P, Voinnet O. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet*. 2006;22:268-80.
148. Brown-Guedira GL, Badaeva ED, Gill BS, Cox TA. Chromosome substitutions of *Triticum timopheevii* in common wheat and some observations on the evolution of polyploid wheat species. *Theor Appl Genet*. 1996;93:1291-98.
149. Brzezinski W, Mendelenski P. Improved PAGA procedure for identification of wheat, triticale, barley and cultivar. XII Eucarpia
150. Buggs RJ, Chamala S, Wu W, Tate JA, Schnable PS, Rapid DE, Repeated and clustered loss of duplicate genes in allopolyploid plant populations of independent origin. *Curr Biol*. 2012;22:248-52.
151. Buggs RJ, Doust AN, Tate JA, Koh J, Soltis K, Feltus FA, et al. Gene loss and silencing in *Tragopogon miscellus* (Asteraceae): comparison of natural and synthetic allotetraploids. *Heredity*. 2009; 103:73-81.
152. Buggs RJ, Renny-Byfield S, Chester M, Jordon-Thaden IE, Viccini LF, Chamala S, et al. Next-generation sequencing and genome evolution in allopolyploids. *Am J Bot*. 2012;99(2):372-82.
153. Buggs RJ, Zhang L, Miles N, Tate JA, Gao L, Wei W, et al. Transcriptomic shock generates evolutionary novelty in a newly formed, natural allopolyploid plant. *Current Biology*. 2011;21: 551-6.
154. Bureau TE, Wessler SR. *Stowaway*: a new family of inverted repeat elements associated with the genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Cell*. 1994;6:907-16.
155. Caceres ME, Pupilli F, Ceccarelli M, Vaccino P, Sarri V, De Pace C. et al. Cryptic introgression of *Dasyphyrum villosum* parental DNA in wheat lines derived from intergeneric hybridization. *Cytogenet Genome Res* 2012;136:75-81.

156. Cai X, Chen PD, Xu SS, Oliver RE, Chen X. Utilization of alien genes to enhance *Fusarium* head blight resistance in wheat: a review. *Euphytica*. 2005;142:309-18.

157. Ceoloni C, Donini P. Combining mutations for two homoeologous pairing suppressor genes *Ph1* and *Ph2* in common wheat and in hybrids with alien Triticeae. *Genome*. 1973;36:377-86.

158. Ceoloni C, Forte P, Kuzmanovic L, Tundo S, Moschetti I, De Vita P, et al. Cytogenetic mapping of a major locus for resistance to *Fusarium* head blight and crown rot of wheat on *Thinopyrum elongatum* 7EL and its pyramiding with valuable genes from a *Th. ponticum* homoeologous arm onto bread wheat 7DL. *Theor Appl Genet*. 2017; DOI 10.1007/s00122-017-2939-8.

159. Ceoloni C, Jauhar PP. Chromosome engineering of the durum wheat genome: strategies and applications of potential breeding value. In: Singh RJ, Jauhar PP, editors. Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement, volume 2: cereals. Boca Raton (FL): CRC Press. 2006, p.27-9.

160. Ceoloni C, Kuzmanovic L, Forte P, Virili ME, Bitti A. Wheat-perennial Triticeae introgressions: major achievements and prospects. In: Molnár-Láng M, Ceoloni C, Doležal J, editors. Alien introgression in wheat. Cytogenetics, molecular biology, and genomics. New York (NY): Springer; 2015, p. 273-314.

161. Ceoloni C. Transfer of a mildew resistance gene from *Triticum longissimum* to common wheat by induced homoeologous recombination. *Genetica Agraria*. 1984;38:326-32.

162. Chantret N, Salse J, Sabot F, Rahman S, Bellec A, Laubin B, et al. Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*). *Plant Cell*. 2005;17:1033-45.

163. Chapman MA, Abbott RJ. Introgression of fitness genes across a ploidy barrier. *New Phytol*. 2010;186:63-71.

164. Chapman V, Riley R, Miller TE. Alien chromosome addition and substitution lines. Annual Report, 1974. Cambridge: Plant Breeding Institute; 1974, p. 125-26.

165. Charpentier A. Production of disomic addition lines and partial amphiploids of *Thinopyrum junceum* on wheat. C R Acad Sci Paris. 1992; 315(III): 551–557.
166. Chaudhary B, Flagel L, Stupar RM, Udall JA, Verma N, Springer NM, et al. Reciprocal silencing, transcriptional bias and functional divergence of homeologs in polyploid cotton (*Gossypium*). Genetics. 2009;182:503-17.
167. Chaudhary HK, Kaila V, Rather SA, Badiyal A, Hussain W, Jamwal NS, et al. Wheat. In: Pratap A, Kumar J, editors. Alien Gene Transfer in Crop Plants, Volume 2. Achievements and Impacts. Springer Science+Business Media, LLC; 2014, p. 1-26. DOI 10.1007/978-1-4614-9572-7_1
168. Chelaifa H, Monnier A, Ainouche M. Transcriptomic changes following recent natural hybridization and allopolyploidy in the salt marsh species *Spartina x townsendii* and *Spartina anglica* (Poaceae). New Phytol. 2010.186:161-74.
169. Chen F, Zhao F, Liu S, Xia G. The γ -gliadin gene content of a derivative from a somatic hybrid between bread wheat and tall wheatgrass. Molec Breed. 2009;9:32-7.
170. Chen M, Ha M, Lackey E, Wang JL, Chen ZJ. RNAi of met1 reduces DNA methylation and induces genome-specific changes in gene expression and centromeric small RNA accumulation in *Arabidopsis* allopolyploids. Genetics. 2008;178:1845-58.
171. Chen PD, Gill BS. The origin of chromosome 4A, and genomes B and G of tetraploid wheats. In: Sakamoto S, editor. Proceedings of the Sixth International Wheat Genetics Symposium; November 28-December 3 1983; Kyoto, Japan. Plant Germ-Plasm Institute, Faculty of Agriculture, Kyoto University; Kyoto, Japan; 1983, p. 39-48.
172. Chen PD, Liu W, Yuan J, Wang X, Zhou B, Wang S, et al. Development and characterization of wheat-*Leymus racemosus* translocation lines with resistance to *Fusarium* head blight. Theor Appl Genet. 2005;111:941-8.

173. Chen PD, Tsujimoto H, Gill BS. Transfer of *Phl* genes promoting homoeologous pairing from *Triticum speltoides* to common wheat. *Theor Appl Genet.* 1994;88:97-101.

174. Chen PD, You CF, Hu Y, Chen SW, Zhou B, Cao AZ, et al. Radiation-induced translocations with reduced *Haynaldia villosa* chromatin at the *Pm21* locus for powdery mildew resistance in wheat. *Mol Breed.* 2013;31:477-84.

175. Chen Q, Jahier J, Cauderon Y. Enhanced meiotic chromosome pairing in intergeneric hybrids between *Triticum aestivum* and diploid Inner Mongolian *Agropyron*. *Genome.* 1992;35:98-102.

176. Chen Q, Lu YL, Jahier J, Bernard M. Identification of wheat-*Agropyron cristatum* monosomic addition lines by RFLP analysis using a set of assigned wheat DNA probes. *Theor Appl Genet.* 1994;89:70-5.

177. Chen S, Chen PD, Wang X. Inducement of chromosome translocation with small alien segments by irradiating mature female gametes of the whole arm translocation line. *Sci China Ser Life Sci.* 2008; 51: 346–352.

178. Chen X. Small RNAs and their roles in plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009 25:21-44.

179. Chen ZJ , Yu HH. Genetic and epigenetic mechanisms for polyploidy and hybridity. In: Chen ZJ, Birchler JA, editors. *Polyploid and hybrid genomics*. New York: Wiley-Blackwell; 2013, p. 335-54.

180. Chen ZJ, Comai L, Pikaard CS. Gene dosage and stochastic effects determine the severity and direction of uniparental rRNA gene silencing (nucleolar dominance) in *Arabidopsis* allopolyploids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:14891-6.

181. Chen ZJ, Pikaard CS. Transcriptional analysis of nucleolar dominance in polyploid plants: biased expression/silencing of progenitor rRNA genes is developmentally regulated in *Brassica*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:3442-7.

182. Chen ZJ. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annu Rev Plant Biol.* 2007;58(1):377-406.

183. Chen ZJ. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends Plant Sci.* 2010;15:57-71.
184. Cherukuri DP, Gupta SK, Charpe A, Koul S, Prabhu KV, Singh RB, et al. Molecular mapping of *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat. *Euphytica.* 2005;143:19-26.
185. Chester M, Gallagher JP, Symonds VV, Cruz da Silva AV, Mavrodiev AV, Leitch AR. Extensive chromosomal variation in a recently formed natural allopolyploid species, *Tragopogon miscellus* (Asteraceae). *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109(4): 1176-81.
186. Chhuneja P, Kaur S, Goel RK, Aghaee-Sarbarzeh M, Prashar M, Dhaliwal HS et al. Transfer of leaf rust and stripe rust resistance from *Aegilops umbellulata* Zhuk. to bread wheat *Triticum aestivum* L. *Genet Res Crop Evol.* 2008;55:849-59.
187. Chhuneja P, Kumar K, Stirnweis D, Hurni S, Keller B, Dhaliwal HS, et al. Identification and mapping of two powdery mildew resistance genes in *Triticum boeoticum* L. *Theor Appl Genet.* 2012;124:1051-8.
188. Choulet F, Alberti A, Theil S, Glover N, Barbe V, Daron J, et al. Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. *Science.* 2014;345(6194):1249721. doi: 10.1126/science.1249721.
189. Cifuentes M, Grandont L, Moore G, Chèvre AM, Jenczewski E. Genetic regulation of meiosis in polyploid species: new insights into an old question. *New Phytologist.* 2010;186:29-36.
190. ClustalW multiple sequence alignment program for DNA or proteins (Galaxy Version 0.1) [Internet]. Available from: <https://galaxy.pasteur.fr/forms::supermatcher>
191. Comai L, Madlung A, Josefsson C, Tyagi A. Do the different parental 'heteromes' cause genomic shock in newly formed allopolyploids? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003;358:1149-55.
192. Comai L, Tyagi AP, Winter K, Holmes-Davis R, Reynolds SH, Stevens Y, et al. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Cell.* 2000;12:1551-68.

193. Comai L. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat Rev Genet.* 2005;6:836-46.
194. Conner RL, Kuzyk AD, Su H. Impact of powdery mildew on the yield of soft white spring wheat cultivars. *Can J Plant Sci.* 2003;83:725-8.
195. Conner RL, MacDonald MD, Whelan EDP. Evaluation of take-all resistance in wheat–alien amphiploid and chromosome substitution lines. *Genome.* 1988;30:597-602.
196. Copete A, Cabrera A. Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in *Agropyron cristatum* and mapping of conserved orthologous set molecular markers. *Euphytica.* 2017;213:189. DOI 10.1007/s10681-017-1981-6.
197. Cox TS, Raupp WJ, Gill BS. Leaf rust-resistance genes *Lr41*, *Lr42* and *Lr43* transferred from *Triticum tauschii* to common wheat. *Crop Science.* 1992;34:339-43.
198. Cox TS. Deepening the wheat gene pool. *J Crop Prod.* 1998;1: 1-25.
199. Crasta OR, Francki MG, Bucholtz DB, Sharma HC, Zhang J, Wang RC, et al. Identification and characterization of wheat-wheatgrass translocation lines and localization of barley yellow dwarf virus resistance. *Genome.* 2000;43:698-706.
200. Crespo-Herrera LA, Garkava-Gustavsson L, Ahman I. A systematic review of rye (*Secale cereale* L.) as a source of resistance to pathogens and pests in wheat (*Triticum aestivum* L.) *Hereditas.* 2017;154:14. DOI 10.1186/s41065-017-0033-5
201. Cronn RC, Adams KL. Quantitative analysis of transcript accumulation from genes duplicated by polyploidy using cDNA-SSCP. *Biotechniques.* 2003;34:726-34.
202. Dai Ch, Zhang J-P, Wu X-Y, Yang X-M, Li X-Q, Liu W-H. Development of EST markers specific to *Agropyron cristatum* chromosome 6P in common wheat background. *Acta Agron Sinica.* 2012;38:1791-1801.
203. Dai Ch, Gao A. Identification of wheat-*Agropyron cristatum* 6P translocation lines and localization of 6P-specific EST markers. *Euphytica.* 2016;208(2):265-75.

204. Danilova TV, Friebe B, Gill BS. Development of a wheat single gene FISH map for analyzing homoeologous relationship and chromosomal rearrangements within the Triticeae. *Theor Appl Genet.* 2014;127:715-30.

205. de Alba AEM, Parent J-SD, Vaucheret Y. Small RNA-mediated control of development in plants. In: Grafi G, Ohad V, editors. *Epigenetic memory and control in plants. Signaling and communication in plants.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2013, p. P.177-99.

206. De Las Heras JI, King IP, Parker JS. 5-azacytidine induces chromosomal breakage in the root tips of wheat carrying the cuckoo chromosome 4Sl from *Aegilops sharonensis*. *Heredity.* 2001;87:474-9.

207. de Meaux J, Pecinka A. The *Arabidopsis* genus: an emerging model to elucidate the molecular basis of interspecific differences in transposable element activity. *Mob Genet Elem.* 2012;2:142-4.

208. de Souza FSJ, Franchini LF, Rubinstein M. Exaptation of transposable elements into novel cisregulatory elements: Is the evidence always strong? *Mol. Biol. Evol.* 2013;30:1239-51.

209. del Pozo JC, Ramirez-Parra E. Whole genome duplications in plants: an overview from *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 2015;66(22):6991-7003.

210. Delgado A, Carvalho A, Martin AC, Martin A, Lima-Brito J. Genomic reshuffling in advanced lines of hexaploid tritordeum. *Genet Resour Crop Evol.* 2016; DOI 10.1007/s10722-016-0439-3.

211. Delibes A, Del Moral J, Martin-Sanchez JA, Mejias A, Gallego M, Casado D, et al. Hessian fly-resistance gene transferred from chromosome 4Mv of *Aegilops ventricosa* to *Triticum aestivum*. *Theor Appl Genet.* 1997;94:858-64.

212. Devos KM, Brown JKM, Bennetzen JL. Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in *Arabidopsis*. *Genome Res.* 2002;12:1075-9.

213. Devos KM, Gale MD. Extended genetic maps of the homoeologous group 3 chromosomes of wheat, rye and barley. *Theor Appl Genet.* 1993;85:649-52.

214. Devos KM, Gale MD. Genome relationships: the grass model in current research. *The Plant Cell*. 2000; 2:637-46.
215. Dewey DR. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae. In: Gustafson JP (ed) Gene manipulation in plant improvement. Proc 16th Stadler Genetics Symp, Columbia, MO. New York: Plenum Press, NY; 1984, p. 209-79.
216. Dhaliwal HS, Harjit-Singh WM. Transfer of rust resistance from *Aegilops ovata* into bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and molecular characterisation of resistant derivatives. *Euphytica*. 2002; 126: 153–159.
217. Diaz-Salazar J, Orellana J. *Aegilops searsii* species specific DNA and chromosome markers. *Chromosome Res*. 1995;3:99-105.
218. Dizier M, Babron M, Clerget-Darpoux F. Conclusions of LOD-score analysis for family data generated under two-locus models. *Am J Hum Genet*. 1996;58:1338-46.
219. Dolezel J, Kubalaková M, Paux E, Bartos J, Feuillet C. Chromosome based genomics in the cereals. *Chrom Res*. 2007;15:51-66.
220. Doležel J, Vrána J, Šafář J, Bartoš J, Kubaláková M, Šimková H. Chromosomes in the flow to simplify genome analysis. *Funct Integr Genomics*. 2012;12:397-416.
221. Dong Zh, Wang H, Dong Y, Wang Y, Liu W, Miao G. Extensive microsatellite variation in rice induced by introgression from wild rice (*Zizania latifolia* Griseb.). *PLoS One*. 2013;8(4).<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062317>
222. Dong ZY, Wang YM, Zhang ZJ, Shen Y, Lin XY, Ou XF, et al. Extent and pattern of DNA methylation alteration in rice lines derived from introgressive hybridization of rice and *Zizania latifolia* Griseb *Theor Appl Genet*. 2006;113:196-205.
223. dos Reis GB, Ishii T, Fuchs J, Houben A, Davide LC. Tissue-specific genome instability in synthetic interspecific hybrids of *Pennisetum purpureum* (Napier grass) and *Pennisetum glaucum* (pearl millet) is caused by micronucleation. *Chromosome Res*. 2016; DOI 10.1007/s10577-016-9521-0.

224. Dou QW, Lei YT, Li XM, Mott IW, Wang RRC. Characterization of alien grass chromosomes in backcross derivatives of *Triticum aestivum* - *Elymus rectisetus* hybrids by using molecular markers and multi-color FISH/GISH. *Genome*. 2012;55:337-47.
225. Douglas GM, Gos G, Steige KA, Salcedo A, Holm K, Josephs EB, et al. Hybrid origins and the earliest stages of diploidization in the highly successful recent polyploid *Capsella bursa-pastoris*. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2015;112(9):2806-11.
226. Dover GA, Riley R. Variation at two loci affecting homoeologous meiotic chromosome pairing in *Triticum aestivum* × *Aegilops mutica* hybrids. *Nat New Biol*. 1972;235:61-62.
227. Downen RH, Pelizzola M, Schmitz RJ, Lister R, Downen JM, Nery J, et al. Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:E2183-E2191. doi:10.1073/pnas.
228. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1987;19:11-5.
229. Driscoll CJ, Anderson LM. Cytogenetic studies of Transec – a wheat-rye translocation line. *Can J Genet Cytol*. 1967;9:375-80.
230. Driscoll CJ. Wheat–*Triticum kotschyi* (*Aegilops variabilis*) (2n=28) addition lines. *EWAC Newsl*. 1974;4:60.
231. Driscoll JC, Sears ER. Individual addition of the chromosomes of Imperial rye to wheat. *Agron Abst, ASA, Madison WI*. 1971; p 6.
232. Du W, Wang J, Wang L, Wu J, Zhao J, Liu Sh, et al. Molecular characterization of a wheat–*Psathyrostachys huashanica* Keng 2Ns disomic addition line with resistance to stripe rust. *Molec Genetics Genomics*. 2014; 289(5): 735–743.
233. Du WL, Wang J, Lu M, Sun SG, Chen XH, Zhao JX, et al. Molecular cytogenetic identification of a wheat – *Psathyrostachys huashanica* Keng 5Ns disomic addition line with stripe rust resistance. *Mol Breed*. 2013;31(4):879-88.
234. Du WL, Wang J, Lu M, Sun SG, Chen XH, Zhao JX, et al. Characterization of a wheat–*Psathyrostachys huashanica* Keng 4Ns disomic addition line for enhanced tiller numbers and stripe rust resistance. *Planta*. 2014;239:97-105.

235. Dubcovsky J, Lukaszewski AJ, Echaide M, Antonelli EF, Porter DR. Molecular characterization of two *Triticum speltoides* interstitial translocations carrying leaf rust and greenbug resistance genes. *Crop Sci.* 1998;38:1655-60.
236. Dundas I, Zhang P, Verlin D, Graner A, Shepherd K. Chromosome engineering and physical mapping of the *Thinopyrum ponticum* translocation in wheat carrying the rust resistance gene Sr26. *Crop Sci.* 2015;55:648-57.
237. Dundas IS, Frappell DE, Crack DM, Fisher JM. Deletion mapping of a nematode resistance gene on rye chromosome 6R in wheat. *Crop Sci.* 2001;41:1771-8.
238. Dunoyer P, Brosnan CA, Schott G, Wang Y, Jay F, Alioua A, et al. An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *EMBO J.* 2010;29:1699-712.
239. Dvořák J, Deal KR, Luo MC. Discovery and mapping of wheat *Ph1* suppressors. *Genetics.* 2006;174:17-27.
240. Dvorak J, Yang Z-L, You FM, Luo M-Ch. Deletion polymorphism in wheat chromosome regions with contrasting recombination rates. *Genetics.* 2004;168:1665-75.
241. Dvorak J. Chromosomal distribution of genes in diploid *Elytrigia elongata* that promote or suppress pairing of wheat homoeologous chromosomes. *Genome.* 1987;29:34-40.
242. Dvorak J. Genetic variability in *Aegilops speltoides* affecting homoeologous pairing in wheat. *Can J Genet Cytol.* 1972;14:371-80.
243. Dyck PL, Kerber ER, Martens JW. Transfer of a gene for stem rust resistance from *Aegilops caudata* to common wheat. *Can J Plant Sci.* 1990;70:931-34.
244. Dyck PL, Kerber ER. Inheritance in hexaploid wheat of adult-plant leaf rust resistance derived from *Aegilops squarrosa*. *Can J Genet Cytol.* 1970;12:175-80.
245. Dyck PL, Samborski DJ. Host-parasite interactions involving two genes for leaf rust resistance in wheat. In: Finlay KW, Shepherd KW, editors. *Proceedings of the Third International Wheat Genetics Symposium; 5-9 August, 1968; Australian*

Academy of Science, Canberra, Australia. Australian Academy of Science; 1968, p. 245-50.

246. Ehdaie B, Whitkus RW, Waines JG. Root biomass, water-use efficiency and performance of wheat-rye translocations of chromosomes 1 and 2 in spring bread wheat 'Pavon'. *Crop Sci.* 2003;43:710-7.

247. Eickbush TH, Eickbush DG. Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics.* 2007;175:477-85.

248. Eilam T, Anikster Y, Millet E, Manisterski J, Feldman M. Nuclear DNA amount and genome downsizing in natural and synthetic allopolyploids of the genera *Aegilops* and *Triticum*. *Genome.* 2008;1(8):616-27.

249. Eilam T, Anikster Y, Millet E. Genome size in diploids, allopolyploids, and autopolyploids of mediterranean Triticeae. *J Bot.* 2010; Article ID 341380,12 pages.doi:10.1155/2010/341380

250. El Baidouri M, Carpentier MC, Cooke R, Gao D, Lasserre E, et al. Widespread and frequent horizontal transfers of transposable elements in plants *Genome Res.* 2014;24(5):831-8.

251. El Baidouri M, Murat F, Veyssiere M, Molinier M, Flores R, Burlot L, et al. Reconciling the evolutionary origin of bread wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytol.* 2017;213:1477-86.

252. Elkot AFA, Chhuneja P, Kaur S, Saluja M, Keller B, Singh K. Marker assisted transfer of two powdery mildew resistance genes *PmTb7A.1* and *PmTb7A.2* from *Triticum boeoticum* (Boiss.) to *Triticum aestivum* (L.). *PLoS ONE.* 2015;10(6):e0128297.

253. Endo TR, Gill BS. The deletion stocks of common wheat. *J Hered.* 1996;87(4):295-307.

254. Endo TR, Katayama Y. Finding of a selectively retained chromosome of *Aegilops caudata* L. in common wheat. *Wheat Inf Serv* 47. 1978;48:32-5.

255. Endo TR, Tsunewaki K. Sterility of common wheat with *Aegilops triuncialis* cytoplasm. *J Hered.* 1975;66:13-8.

256. Endo TR, Yamamoto M, Mukai Y. Structural changes of rye chromosome 1R induced by gametocidal chromosome. *Jpn J Genetics*. 1994;69:13-9.
257. Endo TR. Allocation of a gametocidal chromosome of *Aegilops cylindrica* to wheat homoeologous group 2. *Genes Genet Syst*. 1996;71:243-6.
258. Endo TR. Gametocidal chromosomes and their induction of chromosome mutations in wheat. *Jpn J Genetics*. 1990;65:135-52.
259. Endo TR. Two types of gametocidal chromosome of *Aegilops sharonensis* and *Ae. longissima*. *Jpn. J. Genet*. 1985;60:125-135.
260. Ersfeld K. Fiber-FISH: fluorescence *in situ* hybridization on stretched DNA. *Methods Mol Biol*. 2004;270-402.
261. Eser V. Characterisation of powdery mildew resistant lines derived from crosses between *Triticum aestivum* and *Aegilops speltoides* and *Ae. mutica*. *Euphytica*. 1998;100:269-72.
262. Farooq S, Iqbal N, Shah TM. Promotion of homoeologous chromosome pairing in hybrids of *Triticum aestivum* × *Aegilops variabilis*. *Genome*. 1990; 33:825–828.
263. Fedak G, Kim N-S. Tools and methodologies for cytogenetic studies of plant chromosomes. *Cytol Genet*. 2008;42(3): 189-203.
264. Fedak G. Alien Introgressions from wild *Triticum* species, *T. monococcum*, *T. urartu*, *T. turgidum*, *T. dicoccum*, *T. dicoccoides*, *T. carthlicum*, *T. araraticum*, *T. timopheevii*, and *T. miguschovae*. In: Molnár-Láng M, Ceoloni C, Doležal J, editors. Alien introgression in wheat. Cytogenetics, molecular biology, and genomics. New York (NY): Springer; 2015, p.191–220.
265. Federico ML, Iniguez-Luy FL, Skadsen RW, Kaeppler HF. Spatial and temporal divergence of expression in duplicated barley germin-like protein encoding genes. *Genetics*. 2006;174:179-90.
266. Fedoroff NV. McClintock and epigenetics. In: Plant Transposons and Genome Dynamics in Evolution. Fedoroff NV, editor. Ames, IA: Wiley and Sons; 2013, p.61-70.

267. Fehr WR. Principles of cultivar development. Vol. 1. Theory and techniques. New York: Macmillan Publishing Co.NY; 1987, 539 p.

268. Feldman M, Lupton FGH, Miller TE. Wheats. In: Smartt J, Simmonds NW, editors. Evolution of crop plants. 2nd Edition. London: Longman Scientific; 1995. p.184-92.

269. Feldman M, Levy AA, Fahima T, Korol A. Genomic asymmetry in allopolyploid plants: wheat as a model. J Exp Bot. 2012;14:5045-59.

270. Feldman M, Liu B, Segal G, Abbo S, Levy AA, Vega JM. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. Genetics. 1997;147(3):1381-7.

271. Feldman M. The origin of cultivated wheat. In: Bonjean A, Angus W, editors. The wheat book. Paris: Lavoisier Tech and Doc; 2001, p. 1-56.

272. Fernandez L, Torregrosa L, Segura V, Bouquet A, Martinez-Zapater JM. Transposon-induced gene activation as a mechanism generating cluster shape somatic variation in grapevine. Plant J. 2010; 61:545-57.

273. Fernandez-Calvin B, Orellana J. Metaphase-I bound-arm frequency and genome analysis in wheat-*Aegilops* hybrids. 2. Cytogenetical evidence for excluding *Ae. sharonensis* as the donor of the B genome of polyploid wheats. Theor Appl Genet.1993;85:587-92.

274. Feschotte C, Jiang N., Wessler SR. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. Nat Rev Genet. 2002;3:329-41.

275. Feschotte C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. Nat Rev Genet. 2008;9:397-405.

276. Fligel L, Udall J, Nettleton D, Wendel J. Duplicate gene expression in allopolyploid *Gossypium* reveals two temporally distinct phases of expression evolution. BMC Biology. 2008;6:16.doi: 10.1186/1741-7007-6-16.

277. Fligel LE, Wendel JF. Evolutionary rate variation, genomic dominance and duplicate gene expression evolution during allotetraploid cotton speciation. New Phytologist. 2010;186:184-93.

278. Forster BP, Reader SM, Forsyth SA, Koebner RMD, Miller TE, Gale MD, et al. An assessment of the homoeology of six *Agropyron intermedium* chromosomes added to wheat. *Genet Res.* 1987;50:91-7.

279. Francki MG, Crasta OR, Sharma HC, Ohm HW, Anderson JM. Structural organization of an alien *Thinopyrum intermedium* group 7 chromosome in US soft red winter wheat (*Triticum aestivum* L). *Genome.* 1997;40:716-22.

280. Freeling M, Woodhouse MR, Subramaniam S, Turco G, Lisch D, Schnable JC, et al. Fractionation mutagenesis and similar consequences of mechanisms removing dispensable or less-expressed DNA in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2012;15:131-9.

281. Freeling M. Bias in plant gene content following different sorts of duplication: tandem, whole-genome, segmental, or by transposition. *Annu Rev Plant Biol.* 2009;60:433-53.

282. Friebe B, Badaeva ED, Hammer K, Gill B. Standard karyotypes of *Aegilops uniaristata*, *Ae. mutica*, *Ae. comosa* subspecies *comosa* and *heldreichii* (Poaceae). *Plant Syst Evol.* 1996; 202: 199–210.

283. Friebe B, Jiang J, Raupp WJ, McIntosh RA, Gill BS. Characterization of wheat alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. *Euphytica.* 1996;91:59-87.

284. Friebe B, Larter EN. Identification of a complete set of isogenic wheat/rye D-genome substitution lines by means of Giemsa C-banding. *Theor Appl Genet.* 1988;76:473-9.

285. Friebe B, Mukai Y, Dhaliwal H, Martin TJ, Gill BS. Identification of alien chromatin specifying resistance to wheat streak mosaic virus and greenbug in wheat germ plasm by C-banding and in situ hybridization. *Theor Appl Genet.* 1991;81:381-9.

286. Friebe B, Qi LL, Nasuda A, Zhang P, Tuleen NA, Gill BS. Development of a complete set of *Triticum aestivum*–*Aegilops speltoides* chromosome addition lines. *Theor Appl Genet.* 2000;101:51-8.

287. Friebe B, Schubert V, Bluthner WD, Hammer K. C-banding pattern and polymorphism of *Aegilops caudata* and chromosomal constitutions of the amphiploid *T. aestivum* – *Ae. caudata* and six derived chromosome addition lines. *Theor Appl Genet.* 1992;83:589-96.

288. Friebe B, Tuleen N, Jiang J, Gill BS. Standard karyotype of *Triticum longissimum* and its cytogenetic relationship with *T. aestivum*. *Genome.* 1993;36:731-42.

289. Friebe B, Tuleen NA, Badaeva ED, Gill BS. Cytogenetic identification of *Triticum peregrinum* chromosomes added to common wheat. *Genome.* 1996;39:272-6.

290. Friebe B, Tuleen NA, Gill BS. Development and identification of a complete set of *Triticum aestivum*–*Aegilops geniculata* chromosome addition lines. *Genome.* 1999;42:374-80.

291. Friebe B, Tuleen NA, Gill BS. Standard karyotype of *Triticum searsii* and its relationship with other S-genome species and common wheat. *Theor Appl Genet.* 1995;91:248-54.

292. Friebe B, Zeller FJ, Mukai Y, Forster BP, Bartos P, McIntosh RA. Characterization of wheat-*Agropyron intermedium* derivatives carrying resistance against leaf, stripe and stem rust by C-banding, *in situ* hybridization and isozyme analysis. *Theor Appl Genet.* 1992;83:775-82.

293. Friebe B, Zhang P, Linc G, Gill BS. Robertsonian translocations in wheat arise by centric misdivision of univalents at anaphase I and rejoining of broken centromeres during interkinesis of meiosis II. *Cytogen Genome Res.* 2005;109:293-7.

294. Friesen TL, Xu SS, Harris MO. Stem rust, tan spot, *Stagonospora nodorum* blotch, and hessian fly resistance in Langdon durum- *Aegilops tauschii* synthetic hexaploid wheat lines. *Crop Sci.* 2008;48:1062-70.

295. Fu S, Sun C, Yang M, Fei Y, Tan F, et al. Genetic and epigenetic variations induced by wheat-rye 2R and 5R monosomic addition lines. *PLoS One.* 2013; 8(1): e54057.

296. Fu Sh, Tang Z, Ren Z. Inter- and intra-genomic transfer of small chromosomal segments in wheat-rye allopolyploids. *J Plant Res.* 2010; 123:97-103.
297. Fu SL, Lv ZL, Qi B, Guo X, Li J, Liu B, et al. Molecular cytogenetic characterization of wheat-*Thinopyrum elongatum* addition, substitution and translocation lines with a novel source of resistance to wheat *Fusarium* head blight. *J Genet Genomics.* 2012;39:103-10.
298. Fu Y, Xiao M, Yu H, Mason AS, Yin J, Li J, et al. Small RNA changes in synthetic *Brassica napus*. *Planta.* 2016;244(3):607-22.
299. Gaeta RT, Pires JC. Homoeologous recombination in allopolyploids: The polyploid ratchet. *New Phytologist.* 2010;186:18-28.
300. Gaeta RT, Pires JCh, Iniguez F, Leon E, Osborn TC. Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype. *Plant Cell.* 2002;19:3403-17.
301. Gaeta RT, Yoo S-Y, Pires JC, Doerge RW, Chen ZJ, Osborn TC. Analysis of gene expression in resynthesized *Brassica napus* allopolyploids using *Arabidopsis* 70mer oligo microarrays. *PLoS One.* 2009;4(3):e4760.
302. Gale MD, Miller TE. The introduction of alien genetic variation into wheat. In: Lupton FGH, editor. *Wheat breeding, its scientific basis.* London: Chapman and Hall; 1987, p. 173-210.
303. Ganley ARD, Kobayashi T. Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: Total rDNA repeat variation revealed by wholegenome shotgun sequence data. *Genome Res.* 2007;17:184-91.
304. Gao S, Gu Y Q, Wu J. Rapid evolution and complex structural organization in genomic regions harboring multiple prolamin genes in the polyploid wheat genome. *Plant Mol Biol.* 2007;65:189-203.
305. Garg M, Tanaka H, Ishikawa N, Takata K, Yanaka M, Tsujimoto H. A novel pair of HMW glutenin subunits from *Aegilops searsii* improves quality of hexaploid wheat. *Cereal Chem.* 2009;86:26-32.
306. Gaut BS. Patterns of chromosomal duplication in maize and their implications for comparative maps of the grasses. *Genome Res.* 2001;11:55-66.

307. Gernand D, Rutten T, Varshney A, Rubtsova M, Prodanovic S, Bruss C, et al. Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation. *Plant Cell*. 2005;17:2431-8.

308. Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet*. 2009;10:94-108.

309. Gianibelli MC, Larroque OR, MacRitchie F, Wrigley CW. Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat endosperm proteins. *American Association of Cereal Chemists*. 2001;29:926-46.

310. Gill BS, Friebe BR, White FF. Alien introgressions represent a rich source of genes for crop improvement. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:7657-8.

311. Gill BS, Friebe, B, Raupp WJ, Wilson DL, Cox TS, Sears RG, et al. Wheat Genetic Resource Center: the first 25 years. *Adv Agron*. 2006;6:73-133.

312. Gill BS, Kimber G. The giemsa C-banded karyotype of rye. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1974;71:1247-49.

313. Gill BS, Raupp WJ. Direct gene transfers from *Aegilops squarrosa* L. to hexaploid wheat. *Crop Sci*. 1987;27:445-50.

314. Gill KS, Gill BS, Endo TR, Mukai Y. Fine mapping of *Ph1*, a chromosome pairing regulator gene in polyploid wheat. *Genetics*. 1993;134:1231-6.

315. Giorgi B. Origin, behaviour and utilization of a *Ph1* mutant of durum wheat, *Triticum turgidum* (L.) var. *durum*. In: Sakamoto S, editor. *Proceedings of the Sixth International Wheat Genetics Symposium; November 28-December 3 1983; Kyoto, Japan*. Plant Germ-Plasm Institute, Faculty of Agriculture, Kyoto University; Kyoto, Japan; 1983, p. 1033-40.

316. Giorgi D, Farina A, Grosso V, Gennaro A, Ceoloni C, Lucretti S. FISHIS: fluorescence *in situ* hybridization in suspension and chromosome flow sorting made easy. *PLoS One*. 2013;8:e57994.

317. Gold J, Hardner D, Towley-Smith F, Aung T, Procunier J. Development of a molecular marker for rust resistance genes *Sr39* and *Lr35* in wheat breeding

- lines. Electron J Biotechnol. 1999;2(1).
<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol2/issue1/full/1/>
318. Goncharov NP. Comparative-genetic analysis – a base for wheat taxonomy revision. Czech J Genet and Plant Breed. 2005; 41(special issue):52-55.
319. Gonzalgo ML, Jones PA. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). Nucleic Acids Res. 1997; 25(12):2529-31.
320. Goud JV, Sadananda AR. Two new awn promoter genes in bread wheat. Genetics. 1978;43:12-6.
321. Griffiths S, Sharp R, Foote TN, Bertin I, Wanous M, Reader S, et al. Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. Nature. 2006;439:749-52.
322. Groszmann M, Greaves IK, Albertyn ZI, Scofield GN, Peacock WJ, Dennis ES, et al. Changes in 24-nt siRNA levels in *Arabidopsis* hybrids suggest an epigenetic contribution to hybrid vigor. Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108:2617-22.
323. Grover A, Sharma PC. Is spatial occurrence of microsatellites in the genome a determinant of their function and dynamics contributing to genome evolution? Curr Sci. 2011;100:859-69.
324. Grover CE, Gallagher JP, Szadkowski EP, Yoo MJ, Flagel LE, Wendel JF. Homoeolog expression bias and expression level dominance in allopolyploids. New Phytol. 2012;196(4):966-71.
325. Grover CE, Kim H, Wing RA, Paterson AH, Wendel JF. Microcolinearity and genome evolution in the *AdhA* region of diploid and polyploid cotton (*Gossypium*). Plant J. 2007;50:995-1006.
326. Gu YQ, Coleman-Derr D, Kong X, Anderson OD. Rapid genome evolution revealed by comparative sequence analysis of orthologous regions from four Triticeae genomes. Plant Physiol. 2002;135:459-70.
327. Gu YQ, Crossman C, Kong X, Luo M, You FM, Coleman-Derr D, et al. Genomic organization of the complex α -gliadin gene loci in wheat. Theor Appl Genet. 2004; 109:648-57.

328. Guermonprez H, Henaff E, Cifuentes M, Casacuberta JM. MITEs, miniature elements with a major role in plant genome evolution. In: Grandbastien MA, Casacuberta JM, editors. *Plant Transposable Elements: Impact on Genome Structure and Function*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2012, p.113-24.

329 Guo X, Han F. Asymmetric epigenetic modification and elimination of rDNA sequences by polyploidization in wheat. *Plant Cell*. 2014; DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.114.129841>.

330. Guo, M., M. A. Rupe, C. Zinselmeier, Habben J, Bowen BA, Smith OS. Allelic variation of gene expression in maize hybrids. *Plant Cell*. 2004;16:1707-16.

331. Gupta RB, Shepherd KW. Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutenin. 1. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid wheats. *Theor Appl Genet*. 1990;80:65-74.

332. Gupta SK, Charpe A, Koul S, Prabhu KV, Haq QMR. Development and validation of molecular markers linked to an *Aegilops umbellulata*-derived leaf-rust-resistance gene, *Lr9*, for marker-assisted selection in bread wheat. *Genome*. 2005;48:823-30.

333. Gustafson JP, Lukaszewski AJ, Bennett MD. Somatic deletion and redistribution of telomeric heterochromatin in the genus *Secale* and in *Triticale*. *Chromosoma*. 1983;88:293-8.

334. Ha M, Lu J, Tian L, Ramachandran V, Kasschau KD, Chapman IJ, et al. Small RNAs serve as a genetic buffer against genomic shock in *Arabidopsis* interspecific hybrids and allopolyploids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:17835-40.

335. Han F, Fedak G, Guo W, Liu B. Rapid and repeatable elimination of a parental genome-specific DNA repeat (pGc1R-1a) in newly synthesized wheat allopolyploids. *Genetics*. 2005;170:1239-45.

336. Han F, Liu B, Fedak G, Liu Zh. Genomic constitution and variation in five partial amphiploids of wheat–*Thinopyrum intermedium* as revealed by GISH, multicolor GISH and seed storage protein analysis. *Theor Appl Genet*. 2004;109:1070-6.

337. Han FP, Fedak G, Ouellet T, Liu B. Rapid genomic changes in interspecific and intergeneric hybrids and allopolyploids of Triticeae. *Genome*. 2003;46:716-23.
338. Han FP, He MY, Bu XL, Huang BQ, Hao S, Ma YZ, et al. Characterization of a wheat-wheatgrass translocation line by FISH. *Acta Bot Sin*. 1998;40:500-2.
339. Han H, Bai L, Su J, Zhang J, Song L, Gao A, et al. Genetic rearrangements of six wheat-*Agropyron cristatum* 6P addition lines revealed by molecular markers. *PLoS One*. 2014;9:e91066. doi:10.1371/journal.pone.0091066.
340. Han HM, Liu WH, Lu YQ, Zhang JP, Yang XM, Li XQ, et al. Isolation and application of P genome-specific DNA sequences of *Agropyron Gaertn.* in Triticeae. *Planta*. 2016;245(2):425-37.
341. Hao M, Li A, Shi T, Luo J, Zhang L, Zhang X, et al. The abundance of homoeologue transcripts is disrupted by hybridization and is partially restored by genome doubling in synthetic hexaploid wheat. *BMC Genomics*. 2017;18:149. DOI 10.1186/s12864-017-3558-0.
342. Hart GE, Islam AKMR, Shepherd KW. Use of isozymes as chromosome markers in the isolation and characterization of wheat-barley chromosome addition lines. *Genet Res Camb*. 1980;36:311-25.
343. Hart GE, Langston PJ. Chromosomal location and evolution of isozyme structural genes in hexaploid wheat. *Heredity*. 1977;39(2):263-77.
344. Hart GE. Genome analysis in Triticeae using isozymes. In: Juahar PP, editor. *Methods of genome analysis in plant*. Boca Raton (FL): CRC Press; 1996, p. 195-209.
345. Hayashi K, Yoshida H. Refunctionalization of the ancient rice blast disease resistance gene *Pit* by the recruitment of a retrotransposon as a promoter. *Plant J*. 2009;57:413-25.
346. He F, Zhang X, Hu J, Turck F, Dong X, Goebel U, et al. Genome-wide analysis of cis-regulatory divergence between species in the *Arabidopsis* genus. *Mol Biol Evol*. 2012;29:3385-95.

347. He G, Zhu X, Elling AA, Chen L, Wang X, Guo L, et al. Global epigenetic and transcriptional trends among two rice subspecies and their reciprocal hybrids. *Plant Cell*. 2010;22(1):17-33.

348. He P, Friebe BR, Gill BS, Zhou JM. Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat. *Plant Mol Biol*. 2003;52:401-14.

349. He R, Chang Z, Yang Z, Yuan Z, Zhan H, Zhang X, et al. Inheritance and mapping of powdery mildew resistance gene *Pm43* introgressed from *Thinopyrum intermedium* into wheat. *Theor Appl Genet*. 2009;118:1173-80.

350. Hegarty MJ, Barker GL, Wilson ID, Abbott RJ, Edwards KJ, Hiscock SJ. Transcriptome shock after interspecific hybridization in *Senecio* is ameliorated by genome duplication. *Curr Biol*. 2006;16:1652-9.

351. Hegarty MJ, Hiscock SJ. Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. *Curr Biol*. 2008;18:R435-44.

352. Hegarty MJ, Jones JM, Wilson ID, Barker GL, Coghill JA, Sanchez-Baracaldo P, et al. Development of anonymous cDNA microarrays to study changes to the *Senecio* floral transcriptome during hybrid speciation. *Mol Ecol*. 2005;14:2493-510.

353. Heller H, Kammer C, Wilgenbus P, Doerfler W. The chromosomal insertion of foreign (adenovirus type 12, plasmid of bacteriophage) DNA is associated with enhanced methylation of cellular DNA segments. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:5515-19.

354. Herpen T, Goryunova S, Schoot J, Mitreva M, Salentijn E, Vorst O, et al. Alpha-gliadin genes from the A, B, and D genomes of wheat contain different sets of celiac disease epitopes. *BMC Genomics*. 2006;7:1471-84.

355. Higgins ET, Franks B, Pavarini D, Sehnert S, Manely K. Expressed likelihood as motivator: creating value through engaging what's real. *J Econ Psychol*. 2013;38:4-15.

356. Holeski LM, Jander G, Agrawal AA. Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance in plants. *Trends Ecol Evol*. 2012;27:618-26.

357. Hollister JD, Gaut BS. Epigenetic silencing of transposable elements: a trade-off between reduced transposition and deleterious effects on neighboring gene expression. *Genome Res.* 2009;19:1419-28.

358. Hollister JD, Smith LM, Guo YL, Ott F, Weigel D, Gaut BS. Transposable elements and small RNAs contribute to gene expression divergence between *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis lyrata*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(6):2322-7.

359. Hsam SLK, Huang XQ, Ernst F, Hartl L, Zeller FJ. Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). 5. Alleles at the *Pm1* locus. *Theor Appl Genet.* 1998;96:1129-34.

360. Hsam SLK, Huang XQ, Zeller FJ. Chromosome location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.) 6. Alleles at the *Pm5* locus. *Theor Appl Genet.* 2001;102:127-33.

361. Hsieh TF, Ibarra CA, Silva P, Zemach A, Eshed-Williams L, Fischer RL, et al. Genome-wide demethylation of *Arabidopsis* endosperm. *Science.* 2009;324:1451-4.

362. http://www.physics.csbsju.edu/stats/exact_NROW_NCOLUMN_form.htm
1

363. Hu G, Houston NL, Pathak D, Schmidt L, Thelen JJ, Wendel JF. Genomically biased accumulation of seed storage proteins in allopolyploid cotton. *Genetics.* 2011;189:1103-15.

364. Hu LJ, Li GR, Zeng ZX, Chang ZJ, Liu C, Zhou JP, et al. Molecular cytogenetic identification of a new wheat-*Thinopyrum* substitution line with stripe rust resistance. *Euphytica.* 2011;177:169-77.

365. Huang L, Gill BS. An RGA-like marker detects all known *Lr21* leaf rust resistance gene family members in *Aegilops tauschii* and wheat. *Theor Appl Genet.* 2001;103:1007-13.

366. Huang Q, Li X, Chen WQ, Xiang ZP, Zhong SF, Chang ZJ, et al. Genetic mapping of a putative *Thinopyrum intermedium*-derived stripe rust resistance gene on wheat chromosome 1B. *Theor Appl Genet.* 2014;127:843-53.

367. Huang X-Q, Röder SM. Molecular mapping of powdery mildew resistance genes in wheat: a review. *Euphytica*. 2004;137:203-23.
368. Huang XQ, Wang LX, Xu MX, Röder MS. Microsatellite mapping of the powdery mildew resistance gene *Pm5e* in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*. 2003;106:858-65.
369. Hudson ME, Lisch DR, Quail PH. The *FHY3* and *FAR1* genes encode transposase-related proteins involved in regulation of gene expression by the phytochrome A-signaling pathway. *Plant J*. 2003;34:453-71.
370. Hurni S, Brunner S, Stirnweis D, Herren G, Peditto D, McIntosh RA, et al. The powdery mildew resistance gene *Pm8* derived from rye is suppressed by its wheat ortholog *Pm3*. *Plant J*. 2014;79:904-13.
371. 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. Abstract book, 2012, 154-5.
372. 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”; Kyiv. Abstract book, 2011, p.88.
373. 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.
374. Iefimenko TS, Fedak YuG, Antonyuk MZ, Ternovska TK. Microsatellite analysis of homoeologous chromosome group 5 of introgressive wheat lines *Triticum aestivum* / *Amblyopyrum muticum*. *Cytol Genet*. 2015;49(3):183-91.
375. Iefimenko TS, Fedak YuG, Antonyuk MZ, Ternovska TK. Introgressive wheat lines *Triticum aestivum* / *Amblyopyrum muticum* as to structure of homoeologous group 5 chromosomes. Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наукових праць, т 14. Київ: Логос; 2014, с.52-82.

376. Iqbal N, Reader SM, Caligari PDS, Miller TE. Characterization of *Aegilops uniaristata* chromosomes by comparative DNA marker analysis and repetitive DNA sequence *in situ* hybridization. *Theor Appl Genet.* 2000;102:1173-9.
377. Ishii T, Karimi-Ashtiyani R, Houben A. Haploidization via chromosome elimination: means and mechanisms. *Annu Rev Plant Biol.* 2016;67:10.1-10.18.
378. Ishii T, Ueda T, Tanaka H, Tsujimoto H. Chromosome elimination by wide hybridization between Triticeae or oat plant and pearl millet: pearl millet chromosome dynamics in hybrid embryo cells. *Chromosome Res.* 2010;18:821-31.
379. Ishikawa G, Nakamura T, Ashida T, Saito M, Nasuda S, Endo TR, et al. Localization of anchor loci representing five hundred annotated rice genes to wheat chromosomes using PLUG markers. *Theor Appl Genet.* 2009;118:499-514.
380. Ishikawa G, Yonemaru J, Saito M, Nakamura T. PCR-based landmark unique gene (PLUG) markers effectively assign homoeologous wheat genes to A, B and D genomes. *BMC Genomics.* 2007;8:135.
381. Jaaska V. Electrophoretic survey of seedling esterases in wheats in relation to their phylogeny. *Theor Appl Genet.* 1980;56(6): 273-84.
382. Jackson S, Chen ZJ. Genomic and expression plasticity of polyploidy. *Curr Opin Plant Biol.* 2010; 13:153-9.
383. Jakobson I, Reis D, Tiidema A, Peusha H, Timofejeva L, Valárik M, et al. Fine mapping, phenotypic characterization and validation of nonrace-specific resistance to powdery mildew in a wheat– *Triticum militinae* introgression line. *Theor Appl Genet.* 2012;125:609-23.
384. Järve K, Peusha HO, Tsymbalova J, Tamm S, Devos KM, Enno TM. Chromosomal location of a *Triticum timopheevii*-derived powdery mildew resistance gene transferred to common wheat. *Genome.* 2013;43:377-81.
385. Jauhar PP, Peterson TS, Xu SS. Cytogenetic and molecular characterization of a durum alien disomic addition line with enhanced tolerance to *Fusarium* head blight. *Genome.* 2009;52:467-83.
386. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001;293:1074-80.

387. Jia J, Devos KM, Chao S, Miller TE, Reader SM, Gale MD. RFLP-based maps of homoeologous group-6 chromosomes of wheat and their application in the tagging of *Pm12*, a powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops speltoides* to wheat. *Theor Appl Genet*. 1996;92:559-65.

388. Jia J, Zhou R, Li P, Zhao M, Dong Y. Identifying the alien chromosomes in wheat-*Leymus multicaulis* derivatives using GISH and RFLP techniques. *Euphytica*. 2002;127:201-7.

389. Jiang B, Lou Q, Wu Z, Zhang W, Wang D, Mbira KG, et al. Retrotransposon- and microsatellite sequence- associated genomic changes in early generations of a newly synthesized allotetraploid *Cucumis* × *hytivus* Chen & Kirkbride. *Plant Mol Biol*. 2011;77:225-33.

390. Jiang J, Friebe B, Gill BS Recent advances in alien gene transfer in wheat. *Euphytica*. 1994;73:199-212.

391. Jiang J, Gill BS. A 'zebra' chromosome arising from multiple translocations involving non-homologous chromosomes. *Chromosoma*. 1993;102:612-7.

392. Jiang N, Bao ZR, Zhang XY, Eddy SR, Wessler SR. Pack-MULE transposable elements mediate gene evolution in plants. *Nature*. 2004;431:569-73.

393. Jiang Q-T, Zhao Q-Zh, Yang Q, Ma J, Zhang X-W, Wang Ch-Sh, et al. Amphidiploids between tetraploid wheat and *Aegilops sharonensis* Eig exhibit variations in high-molecular-weight glutenin subunits *Genet Resour Crop Evol*. 2014;61:299-305.

394. Jiang SM, Yin WB, Hu J, Shi R, Zhou RN, Chen YH, et al. Isolation of expressed sequences from a specific chromosome of *Thinopyrum intermedium* infected by BYDV. *Genome*. 2009;52:68-76.

395. Jiang SM, Zhang L, Hu J, Shi R, Zhou GH, Chen YH, et al. Screening and analysis of differentially expressed genes from an alien addition line of wheat-*Thinopyrum intermedium* induced by barley yellow dwarf virus infection. *Genome*. 2004;47:1114-21.

396. Jiang YR, He MD, Ding MQ, Rong JK. Chromosome elimination of hexaploid common wheat mediated by interaction between Chinese Spring cytoplasm and a genetic factor(s) on chromosome arm 1BL of wild emmer. *Euphytica*. 2016; 209(3):615-25.
397. Jing Zhang, Jinpeng Zhang, Weihua Liu, Xiaoyang Wu, Xinming Yang, Xiuquan Li, et al. An intercalary translocation from *Agropyron cristatum* 6P chromosome into common wheat confers enhanced kernel number per spike. *Planta*. 2016; 244(4):853-64.
398. Joppa LR, Williams ND . Registration of Largo, a greenbug resistant hexaploid wheat. *Crop Sci*. 1982; 2:901-2.
399. Joppa LR, Williams ND. Langdon durum disomic substitution lines and aneuploidy analysis in tetraploid wheat. *Genome*. 1988;30:222-8.
400. Josefsson C, Dilkes B, Comai L. Parent-dependent loss of gene silencing during interspecies hybridization. *Curr Biol*. 2006;16:1322-8.
401. Kajihara D, de Godoy F, Hamaji TA, Blanco SR, Van Sluys MA, Rossi M. Functional characterization of sugarcane mustang domesticated transposases and comparative diversity in sugarcane, rice, maize and sorghum. *Genet Mol Biol*. 2012;35:632-9.
402. Kalendar R, Schulman A. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nat Prot*. 2006;1:2478-84.
403. Kang H, Wang Y, Fedak G, Cao W, Zhang H, Xing Fan, et al. Introgression of chromosome 3Ns from *Psathyrostachys huashanica* into wheat specifying resistance to stripe rust. *PLoS One*. 2011;6(7):e21802.
404. Kang HY, Chen Q, Wang Y, Zhong MY, Zhang HQ, Zhou YH. Molecular cytogenetic characterization of the amphiploid between bread wheat and *Psathyrostachys huashanica* *Genet Resour Crop Evol*. 2010;57:111-8.
405. Kang HY, Zhang HQ, Wang Y, Jiang Y, Yuan HJ, Zhou YH. Comparative analysis of the homoeologous pairing effects of phKL gene in common wheat x *Psathyrostachys huashanica* Keng ex Kuo. *Cereal Res Commun*. 2008;36:429-40.

406. Kang HY, Zhang ZHJ, Xu LL, Qi WL, Tang Y, Wang H, et al. Characterization of wheat-*Psathyrostachys huashanica* small segment translocation line with enhanced kernels per spike and stripe rust resistance. *Genome*. 2016;59(4):221-9.
407. Kashkush K, Feldman M, Levy AA. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics*. 2002;160(4):1651-9.
408. Kashkush K, Feldman M, Levy AA. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nat Genet*. 2003;33:102-6.
409. Kazi A.G, Rasheed A , Mujeeb-Kazi A. Biotic Stress and Crop Improvement: A wheat focus around novel strategies. In: Hakeem KR, Ahmad P, Ozturk M, editors. *Crop Improvement*. Springer Science+Business Media, LLC; 2013, p. 239-67.
410. Kellogg EA. What happens to genes in duplicated genomes? *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:4369-71.
411. Kenan-Eichler M, Leshkowitz D, Tal L, Noor E, Melamed-Bessudo C, Feldman M, et al. Wheat hybridization and polyploidization results in deregulation of small RNAs. *Genetics*. 2011;188:263-72.
412. Kerber ER, Aung T. Leaf rust resistance gene *Lr34* associated with nonsuppression of stem rust resistance in the wheat cultivar Canthatch. *Phytopathology*. 1999;89:518-21.
413. Kerber ER, Dyck PL. Inheritance in hexaploid wheat of leaf rust resistance and other characters derived from *Aegilops squarrosa*. *Can J Genet Cytol*. 1969;11:639-40.
414. Kerber ER, Dyck PL. Inheritance of stem rust resistance transferred from diploid wheat (*Triticum monococcum*) to tetraploid and hexaploid wheat and chromosome location of the gene involved. *Can J Genet Cytol*. 1973;15:397-409.
415. Kerber ER, Dyck PL. Resistance to stem rust and leaf rust of wheat in *Aegilops squarrosa* and transfer of a gene for stem rust resistance to hexaploid wheat. In: Ramanujam S, editor. *Proceedings of the fifth international wheat genetics*

symposium; February 23-28, 1978; Indian Agricultural Research Institute, Indian Society of Genetics & Plant Breeding, New Delhi, India. New Delhi: Indian Society of Genetics and Plant Breeding, Indian Agricultural Research Institute; 1979, p. 358-64.

416. Kerber ER, Dyck PL. Transfer to hexaploid wheat of linked genes for adult plant leaf rust and seedling stem rust resistance from an amphiploid of *Aegilops speltoides* x *Triticum monococcum*. *Genome*. 1990;33:530-7.

417. Kerber ER, Rowland GG. Origin of the free threshing character in hexaploid wheat. *Can J Genet Cytol*. 1974;16(1):145-54.

418. Kerber ER. Resistance to leaf rust in wheat: *Lr32*, a third gene derived from *Triticum tauschii*. *Crop Science*. 1987;27:204-6.

419. Khan IA. Molecular and agronomic characterization of wheat-*Agropyron intermedium* recombinant chromosomes. *Plant Breeding*. 2000;119:25-9.

420. Khlestkina EK, Pshenichnikova TA, Röder MS, Salina EA, Arbuzova VS, Börner A. Comparative mapping of genes for glume colouration and pubescence in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Gen*. 2006;113:801-7.

421. Khlestkina EK, Röder MS, Börner A. Mapping genes controlling anthocyanin pigmentation on the glume and pericarp in tetraploid wheat (*Triticum durum* L.). *Euphytica*. 2010;171:65-9.

422. Khlestkina EK, Salina EA, Pshenichnikova TA, Roder MS, Borner A. Glume coloration in wheat: allelism test, consensus mapping and its association with specific microsatellite allele. *Cereal Research Communications*. 2009;37(1):37-43.

423. Kihara H. Wheat studies. Retrospect and prospects. Tokyo: Kodansha LTD, Amsterdam-Oxford-New York; 1982. 308 p.

424. Kim W, Johnson JW, Baenziger PS, Lukaszewski AJ, Gaines SC. Agronomic effect of wheat-rye translocation carrying rye chromatin (1R) from different sources. *Crop Sci*. 2004;44:1254-8.

425. Kimber G. The addition of the chromosomes of *Aegilops umbellulata* to *Triticum aestivum* var. Chinese Spring. *Genet Res (Camb)*. 1967;9:111-4.

426. King IP, Miller TE, Koebner RMD. Determination of the transmission frequency of chromosome 4Sl of *Aegilops sharonensis* in a range of wheat genetic backgrounds. *Theor Appl Genet.* 1991;81(4):519-23.

427. Kishii M, Yamada T, Sasakuma T, Tsujimoto H. Production of wheat–*Leymus racemosus* chromosome addition lines. *Theor Appl Genet.* 2004;109:255–60.

428. Knott DR, Anderson RG. The inheritance of rust resistance I. The inheritance of stem rust resistance in ten varieties of common wheat. *Can J Agri Sci.* 1956;36:174-95.

429. Knott DR. Anomalous segregations at the *Sr6* locus for stem rust resistance in wheat. *Theor Appl Genet.* 2001;103:171-7.

430. Knott DR. The effect on wheat of an *Agropyron* chromosome carrying rust resistance. *Can J Genet Cytol.* 1964;6:500-7.

431. Koebner RMD, Shepherd KW. Induction of recombination between rye chromosome 1RL and wheat chromosomes. *Theor Appl Genet.* 1985;71:208-15.

432. Koh J, Soltis PS, Soltis DE. Homeolog loss and expression changes in natural populations of the recently and repeatedly formed allotetraploid *Tragopogon mirus* (Asteraceae). *BMC Genomics.* 2010;11:97. doi: 10.1186/1471-2164-11-97.

433. Koh J, Zhu N, Chen S, Soltis DE. Comparative proteomics of the recently and recurrently formed natural allopolyploid *Tragopogon mirus* (Asteraceae) and its parents. *New Phytologist.* 2012;196:292-305.

434. Kolmer JA, Anderson JA, Flor JM. Chromosome location, linkage with simple sequence repeat markers and leaf rust resistance conditioned by gene Lr63 in wheat. *Crop Sci.* 2010;50:2392-5.

435. Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Prot.* 2008;3:1452-56.

436. Korzun V, Malyshev S, Pickering, RA. RFLP mapping of gene for hairy leaf sheath using a recombinant line from *Hordeum vulgare* L. x *Hordeum bulbosum* L. cross. *Genome.* 1999;42:960-63.

437. Korzun V, Melz G, Borner A. RFLP mapping of the dwarfing (*Ddw 1*) and hairy peduncle (*Hp*) genes on chromosome 5 of rye (*Secale cereale* L). *Theor Appl Genet.* 1997;92:1073-77.
438. Kosambi DD. The estimation of map distance from recombination values. *Annu Eugenics.* 1944;12:172-75.
439. Kouzarides K. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007;128:693-705.
440. Kovarik A, Dadejova M, Lim YK, Chase MW, Clarkson JJ, Knapp S. Evolution of rDNA in *Nicotiana* allopolyploids: a potential link between rDNA homogenization and epigenetics. *Ann Bot.* 2008;101:815-23.
441. Kovarik A, Matyasek R, Lim KY, Skalicka K, Koukalova B, Knapp S, et al. Concerted evolution of 18-5.8-26S rDNA repeats in *Nicotiana* allotetraploids. *Biol J Linn Soc.* 2004;82:615-25.
442. Kraitshtein Z, Yaakov B, Khasdan V, Kashkush K. Genetic and epigenetic dynamics of a retrotransposon after allopolyploidization of wheat. *Genetics.* 2010;186:801-12.
443. Kristin A, Hile S, Hile E. Every microsatellite is different: intrinsic DNA features dictate mutagenesis of common microsatellites present in the human genome. *Mol. Carcinog.* 2009;48: 379-88.
444. Książczyk T, Kovarik A, Eber F, Huteau V, Khaitova L, Tesarikova Z, et al. Immediate unidirectional epigenetic reprogramming of NORs occurs independently of rDNA rearrangements in synthetic and natural forms of a polyploid species *Brassica napus*. *Chromosoma.* 2011; 120(6):557-71.
445. Kumar A, Bennetzen JL. Plant retrotransposons. *Annu Rev Gen.* 1999;33:479-532.
446. Kumar A, Garg M, Kaur N, Chunduri V, Sharma S, Misser S, et al. Rapid development and characterization of chromosome specific translocation line of *Thinopyrum elongatum* with improved dough strength. *Front Plant Sci.* 2017;8:1593. doi: 10.3389/fpls.2017.01593.

447. Kumar J, Sivasamy M, Nisha R. Performance of brown and black rust resistance genes in some wheat cultivars of central, peninsular, and south India. *Ann Wheat Newsl.* 2010;56:80-2.

448. Kuraparthy V, Chhuneja P, Dhaliwal HS, Kaur S, Bowden RL, Gill BS. Characterization and mapping of cryptic alien introgressions from *Aegilops geniculata* with new leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr57* and *Yr40* in wheat. *Theor Appl Genet.* 2007;114:1379-89.

449. Kuraparthy V, Sood S, Chhuneja P, Dhaliwal HS, Kaur S, Bowden RL, et al. A cryptic wheat-*Aegilops triuncialis* translocation with leaf rust resistance gene *Lr58*. *Crop Sci.* 2003;47:1995-2003.

450. Kuraparthy V, Sood S, Gill BS. Molecular genetic description of the cryptic wheat-*Aegilops geniculata* introgression carrying rust resistance genes *Lr57* and *Yr40* using wheat ESTs and synteny with rice. *Genome.* 2009;52:1025-36.

451. Kynast RG, Friebe B, Gill BS. Fate of multicentric and ring chromosomes induced by a new gametocidal factor located on chromosome 4Mg of *Aegilops geniculata*. *Chrom Res.* 2000;8:133-9.

452. Lackey E, Ng DWK, Chen ZJ. RNAi-mediated down-regulation of DCL1 and AGO1 induces developmental changes in resynthesized *Arabidopsis* allotetraploids. *New Phytol.* 2010;186:207-15.

453. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680-5.

454. Lai Z, Gross BL, Zou Y, Andrews J, Rieseberg LH. Microarray analysis reveals differential gene expression in hybrid sunflower species. *Mol Ecol.* 2006;15:1213-27.

455. Lammer DL, Cai X, Arterburn M, Chatelain J, Murray TD, Jones SS. A single chromosome addition from *Thinopyrum elongatum* confers a polycarpic, perennial habit to annual wheat. *J Exp Bot.* 2004;55:1715-20.

456. Lapitan NLV, Peng J, Sharma V. A high-density map and PCR markers for Russian wheat aphid resistance gene *Dn7* on chromosome 1RS/1BL. *Crop Sci.* 2007;47:811-20.

457. Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 2010;11:204-20.
458. Lawrence RJ, Earley K, Pontes O, Silva M, Chen ZJ, Neves N, et al. A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol Cell*. 2004;13:599-609.
459. Lazar MD, Worrall WD, Porter KB, Tuleen NA. Registration of eight closely related germplasm lines differing in biotype E greenbug resistance. *Crop Sci*. 1996;36:1419-24.
460. Le TN, Miyazaki Y, Takuno Sh Saze H. Epigenetic regulation of intragenic transposable elements impacts gene transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*. 2015. doi: 10.1093/nar/gkv258.
461. Lei M-P, Li G-R, Zhou L, Li C-H, Liu C, Yang Z-J. Identification of wheat-*Secale africanum* chromosome 2Rafr introgression lines with novel disease resistance and agronomic characteristics. *Euphytica*. 2013;194:197-205.
462. Leigh F, Kalendar R, Lea V, Lee D, Donini P, Schulman AH. Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques. *Mol Gen Genomics*. 2003;269:464-74.
463. Leitch AR, Leitch IJ. Perspective genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science*. 2008;320:481-3.
464. Leitch IJ, Bennett MD. Genome downsizing in polyploid plants. *Biol J Linn Soc*. 2004; 82:651-63.
465. Levy AA, Feldman M. Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization. *Biol J Linn Soc*. 2004; 82: 607-13.
466. Levy AA, Feldman M. The impact of polyploidy on grass genome evolution. *Plant Physiology*. 2002;130:1587-93.
467. Li G, Gao D, La Sh, Wang H, Li J, He W, et al. Characterization of wheat-*Secale africanum* chromosome 5Ra derivatives carrying *Secale* specific genes for grain hardness. *Planta*. 2016; 243(5):1203-12.
468. Li G, Gao D, Zhang H, Li J, Wang H, La S, et al. Molecular cytogenetic characterization of *Dasyphyrum breviaristatum* chromosomes in wheat background

revealing the genomic divergence between *Dasypyrum* species. *Mol Cytogenet.* 2016; 9:6. DOI 10.1186/s13039-016-0217-0.

469. Li G, Zhang T, Ban Y, Yang Z. Molecular characterization and evolutionary analysis of α -gliadin genes from *Eremopyrum bonaepartis* (Triticeae) // *J Agric Sci.* 2010;4:975-84.

470. Li GQ, Li ZF, Yang WY, Zhang Y, He ZH, Xu SC, et al. Molecular mapping of stripe rust resistance gene *YrCH42* in Chinese wheat cultivar Chuanmai 42 and its allelism with *Yr24* and *Yr26*. *Theor Appl Genet.* 2006;112:1434-40.

471. Li GR, Wang HJ, Lang T, Li JB, La SX, Yang EN, et al. New molecular markers and cytogenetic probes enable chromosome identification of wheat-*Thinopyrum intermedium*. *Planta.* 2016;44:865-76.

472. Li H, Jiang B, Wang J, Lu Y, Zhang J, Pan C, et al. Mapping of novel powdery mildew resistance gene(s) from *Agropyron cristatum* chromosome 2P. *Theor Appl Genet.* 2017;130(1):109-21.

473. Li H, Lv M, Song L, Zhang J, Gao A, Li L, et al. Production and identification of wheat-*Agropyron cristatum* 2P translocation lines PLoS ONE. 2016;11(1):e0145928.

474. Li HJ, Arterburn M, Jones SS, Murray TD. Resistance to eyespot of wheat, caused by *Tapesia yallundae*, derived from *Thinopyrum intermedium* homoeologous group 4 chromosome. *Theor Appl Genet.* 2005;111:932-40.

475. Li HJ, Chen Q, Conner RL, Guo B, Zhang Y, Graf RJ, et al. Molecular characterization of a wheat – *Thinopyrum ponticum* partial amphiploid and its derivatives for resistance to leaf rust. *Genome.* 2003;46:906-13.

476. Li J, Endo TR, Saito M, Ishikawa G, Nakamura T, Nasuda Sh. Homoeologous relationship of rye chromosome arms as detected with wheat PLUG markers. *Chromosoma.* 2013;122(6):555-64.

477. Li J, Wan H-Sh, Yang W-W. Synthetic hexaploid wheat enhances variation and adaptive evolution of bread wheat in breeding processes. *J Syst Evol.* 2014;52(6):735-42.

478. Li L, Yang X, Zhou R, Li X, Dong Y. Establishment of wheat-*Agropyron cristatum* alien addition lines. II. Identification of alien chromosomes and analysis of development approaches. *Acta Genet Sinica*. 1998;25(6):538-44.
479. Li LF, Liu B, Olsen KM, Wendel JF. Multiple rounds of ancient and recent hybridizations have occurred within the *Aegilops-Triticum* complex. *New Phytologist*. 2015;208:11-12.
- 480 Li Q, Chao K, Li Q, Zhang Y, Jing J, Wang B, et al. Genetic analysis and molecular mapping of a stripe rust resistance gene in wheat-*Leymus mollis* translocation line M8926-2 *Crop Protection*. 2016;86:17-23.
481. Li QF, Lu YQ, Pan CL, Zhang JP, Liu WH, Yang XM, et al. Characterization of a novel wheat-*Agropyron cristatum* 2P disomic addition line with powdery mildew resistance. *Crop Sci*. 2016; 56:2390-400
482. Li SJ, Lin ZS, Liu C, Wang K, Du LP, Ye XG. Development and comparative genomic mapping of *Dasyphyrum villosum* 6V#4S specific PCR markers using transcriptome data. *Theor Appl Genet*. 2017.doi:10.1007/s00122-017-2942-0.
483. Li W, Zhang P, Fellers JP, Friebe B, Gill BS. Sequence composition, organization, and evolution of the core Triticeae genome. *Plant J*. 2004;40:500-11.
484. Li WL, Nelson JC, Chu CY, Shi LH, Huang SH, Liu DJ. Chromosomal locations and genetic relationships of tiller and spike characters in wheat. *Euphytica*. 2002;125:357-66.
485. Li Y, Li CQ, Xia J, Jin YX. Domestication of transposable elements into microRNA genes in plants. *PLoS ONE*. 2011;6:e19212.
486. Li Zh, Defoort J, Tasdighian S, Maere S, Van de Peer Y, De Smet R. Gene duplicability of core genes is highly consistent across all angiosperms. *Plant Cell*. 2016;28:326-44.
487. Li Zh, Ren T, Yan B, Tan F, Yang M, Ren Zh. A mutant with expression deletion of gene *Sec-1* in a 1RS.1BL line and its effect on production quality of wheat. *PLoS ONE*. 2016;11(1):e0146943.
488. Li Zh, Ren Z, Tan F, Tang Z, Fu S, Yan B, et al. Molecular cytogenetic characterization of new wheat-rye 1R(1B) substitution and translocation lines from a

chinese *Secale cereale* L. Aigan with resistance to stripe rust. PLoS One. 2016;11(9): e0163642.

489. Liang Z, Chen K, Li T, Zhang Y, Wang Y, Zhao Q, et al. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nature Commun. 2017;8:14261. doi: 10.1038/ncomms14261

490. Lillemo M, Asalf B, Singh RP, Huerta-Espino J, Chen XM, He ZH, Bjørnstad Å. The adult plant rust resistance loci *Lr34/Yr18* and *Lr46/Yr29* are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line Saar. Theor Appl Genet. 2008; 116:1155-66.

491. Lim KY, Matyasek R, Kovarik A, Leitch AR. Genome evolution in allotetraploid *Nicotiana*. Biol J Linn Soc. 2004;82(4):599-606.

492. Lim KY, Soltis DE, Soltis PS, Tate J, Matyasek R, Srubarova N, et al. Rapid chromosome evolution in recently formed polyploids in *Tragopogon* (Asteraceae). PLoS One. 2008;3(10):C291e3353.

493. Lim KY, Souckova-Skalicka K, Sarasan V, Clarkson JJ, Chase MW, Kovarik A, et al. A genetic appraisal of a new synthetic *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) and the Kostoff synthetic tobacco. Amer J Bot. 2006;93:875-83.

494. Lin ZS, Cui ZF, Zeng XY, Ma YZ, Zhang ZY, Nakamura T, et al. Analysis of wheat-*Thinopyrum intermedium* derivatives with BYDV-resistance. Euphytica. 2007;158:109-18.

495. Lin ZS, Huang DH, Du LP, Ye XG, Xin ZY. Identification of wheat-*Thinopyrum intermedium* 2Ai-2 ditelosomic addition and substitution lines with resistance to barley yellow dwarf virus. Plant Breed. 2006;125:114-9.

496. Linc G, Sepsi A, Molnar-Lang M. A FISH karyotype to study chromosome polymorphisms for the *Elytrigia elongata* E genome. Cytogenet Genome Res. 2012;136:138-44.

497. Lindholm AK, Dier KA, Firman L, Fishman L, Forstmeier W, Holman L, et al. The ecology and evolutionary dynamics of meiotic drive. Trends Ecol. Evol. 2016;31(4):315-26.

498. Lippman Z, Gendrel AV, Black M, Vaughn MW, Dedhia N, McCombie WR, et al. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature*. 2004;430:471-6.
499. Lisch D. Epigenetic regulation of transposable elements in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2009;60:43-66.
500. Liu W, Danilova T, Rouse M, Bowden R, Friebe B, Gill BS, et al. Development and characterization of a compensating wheat-*Thinopyrum intermedium* Robertsonian translocation with *Sr44* resistance to stem rust (Ug99). *Theor Appl Genet*. 2013;126:1167-77.
501. Liu B, Brubaker CL, Mergeai G, Cronn RC, Wendel JF. Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes. *Genome*. 2001;44(3):321-30.
502. Liu B, Piao HM, Zhao FS, Zhao JH, Zhao R, Liu ZL. Production and molecular characterization of rice lines with introgressed traits from a wild species *Zizania latifolia* (Griseb.). *J Genet Breed*. 1999;53:279-84.
503. Liu B, Vega JM, Feldman M. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. II. Changes in low-copy coding DNA sequences. *Genome*. 1998;41:535-42.
504. Liu B, Vega JM, Segal G, Abbo S, Rodova M, Feldman M. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. I. Changes in low-copy noncoding DNA sequences. *Genome*. 1998;41(2):272-7.
505. Liu B, Wendel JF. Retrotransposon activation followed by rapid repression in introgressed rice plants. *Genome*. 2000;43:874-80.
506. Liu C, Li G, Yan H, Zhou J, Hu L, Lei M, et al. Molecular and cytogenetic identification of new wheat-*D. breviaristatum* additions conferring resistance to stem rust and powdery mildew. *Breed Sci*. 2011;61:366-72.
507. Liu J, Chang ZJ, Zhang XJ, Yang ZJ, Li X, Jia JQ, et al. Putative *Thinopyrum intermedium*-derived stripe rust resistance gene *Yr50* maps on wheat chromosome arm 4BL. *Theor Appl Genet*. 2013;126:265-74.

508. Liu J, He Y, Amasino R, Chen X. siRNAs targeting an intronic transposon in the regulation of natural flowering behavior in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 2004;18:2873-8.

509. Liu Sh, Li F, Kong L, Sun Y, Qin L, Chen S. Genetic and epigenetic changes in somatic hybrid introgression lines between wheat and tall wheatgrass. *Genetics.* 2015;199(4):1035-45.

510. Liu W, Koo D-H, Xia Q, Li Ch, Bai F, Song Y, et al. Homoeologous recombination-based transfer and molecular cytogenetic mapping of powdery mildew-resistant gene *Pm57* from *Aegilops searsii* into wheat. *Theor Appl Genet.* 2017;130(4): 841-8.

511. Liu W, Rouse M, Friebe B, Jin Y, Gill BS, Pumphrey MO. Discovery and molecular mapping of a new gene conferring resistance to stem rust, *Sr53*, derived from *Aegilops geniculata* and characterization of spontaneous translocation stocks with reduced alien chromatin. *Chromosome Res.* 2011;19:669-82.

512. Liu W-H, Luan Y, Wang J-C, Wang X-G, Su J-J, Zhang J-P, et al. Production and identification of wheat – *Agropyron cristatum* (1.4P) alien translocation lines. *Genome.* 2010;53:472-81.

513. Liu Z, Sun Q, Ni Z, Nevo E, Yang T. Molecular characterization of a novel powdery mildew resistance gene *Pm30* in wheat originating from wild emmer. *Euphytica.* 2002;123:21-9.

514. Liu Z, Wang Y, Shen Y, Guo W, Hao S, Liu B. Extensive alterations in DNA methylation and transcription in rice caused by introgression from *Zizania latifolia*. *Plant Mol Biol.* 2004;54:571-82.

515. Lockton S, Gaut BS. The contribution of transposable elements to expressed coding sequence in *Arabidopsis thaliana*. *J Mol Evol.* 2009;68:80-9.

516. Longin CF, Reif JC. Redesigning the exploitation of wheat genetic resources. *Trends Plant Sci.* 2014;19:631-6.

517. Lozano-Juste J, Cutler SR. Plant genome engineering in full bloom. *Trends Plant Sci.* 2014;19:284-7.

518. Lu M, Lu Y, Li H, Pan C, Guo Y, Zhang J, et al. Transferring desirable genes from *Agropyron cristatum* 7P chromosome into common wheat. PLoS ONE.2016; 11(7):e0159577.

519. Lu Y, Yao M, Zhang J, Song L, Liu W, Yang X, et al. Genetic analysis of a novel broad-spectrum powdery mildew resistance gene from the wheat-*Agropyron cristatum* introgression line Pubing 74. Planta. 2016;244(3):713-23.

520. Lu YQ, Wu XY, Yao MM, Zhang JP, Liu WH, Yang XM, et al. Genetic mapping of a putative *Agropyron cristatum*-derived powdery mildew resistance gene by a combination of bulked segregant analysis and single nucleotide polymorphism array. Mol Breed. 2015; 35:1-13.

521. Lukens LN, Pires JCh, Leon E, Vogelzang R, Oslach L, Osborn Th. Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids. Plant Physiol. 2006;140:336-48 .

522. Luan Y, Wang XG, Liu WH, Li CY, Zhang JP, Gao AN, et al. Production and identification of wheat-*Agropyron cristatum* 6P translocation lines. Planta. 2010;232:501-10.

523. Lukaszewski A. Introgressions between wheat and rye In: Molnár-Láng M, Ceoloni C, Doležel J, editors. Alien introgression in wheat. Cytogenetics, molecular biology, and genomics. New York (NY): Springer; 2015, p. 163-90.

524. Lukaszewski AJ, Gustafson JP. Translocations and modifications of chromosomes in triticale x wheat hybrids. Theor Appl Genet. 1983;64:239-48.

525. Lukaszewski AJ. A comparison of several approaches in the development of disomic alien addition lines of wheat. In: Miller TE, Koebner RMD, editors. Proceedings of the Seventh International Wheat Genetics Symposium; 13-19 July 1988; Cambridge, England. Institute of Plant Science Research; 1988, p. 363-67.

526. Lukaszewski AJ. Cytogenetically engineered rye chromosomes 1R to improve breadmaking quality of hexaploid triticale. Crop Sci. 2006;46:2183-94.

527. Lukaszewski AJ. Manipulation of the 1RS.1BL translocation in wheat by induced homoeologous recombination. Crop Sci.2000;40: 216-25.

528. Luo MC, Yang ZL, Kota RS, Dvorak J. Recombination of chromosomes 3Am and 5Am of *Triticum monococcum* with homoeologous chromosomes 3A and 5A of wheat: distribution of recombination across chromosomes. *Genetics*. 2000;154:1301-8.

529. Luo PG, Luo HY, Chang ZJ, Zhang HY, Zhang M, Ren ZL. Characterization and chromosomal location of *Pm40* in common wheat: a new gene for resistance to powdery mildew derived from *Elytrigia intermedium*. *Theor Appl Genet*. 2009;118:1059-64.

530. Lynch M, Covery JS. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*. 2000;290:1151-5 .

531. Lynch M, Forcet A. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics*. 2000;154:459-73.

532. Ma H, Singh RP, Mujeeb-Kazi A. Suppression/expression of resistance to stripe rust in synthetic hexaploid wheat (*Triticum turgidum* × *T tauschii*). *Euphytica*. 1995;2:87-93.

533. Ma J, Stiller J, Berkman PJ, Wei Y, Rogers J, Feuillet C, et al. Sequence-based analysis of translocations and inversions in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS One*. 2013;8(11): e79329.C1329.

534. Ma JX, Devos KV, Bennetzen JL. Analyses of LTR retrotransposon structures reveal recent and rapid genomic DNA loss in rice. *Genome Res*. 2004;14:860-9.

535. Ma P, Xu H, Han G, Luo Q, Xu Y, Zhang X. Characterization of a segregation distortion locus with powdery mildew resistance in a wheat-*Thinopyrum intermedium* introgression line WE99. *Plant Dis*. 2016; 100: 1541-7.

536. Ma XF, Gustafson JP. Allopolyploidization-accommodated genomic sequence changes in triticale. *Ann Bot (Lond)*. 2008;101(6):825-32.

537. Ma XF, Gustafson JP. Genome evolution of allopolyploids: a process of cytological and genetic diploidization. *Cytogenet Genome Res*. 2005;109(1-3):236-49.

538. Ma XF, Gustafson JP. Timing and rate of genome variation in triticale following allopolyploidization. *Genome*.2006;49(8):950-8.

539. Maan SS. Exclusively preferential transmission of an alien chromosome in wheat. *Crop Sci*. 1975;15: 287-92

540. MacKintosh C, Ferrier DEK. Recent advances in understanding the roles of whole genome duplications in evolution. *F1000 Research* 2017;6(F1000 Faculty Rev): 1623 (doi: 10.12688/f1000research.11792.1).

541. Madlung A, Comai L. The effect of stress on genome regulation and structure. *Ann Bot*. 2004;94:481-95.

542. Madlung A, Henkhaus N, Jurevic L, Kahsai EA, Bernhard J. Natural variation and persistent developmental instabilities in geographically diverse accessions of the allopolyploid *Arabidopsis suecica*. *Physiol Plantarum*. 2012;144:123-33.

543. Madlung A, Masuelli RW, Watson B, Reynolds SH, Davison J, Comai L. Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Physiol*. 2002;129:733-46.

544. Madlung A, Tyagi AP, Watson B, Jiang H, Kagochi T, Doerge RW, et al. Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids. *Plant J*. 2005;41(2):221-30.

545. Madlung A, Wendel JF. Genetic and epigenetic aspects of polyploid evolution in plants. *Cytogenet Genome Res*. 2013;140(2-4): 70-85.

546. Mago R, Zhang P, Bariana HS, Verlin DC, Bansal UK, Ellis JG, et al. Development of wheat lines carrying stem rust resistance gene *Sr39* with reduced *Aegilops speltoides* chromatin and simple PCR markers for marker-assisted selection. *Theor Appl Genet*. 2009;119:1441-50.

547. Mahmood A, Quarrie SA. Effects of salinity on growth, ionic relations and physiological traits of wheat, disomic addition lines from *Thinopyrum bessarabicum*, and two amphiploids. *Plant Breeding*. 1993;110:265-76.

548. Mankovska O., Ternovska T., Antonyuk M. Cytogenetic characteristic of powdery mildew resistance wheat lines, carrying chromosome 4Ssh or not. The 4th

International IMBIG Conference for Young Scientists “Molecular Biology: Advances and Perspectives”; Kyiv. Abstract book, 2011, p.89.

549. Manninen O, Kalendar R, Robinson J, Schulman AH. Application of BARE -1 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley. *Mol Gen Genet.* 2000;264(3):325-34.

550. Marais GF, Badenhorst PE, Eksteen A, Pretorius ZA. Reduction of *Aegilops sharonensis* chromatin associated with resistance genes *Lr56* and *Yr38* in wheat. *Euphytica.* 2009;171:15-22.

551. Marais GF, Bekker TA, Eksteen A, McCallum B, Fetch T, Marais AS. Attempts to remove gametocidal genes co-transferred to common wheat with rust resistance from *Aegilops speltoides*. *Euphytica.* 2010;171:71-85.

552. Marais GF, Kotze L, Eksteen A . Allo-syndetic recombinants of the *Aegilops peregrina* derived *Lr59* translocation in common wheat. *Plant Breed.* 2010;129:356-61.

553. Marais GF, McCallum B, Marais AS. Wheat leaf rust resistance gene *Lr59* derived from *Aegilops peregrina*. *Plant Breed.* 2008;124:538-41.

554. Marais GF, McCallum B, Snyman JE, Pretorius ZA, Marais AS. Leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr54* and *Yr37* transferred to wheat from *Aegilops kotschyi*. *Plant Breed.* 2005; 124: 538–541.

555. Marais GF. Preferential transmission in bread wheat of a chromosome segment derived from *Thinopyrum distichum* (Thunb.). *Acta Agronomica Sinica.* 2007;33(06):898-902.

556. Marcussen T, Sandve SR, Heier L, Spannagl M, Pfeifer M. Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat. *Science.* 2014;345: doi: 10.1126/science.1250092

557. Marguerat S, Baehler J. RNA-seq: from technology to biology. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67:569-79.

558. Marmagne A, Brabant Ph, Thiellement H, Alix K. Analysis of gene expression in resynthesized *Brassica napus* allotetraploids: transcriptional changes do not explain differential protein regulation. *New Phytol.* 2010;186:216-27.

559. Martienssen RA. Heterochromatin, small RNA and post-fertilization dysgenesis in allopolyploid and interploid hybrids of *Arabidopsis*. *New Phytol.* 2010;86:46-53.

560. Martin A, Troadec C, Boualem A, Rajab M, Fernandez R, Morin H, et al. A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature.* 2009;461:1135-8.

561. Martin GB, Bogdanove AJ, Sessa G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu Rev Plant Biol.* 2003;54:23-61.

562. Martin-Sanchez JA, Gomez-Colmenarejo M, Del Moral J, Sin E, Montes MJ, Gonzalez-Belinchon. A new Hessian fly resistance gene (*H30*) transferred from the wild grass *Aegilops triuncialis* to hexaploid wheat. *Theor Appl Genet.* 2003;106:1248-55.

563. Marusik I, Antonyuk M, Ternovskaya T. Minimization of volume of alien chromatin in the introgressive common wheat lines. International Symposium “Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources”; Yalta, 26-31 May 2002. Abstracts, 2002:12-3.

564. Mason-Gamer R.J. The β -amylase genes of grasses and a phylogenetic analysis of the Triticinae (Poaceae). *Am J Bot.* 2005;6:1045-58.

565. Mason-Gamer RJ. Multiple homoplasious insertions and deletions of a Triticeae (Poaceae) DNA transposon: a phylogenetic perspective. *BMC Evol Biol.* 2007;7:92. doi:10.1186/1471-2148-7-92

566. Massoudi-Nejad A, Nasuda S, McIntosh RA, Endo TR. Transfer of rye chromosome segments to wheat by gametocidal system. *Chromosome Res.* 2002;10:349-57.

567. Mater Y, Baenziger S, Gill K, Graybosch R, Whitcher L, Baker C, et al. Linkage mapping of powdery mildew and greenbug resistance genes on recombinant 1RS from ‘Amigo’ and ‘Kavkaz’ wheat–rye translocations of chromosome 1RS.1AL. *Genome.* 2004;47: 292-8.

568. Mattera MG, Avila CM, Atienza SG, Cabrera A. Cytological and molecular characterization of wheat-*Hordeum chilense* chromosome 7Hch introgression lines. *Euphytica*. 2015;203(1):165-176.

569. Matzke MA, Birchler JA. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet*. 2005; 6(1):24-35.

570. Matzke MA, Scheid OM, Matzke AJ. Rapid structural and epigenetic changes in polyploid and aneuploid genomes. *Bioessays*. 1999;21:761-7.

571. McArthur RI, Zhu X, Oliver RE, Klindworth DL, Xu SS, Stack RW, et al. Homoeology of *Thinopyrum junceum* and *Elymus rectisetus* chromosomes to wheat and disease resistance conferred by the *Thinopyrum* and *Elymus* chromosomes in wheat. *Chromosome*. 2012;Res20:699-715.

572. McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge. *Science*. 1984;226:792-801.

573. McCue AD, Nuthikattu S, Slotkin RK. Genome-wide identification of genes regulated in trans by transposable element small interfering RNAs. *RNA Biol*. 2013;10:1379-95.

574. McCue AD, Slotkin RK. Transposable element small RNAs as regulators of gene expression. *Trends Genet*. 2012;28:616-23.

575. McDonald, J.H. 2009. *Handbook of Biological Statistics (2nd ed.)*. Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland. Available in: <http://www.biostathandbook.com/>

576. McIntosh RA, Dyck PL, Green GJ. Inheritance of leaf rust and stem rust resistance in wheat cultivars Agent and Agatha. *Aust J Agric Res*. 1977;28:37-45.

577. McIntosh RA, Luig NH, Baker EP. Genetic and cytogenetic studies of stem rust, leaf rust and powdery mildew resistances in Hope and related wheat cultivars. *Austr J Biol Sci*. 1967;20:1181-92.

578. McIntosh RA, Miller TE, Chapman V. Cytogenetical studies in wheat XII. *Lr28* for resistance to *Puccinia recondita* and *Sr34* for resistance to *P. graminis tritici*. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*. 1982;89:295-306.

579. McIntosh RA, Yamazaki Y, Dubcovsky J, Rogers J, Morris C, Somers DJ et al. Catalogue of gene symbols for wheat. 2013. In: KOMUGI-integrated wheat science database at <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/download.jsp>. Accessed 4 April 2014

580. McIntosh RA, Zhang P, Cowger C, Parks R, Lagudah ES, Hoxha S. Rye-derived powdery mildew resistance gene *Pm8* in wheat is suppressed by the *Pm3* locus. *Theor Appl Genet*. 2011;123:359-67.

581. McIntyre CL, Rattey A, Kilian A, Dreccer MF, Shorter R. Preferential retention of chromosome regions in derived synthetic wheat lines: a source of novel alleles for wheat improvement. *Crop Pasture Sci*. 2014;65:125-38.

582. McKeown PC, Laouielle-Duprat S, Prins P, Wolff P, Schmid MW, Donoghue MT, et al. Identification of imprinted genes subject to parent-of-origin specific expression in *Arabidopsis thaliana* seeds. *BMC Plant Biol*. 2011;11:113. doi: 10.1186/1471-2229-11-113

583. Mello-Sampayo T, Canas AP. Suppressors of meiotic chromosome pairing in common wheat. In: Sears ER, Sears LMS, editors. *Proceedings of the Fourth International Wheat Genetics Symposium; August 6-11, 1973; University of Missouri, Columbia, Missouri, USA*. Columbia: Agricultural Experiment Station, College of Agriculture, University of Missouri; 1973, p. 703-13.

584. Mello-Sampayo T. Promotion of homoeologous pairing in hybrids of *Triticum aestivum* × *Aegilops longissima*. *Genet Iber*. 1971;23:1-9.

585. Mena M, Ambrose BA, Meeley RB, Briggs SP, Yanofsky MF, Schmidt RJ. Diversification of C-function activity in maize flower development. *Science*. 1996;274:1537-40.

586. Mestiri I, Chague V, Tanguy A-M, Huneau C, Huteau V, Belcram H. et al. Newly synthesized wheat allohexaploids display progenitor-dependent meiotic stability and aneuploidy but structural genomic additivity. *New Phytologist*. 2010;186:86-101 .

587. Mettin D, Bluthner WD, Schlegel G. Additional evidence on spontaneous 1B/1R wheat-rye substitutions and translocations. In: Sears ER, Sears LMS, editors.

Proceedings of the Fourth International Wheat Genetics Symposium; August 6-11, 1973; University of Missouri, Columbia, Missouri, USA. Columbia: Agricultural Experiment Station, College of Agriculture, University of Missouri; 1973, p.179-84.

588. Miftahudin RK, Ma XF, Mahmoud AA, Layton J, Rodriguez M, Chikmawati T et al. Analysis of EST loci on wheat chromosome group 4. *Genetics*. 2004;168:651-63.

589. Miller TE, Hutchinson J, Chapman V. Investigation of a preferentially transmitted *Aegilops sharonensis* chromosome in wheat. *Theor Appl Genet*. 1982;61:27-33.

590. Miller TE, Reader SM, Mahmood A, Purdie KA, King IP. Chromosome 3N of *Aegilops uniaristata* – a source of tolerance to high levels of aluminium for wheat. In: Li ZS, Xin ZY, editors. Proceedings of the Eighth International Wheat Genetics Symposium, 20-25 July 1993; Beijing, China. China Agricultural Sciencetech Press; 1995, p.1037-42.

591. Miller TE, Reader SM. A guide to the homoeology of chromosomes within the Triticeae. *Theor Appl Genet*. 1987;74(2):214-17.

592. Miller TE. Preferential transmission of alien chromosomes in wheat. In: Brandham PE, Bennett MD, editors. Proceedings of 2nd Kew chromosomes conference. 1983; London, UK. London: George Allen & Unwin; 1983, p. 173-82.

593. Millet E, Avivi Y, Zaccari M, Feldman M. The effect of substitution of chromosome 5S¹ of *Aegilops longissima* for its wheat homoeologues on spike morphology and on several quantitative traits. *Genome*. 1988;30:473-8.

594. Millet E, Manisterski J, Ben-Yehuda P, Distelfeld A, Deek J, Wan A. Introgression of leaf rust and stripe rust resistance from Sharon goatgrass (*Aegilops sharonensis* Eig) into bread wheat (*Triticum aestivum* L.) *Genome*. 2014;57:309-16.

595. Minaya M, Pimentel M, Mason-Gamer R, Catalan P. Distribution and evolutionary dynamics of Stowaway Miniature Inverted repeat Transposable Elements (MITEs) in grasses. *Mol Phylogenet Evol*. 2013;1:106-18.

596. Mirouze M , Vitte C. Transposable elements, a treasure trove to decipher epigenetic variation: insights from *Arabidopsis* and crop epigenomes. *J Exp Bot.* 2014;65:2801-12.

597. Mochida K, Yamazaki Y, Ogihara Y. Discrimination of homoeologous gene expression in hexaploid wheat by SNP analysis of contigs grouped from a large number of expressed sequence tags. *Mol Gen Genomics.* 2003;270:371-7.

598. Mohammed YSA, Eltayeb AE, Tsujimoto H. Enhancement of aluminum tolerance in wheat by addition of chromosomes from the wild relative *Leymus racemosus*. *Breed Sci.* 2013;63:407-16.

599. Mohler V, Bauer C, Schweizer G, Kempf H, Hartl L. *Pm50*: a new powdery mildew resistance gene in common wheat derived from cultivated emmer. *J Appl Genet.* 2013;54:259-63.

600. Molnar I, Benavente E, Molnar-Lang M.) Detection of intergenomic chromosome rearrangements in irradiated *Triticum aestivum* - *Aegilops biuncialis* amphiploids by multicolour genomic in situ hybridization. *Genome.* 2009;52:156-65.

601. Molnar I, Cifuentes M, Schneider A, Benavente E, Molnar-Lang M. Association between simple sequence repeat-rich chromosome regions and intergenomic translocation breakpoints in natural populations of allopolyploid wild wheats. *Ann Bot.* 2011;107:65-76.

602. Molnar I, Vrana J, Buresova V, Capal P, Farkas A, Dark E, et al. Dissecting the U, M, S and C genomes of wild relatives of bread wheat (*Aegilops* spp.) into chromosomes and exploring their synteny with wheat. *Plant J.* 2016;88:452-67.

603. Molnar-Lang M, Kruppa K, Cseh A, Bucsi J, Linc G. Identification and phenotypic description of new wheat: six-rowed winter barley disomic additions. *Genome.* 2012;55:302-11.

604. Molnár-Láng M, Linc G, Szakács É. Wheat-barley hybridization: the last 40 years. *Euphytica.* 2014;195:315-29.

605. Molnár-Láng M, Molnár I, Szakács E, Linc G, Bedő Z. Production and molecular cytogenetic identification of wheat-alien hybrids and introgression lines.

In: Tuberosa R, Graner A, Frison E, editors. Genomics of plant genetic resources. Springer, Springer Science + Business Media, Dordrecht; 2014. p. 255-83.

606. Momose M, Abe Y, Ozeki Y. Miniature inverted-repeat transposable elements of Stowaway are active in potato. *Genetics*. 2010;1:59-66.

607. Morgante M, Brunner S, Pea G, Fengler K, Zuccolo A, Rafalski A. Gene duplication and exon shuffling by helitron-like transposons generate intraspecies diversity in maize. *Nat Genet*. 2005;37:997-1002.

608. Morris R, Sears ER. The cytogenetics of wheat and its relatives. In: Quisenberry KS, Reitz LP, editors. Wheat and wheat improvement. Madison: American Society of Agronomy; 1967, p. 19-87.

609. Motsny II, Blagodarova EM, Rybalka AI. Cytogenetic characteristics of wheat lines with modified 1RS.1BL rye-wheat translocation. *Cytol Genet*. 2017;51(5):331-8.

610. Mujeeb-Kazi A, Gul A, Ahmad I, Farooq M, Rauf Y, Rahman A, et al. Genetic resources for some wheat abiotic stress tolerances. In: Ashraf M, Ozturk M, Athar HR, editors. Salinity and water stress: improving crop efficiency. Springer; 2008, p. 149-63.

611. Mujeeb-Kazi A, Kazi AG, Dundas I, Rasheed A, Ogonnaya F, Kishi M, et al. Genetic diversity for wheat improvement as a conduit for food security. In: Sparks D, editor. *Advances in Agronomy*. Vol. Burlington: Academic Press; 2013, p.179-257.

612. Mujeeb-Kazi A. Wheat improvement facilitated by novel genetic diversity and in vitro technology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2003;13:179-210.

613. Mullan DJ, Mirzaghaderi G, Walker E, Colmer TD, Francki MG. Development of wheat–*Lophopyrum elongatum* recombinant lines for enhanced sodium ‘exclusion’ during salinity stress. *Theor Appl Genet*. 2009;119:1313-23.

614. Mullan DJ, Platteter A, Teakle NL, Appels R, Colmer TD, Anderson JM, et al. EST-derived SSR markers from defined regions of the wheat genome to identify *Lophopyrum elongatum* specific loci. *Genome*. 2005;48(5):811-22.

615. Muller K, Heller H, Doerfler W. Foreign DNA integration. Genome-wide perturbations of methylation and transcription in the recipient genomes. *J Biol Chem.* 2001;276:14271-278.

616. Mutti JS , Bhullar RK, Gill KS. Evolution of gene expression balance among homeologs of natural polyploids. *G3: Genes, Genomes, Genetics.* 2017;7:1225-37.

617. Mykhailyk S, Antonyuk M, Shtefiuk T. Identification and analysis of wheat TaMSH7 gene promoter region. In: Buerstmayr H, Lang-Mladek Ch, Steiner B, Michel S, Buerstmayr M, Lemmens M, Vollmann J, Grausgruber H, editors. *Proceedings of the 13th International Wheat Genetics Symposium; April 23-28, 2017; Tulln, Austria. University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna; BOKU - University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna Department of Agrobiotechnology (IFA-Tulln) & Department of Crop Sciences, Australia; 2017, p. 84.*

618. Nagaki K, Tsujimoto H, Isono K, Sasakuma T. Molecular characterization of a tandem repeat, Afa family, and its distribution among Triticeae. *Genome.* 1995;38:479-86.

619. Nagy ED, Bennetzen JL. Pathogen corruption and site-directed recombination at a plant disease resistance gene cluster. *Genome Res.* 2008;18:1918-23.

620. Naito K, Zhang F, Tsukiyama T, Saito H, Hancock CN, Richardson AO, et al. Unexpected consequences of a sudden and massive transposon amplification on rice gene expression. *Nature.* 2009;461:1130-4.

621. Nakata N., Asami H., Yasumuro Y., Sasaki M. Role and transmission of midget chromosome found in the rye cytoplasmic Chinese Spring line, In: Miller TE, Koebner RMD, editors. *Proceedings of the Seventh International Wheat Genetics Symposium; 13-19 July 1988; Cambridge, England. Institute of Plant Science Research; 1988, p.391-96.*

622. Naranjo T, Fernandez-Rueda P. Pairing and recombination between individual chromosomes of wheat and rye in hybrids carrying the *ph1b* mutation. *Theor Appl Genet.* 1996;93:242-8.

623. Nasuda S, Friebe B, Bush W, Kynast RG, Gill BS. Structural rearrangement in chromosome 2M of *Aegilops comosa* has prevented the utilization of the Compair and related wheat- *Ae. comosa* translocations in wheat improvement. *Theor Appl Genet.* 1998;98:780-5.

624. Nasuda S, Friebe B, Gill BS. Gametocidal genes induce chromosome breakage in the interphase prior to the first mitotic cell division of the male gametophyte in wheat. *Wheat Genetics.* 1998;149:1115-24.

625. National BioResource Project Komugi [Internet]. Available from: <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/maps/markerMap.jsp;jsessionid=E6B7285A37555624B409EE35A82597F5.lb1?chromosome=5>

626. Nematollahi G, Mohler V, Wenzel G, Zeller FJ, Hsam SLK. Microsatellite mapping of powdery mildew resistance allele *Pm5d* from common wheat line IGVI-455. *Euphytica.* 2008;159:307-13.

627. Netzle S, Zeller FJ. Cytogenetic relationship of *Aegilops longissima* chromosomes with common wheat chromosomes. *Plant Syst Evol.* 1984;145:1-13.

628. Ng DWK, Zhang C, Miller M, Shen Z, Briggs SP, Chen ZJ. Proteomic divergence in *Arabidopsis* autopolyploids and allopolyploids and their progenitors. *Heredity.* 2012;108:419-30.

629. Ng DWK, Zhang Ch, Miller M, Palmer G, Whiteley M, Tholl D, et al. Cis- and trans-regulation of *miR163* and target genes confers natural variation of secondary metabolites in two *Arabidopsis* species and their allopolyploids. *Plant Cell.* 2011;23:1729-40.

630. Ni Z, Kim ED, Ha M, Lackey E, Liu J, Zhang Y, et al. Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature.* 2009;457:327-31.

631. Nicolas SD, Le Mignon G, Eber F, Coriton O, Monod H, Clouet V, et al. Homeologous recombination plays a major role in chromosome rearrangements that occur during meiosis of *Brassica napus* haploids. *Genetics*. 2007;175:487-503.

632. Nicolas SD, Leflon M, Liu ZC, Eber F, Chelysheva L, Coriton O, et al. Chromosome 'speed dating' during meiosis of polyploid *Brassica* hybrids and haploids. *Cytogen Genome Res*. 2008;120:331-8.

633. Niu JS, Chang Y, Wang BQ. Cloning and characterization of a jasmonate-induced protein gene in wheat. *Acta Phytopathol Sin*. 2008;38:171-7.

634. Niu Z, Klindworth DL, Friesen TL, Chao S, Jin Y, Cai X, et al. Targeted introgression of a wheat stem rust resistance gene by DNA marker-assisted chromosome engineering. *Genetics*. 2011;187:1011-20.

635. Niu Z, Klindworth DL, Friesen TL, Chao S, Ohm JB, Xu SS. Development and characterization of wheat lines carrying stem rust resistance gene Sr43 derived from *Thinopyrum ponticum*. *Theor Appl Genet*. 2014;127:969-80.

636. Ochoa V, Madrid E, Said M, Rubiales D, Cabrera A. Molecular and cytogenetic characterization of a common wheat-*Agropyron cristatum* chromosome translocation conferring resistance to leaf rust. *Euphytica*. 2015;201(1):89-95.

637. Ogonnaya FC, Abdalla O, Mujeeb-Kazi A, Kazi AG, Xu SS, Gosman N, et al. Synthetic hexaploids: harnessing species of primary gene pool for wheat improvement. *Plant Breed Rev*. 2013;37:35-122.

638. Okamoto M. Asynaptic effect of chromosome V. *Wheat Info Serv*. 1957;5:6.

639. Oliver RE, Cai X, Wang RRC, Xu SS, Friesen TL. Resistance to tan spot and *Stagonospora nodorum* blotch derived from relatives of wheat. *Plant Dis*. 2008;92:150-7.

640. Oliver RE, Cai X, Xu SS, Chen X, Stack RW. Wheat-alien species derivatives: a novel source of resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *Crop Sci*. 2005;45:1353-60.

641. Olivera PD, Millet E, Anikster Y, Steffenson BJ. Genetics of resistance to wheat leaf rust, stem rust, and powdery mildew in *Aegilops sharonensis*. *Genet Resist*. 2008;98(3):353-58.
642. Olivera PD, Steffenson BJ. *Aegilops sharonensis*: Origin, genetics, diversity, and potential for wheat improvement. *Botany*. 2009;87(8): 740-56.
643. Omielan JA, Epstein E, Dvorak J. Salt tolerance and ionic relations of wheat as affected by individual chromosomes of salt-tolerant *Lophopyrum elongatum*. *Genome*. 1991;34:961-74.
644. Ono B, Tanaka M. Cytological stability of the synthesized 6x wheat. *Seiken Ziho*. 1967;19:29-36.
645. Ono H, Nagayoshi T, Nakamura C, Shinotani K. *Triticum durum* – *Elytrigia elongata* addition line – cytological, morphological and biochemical characteristics. In: Sakamoto S, editor. Proceedings of the Sixth International Wheat Genetics Symposium; November 28-December 3 1983; Kyoto, Japan. Plant Germ-Plasm Institute, Faculty of Agriculture, Kyoto University; Kyoto, Japan; 1983, p. 1049–1053.
646. Orgil U, Araki H, Tangchaiburana S, Berkey R, Xiao S. Intraspecific genetic variations, fitness cost and benefit of RPW8, a disease resistance locus in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 2007;176:2317-33.
647. Ortiz R, Braun HJ, Crossa J, Crouch, JH. Wheat genetic resources enhancement by the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). *Genet Resour Crop Evol*. 2008;55:1095-140.
648. Oshlack A, Robinson MD, Young MD. From RNA-seq reads to differential expression results. *Genome Biol*. 2010;11:220. doi: 10.1186/gb-2010-11-12-220.
649. Otto SP. In polyploids, one plus one does not equal two. *Trends Ecol Evol*. 2003;18:431-3.
650. Ouyang S, Zhang D, Han J, Zhao X, Cui Y, Song W, et al. Fine physical and genetic mapping of powdery mildew resistance gene MLIW172 originating from wild emmer (*Triticum dicoccoides*). *PLoS ONE*. 2014;9: e100160.

651. Ozkan H, Levy AA, Feldman M. Allopolyploidy induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Plant Cell*. 2001;13(8):1735-47.
652. Ozkan H, Tuna M, Arumuganathan K. Nonadditive changes in genome size during allopolyploidization in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *J Hered*. 2003;94(3):260-4.
653. Ozkan HA, Levy A, Feldman M. Rapid differentiation of homeologous chromosomes in newly-formed allopolyploid wheat. *Israel J Plant Sci*. 2002;50(supplement 1):65-76.
654. Pan C, Li Q, Lu Y, Zhang J, Yang X, Li X. Chromosomal localization of genes conferring desirable agronomic traits from *Agropyron cristatum* chromosome 1P. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175265.
655. Panga Y, Chena X, Zhaoa J, Dua W, Chengb X, Wu J, et al. Molecular cytogenetic characterization of a wheat – *Leymus mollis* 3D(3Ns) substitution line with resistance to leaf rust. *J Genet Genomics*. 2014;41(4):205-14.
656. Parisod C, Holderegger R, Brochmann C. Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytol*. 2010;186:5-17.
657. Parisod C, Alix K, Just J, Petit M, Sarilar V, Mhiri C, et al. Impact of transposable elements on the organization and function of allopolyploid genomes. *New Phytol*. 2010;186:37-45.
658. Parisod C, Salmon A, Zerjal T, Tenailon M, Grandbastien MA, Ainouche M. Rapid structural and epigenetic reorganization near transposable elements in hybrid and allopolyploid genomes in *Spartina*. *New Phytol*. 2009;184:1003-15.
659. Parisod C, Senerchia N. Responses of transposable elements to polyploidy In plant transposable elements. In: Grandbastien M-A, Casacuberta JM, editors. *Topics in current genetics*. Berlin: Springer; 2012, p. 147-68.
660. Parkin IAP, Sharpe AG, Keith DJ, Lydiate DJ. Identification of the A and C genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape). *Genome*. 1995;38:1122-31.

661. Payne PI, Holt LM, Jackson EA, Law CN, Damania AB. Wheat storage proteins: their genetics and their potential for manipulation by plant breeding. *Phil Trans R Soc Lond.* 1984;304:359-71.
662. Peil A, Korzun V, Schubert V, Schumann E, Weber WE, Röder MS. The application of wheat microsatellites to identify disomic *Triticum aestivum* - *Aegilops markgrafii* addition lines. *Theor Appl Genet.* 1998;96:138-46.
663. Pestsova EG, Börner A, Röder MS. Development of a set of *Triticum aestivum*-*Aegilops tauschii* introgression lines. *Hereditas.* 2001;135:139-43.
664. Petersen S, Lyerly JH, Worthington ML, Parks WR, Cowger C, Marshall DS, et al. Mapping of powdery mildew resistance gene *Pm53* introgressed from *Aegilops speltoides* into soft red winter wheat. *Theor Appl Genet.* 2015;128(2):303-12.
665. Petit M, Guidat C, Daniel J, Denis E, Montoriol E, Bui T. Mobilization of retrotransposons in synthetic allotetraploid tobacco. *New Phytologist.* 2010;186:135-47.
666. Piarulli L, Gadaleta A, Mangini G, Signorile MA, Pasquini M, Blanco A, et al. Molecular identification of a new powdery mildew resistance gene on chromosome 2BS from *Triticum turgidum* ssp. *dicoccum*. *Plant Sci.* 2012;196:101-6.
667. Pickering RA, Hill AM, Kynast RG. Characterization by RFLP analysis and genomic *in situ* hybridization of recombinant and monosomic substitution plant derived from *Hordeum vulgare* L. x *Hordeum bulbosum* L. crosses. *Genome.* 1997;40:195-200.
668. Piegu B, Guyot R, Picault N, Roulin A, Sanyal A, Kim H, et al. Doubling genome size without polyploidization: dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice. *Genome Res.* 2006;16:1262-9.
669. Pietro ME, Tuleen NA, Hart GE. Development of wheat –*Triticum searsii* disomic chromosome addition lines. In: Miller TE, Koebner RMD, editors. *Proceedings of the Seventh International Wheat Genetics Symposium*; 13-19 July 1988; Cambridge, England. Institute of Plant Science Research; 1988, p. 409-13.

670. Pignatta D, Dilkes BP, Yoo SY, Henry IM, Madlung A, Doerge RW, et al. Differential sensitivity of the *Arabidopsis thaliana* transcriptome and enhancers to the effects of genome doubling. *New Phytologist*. 2010;186:194-206.

671. Pikaard CS. Nucleolar dominance: uniparental gene silencing on a multi-megabase scale in genetic hybrids. *Plant Mol Biol*. 2000;43:163-77.

672. Pikaard CS. The epigenetics of nucleolar dominance. *Trends Genet*. 2000;16:495-500.

673. Piriyaongsa J, Jordan IK. Dual coding of siRNAs and miRNAs by plant transposable elements. *RNA*. 2008;14:814-21.

674. Pontes O, Neves N, Silva M, Lewis MS, Madlung A, Comai L., et al. Chromosomal locus rearrangements are a rapid response to formation of the allotetraploid *Arabidopsis suecica* genome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:18240-5.

675. Pritham EJ. Transposable elements and factors influencing their success in eukaryotes. *J. Hered*. 2009;100:648-55.

676. 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 book, 2009: ITMI2009_005.

677. Prokopyk D, Antonyuk M, Ternovskaya T. The genetic control of the α -amylase isozymes of the durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Cytol Genet*. 2009;43(3):151-6.

678. Prokopyk 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; 24-27 April 2010; Bologna, Italy. Abstract book, 2010, p.89.

679. Pu J, Wang Q, Shen YF, Zhuang LF, Li CX, Tan MF, et al. Physical mapping of chromosome 4J of *Thinopyrum bessarabicum* using gamma radiation-induced aberrations. *Theor Appl Genet*. 2015;128:1319-28.

680. Pumphrey M, Bai J, Laudencia-Chingcuanco D, Anderson O, Gill BS. Nonadditive expression of homoeologous genes is established upon polyploidization in hexaploid wheat. *Genetics*. 2009;181:1147-57.

681. Qi B, Huang W, Zhu B, Zhong X, Guo J, Zhao N, et al. Global transgenerational gene expression dynamics in two newly synthesized allohexaploid wheat (*Triticum aestivum*) lines BMC Biology. 2012;10:3. <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/10/3>

682. Qi L, Friebe B, Zhang P, Gill BS. Homoeologous recombination, chromosome engineering and crop improvement. *Chromosom Res*. 2007;15:3-19.

683. Qi LL, Pumphrey MO, Friebe B, Zhang P, Qian C, Bowden RL, et al. A novel robertsonian translocation event leads to transfer of a stem rust resistance gene (*Sr52*) effective against race Ug99 from *Dasypyrum villosum* into bread wheat. *Theor Appl Genet*. 2011;123:159-67.

684. Qi LL, Wang SL, Chen PD, Liu DJ, Gill BS. Identification and physical mapping of three *Haynaldia villosa* chromosome-6V deletion lines. *Theor Appl Genet*. 1998;97:1042-6.

685. Qi P-F, Wei Y-M, Ouellet T, Chen Q, Tan X, Zheng Y-L. The γ -gliadin multigene family in common wheat (*Triticum aestivum*) and its closely related species. *BMC Genomics*. 2009;10:168-82.

686. Qi ZJ, Chen PD, Qian B, Zhuang L, Chen H, Chen T, et al. Characterization of a wheat – *Thinopyrum bessarabicum* (T2JS-2BS.2BL) translocation line. *Theor Appl Genet*. 2010;121: 589-97.

687. Quarrie SA, Pekic-Quarrie S, Radosevic R, Rancic D, Kaminska A, Barnes JD, et al. Dissecting a wheat QTL for yield present in a range of envi the QTL to candidate genes. *J Exp Bot*. 2006;57:2627-37.

688. Qui YC, Zhou RH, Kong XY, Zhang SS, Jia JZ. Microsatellite mapping of a *Triticum urartu* Tum. derived powdery mildew resistance gene transferred to common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*. 2005;111:1524-31.

689. Quraishi UM, Abrouk M, Bolot S, Pont C, Throude M, Guilhot N, et al. Genomics in cereals: from genome-wide conserved orthologous set (COS) sequences to candidate genes for trait dissection. *Funct Integr Genom.* 2009;9:473-84.
690. Rabinovich SV. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. *Euphytica.* 1998;100:323-40.
691. Rahmatov M, Hovmøller MS, Nazarić K, Andersson SC, Steffenson BJ, Johansson E. Seedling and adult plant stripe rust resistance in diverse wheat–alien introgression lines. *Crop Sci Abstr - Plant Genetic Res.* 2017;57(4):2032-42.
692. Rahmatov M, Rouse MN, Steffenson B, Andersson S, Wanyera R, Pretorius ZA, et al. Sources of stem rust resistance in wheat-alien introgression lines. *Plant Dis.* 2016;100(6):1101-09.
693. Rakszegi M, Molnár I, Lovegrove A, Darkó E, Farkas A, Láng L, et al. Addition of *Aegilops* U and M chromosomes affects protein and dietary fiber content of wholemeal wheat flour. *Front Plant Sci.* 2017;8:1529. doi: 10.3389/fpls.2017.01529.
694. Ramsay L, Macaulay, M, Cardle L. Intimate association of microsatellite repeats with retrotransposons and other dispersed repetitive elements in barley. *Plant Jour.* 1999;17:415-25.
695. Rapp RA, Wendel JF. Epigenetics and plant evolution. *New Phytol.* 2005;168:81-91.
696. Rasheed A, Mujeeb-Kazi A, Ogonnaya FCh, He Zh, Rajaram S. Wheat genetic resources in the post-genomics era: promise and challenges. *Ann Bot.* 2017; doi: 10.1093/aob/mcx148
697. Ratcliffe RH, Cambron SE, Flanders KL, Bosque-Perez NA, Clement SL, Ohm HW. Biotype composition of Hessian fly (Diptera: Cecidomyiidae) populations from the southeastern, mid-western, and northwestern United States and virulence to resistance genes in wheat. *J Econ Entomol.* 2000;93:1319-28.
698. Raupp WJ, Sukhwinder-Singh, Brown-Guedira GL, Gill BS. Cytogenetic and molecular mapping of the leaf rust resistance gene *Lr39* in wheat. *Theor Appl Genet.* 2001;102:347-52.

699. Rayburn AL, Gill BS. Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. *J Hered.* 1985;76:78-81.
700. Rebollo R, Romanish MT, Mager DL. Transposable elements: an abundant and natural source of regulatory sequences for host genes. *Annu Rev Genet.* 2012;46:21-42.
701. Remus R, Kammer C, Heller H, Schemitz B, Schell G, Doerfler W. Insertion of foreign DNA into an established mammalian genome can alter the methylation of cellular DNA sequences. *J Virol.* 1999;73:1010-22.
702. Ren T, Li Z, Yan B, Tan F, Tang Z, Fu S. Targeted segment transfer from rye chromosome 2R to wheat chromosomes 2A, 2B, and 7B. *Cytogenet Genome Res* 2017;151:50-9.
703. Ren Z, Zhang H. Induction of small-segment-translocation between wheat and rye chromosomes. *Sci China Ser. C Life Sci.* 1997; 40: 323-31.
704. Renny-Byfield S, Chester M, Kovařík A, Le Comber SC, Grandbastien MA. Next generation sequencing reveals genome downsizing in allotetraploid *Nicotiana tabacum*, predominantly through the elimination of paternally derived repetitive DNAs. *Mol Biol Evol.* 2011;28:2843-54.
705. Rey M-D, Martín AC, Higgins J, Swarbreck D, Uauy C, Shaw P, et al. Exploiting the *ZIP4* homologue within the wheat *Ph1* locus has identified two lines exhibiting homoeologous crossover in wheat-wild relative hybrids. *Mol Breed.* 2017;37:95. DOI 10.1007/s11032-017-0700-2.
706. Rieseberg LH, Sinervo B, Linder CR, Ungerer MC, Arias DM. Role of gene interactions in hybrid speciation: evidence from ancient and experimental hybrids. *Science.* 1996;272:741-5.
707. Rigal M, Mathieu O. A “mille-feuille” of silencing: epigenetic control of transposable elements. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1809:452-8.
708. Riley R, Chapman V, Johnson R. Introduction of yellow rust resistance of *Aegilops comosa* into wheat by genetically induced homoeologous recombination. *Nature.* 1968;217:383-4.

709. Riley R, Chapman V, Miller TE. The determination of meiotic chromosome pairing. In: Sears ER, Sears LMS, editors. Proceedings of the Fourth International Wheat Genetics Symposium; August 6-11, 1973; University of Missouri, Columbia, Missouri, USA. Columbia: Agricultural Experiment Station, College of Agriculture, University of Missouri; 1973, 731-8

710. Riley R, Chapman V. Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. *Nature*. 1985;182:713-5.

711. Riley R. Evidence on the origin of the B genome of wheat. *J. Hered.* 1958;49:91-8.

712. Riley R. The meiotic behavior, fertility and stability of wheat-rye chromosome addition lines. *Heredity*. 1960;14:89-100.

713. RNAstructure [Internet]. Available from: <http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/index.html>

714. Robbins TP, Walker EL, Kermicle JL, Alleman M, Dellaporta SL. Meiotic instability of the R-r complex arising from displaced intragenic exchange and intrachromosomal rearrangement. *Genetics*. 1991;129:271-83.

715. Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier M-H, Leroy P, et al. A microsatellite map of wheat. *Genetics*. 1998;149:2007-23.

716. Romero MD, Montes MJ, Sin E, Lopez-Brana I, Duce A, Martin-Sanchez JA. A cereal cyst nematode (*Heterodera avennae* Woll.) resistance gene transferred from *Aegilops triuncialis* to hexaploid wheat. *Theor Appl Genet*. 1998;96:1135-40.

717. Rong J, Abbey C, Bowers JE, Brubaker CL, Chang C, Chee PW, et al. A 3347-locus genetic recombination map of sequence-tagged sites reveals features of genome organization, transmission and evolution of cotton (*Gossypium*). *Genetics*. 2004;166:389-417.

718. Rong JK, Millet E, Manisterski J, Feldman M. A new powdery mildew resistance gene: introgression from wild emmer into common wheat and RFLP-based mapping. *Euphytica*. 2000;115:121-6.

719. Rosewarne G, Bonnett D, Rebetzke G, Lonergan P, Larkin PJ. The potential of *Lr19* and *Bdv2* translocations to improve yield and disease resistance in the high rainfall wheat zones of Australia. *Agronomy*. 2015;5:55-70.
720. Rowland GG & Kerber ER. Telocentric mapping in hexaploid wheat of genes for leaf rust resistance and other characters derived from *Aegilops squarrosa*. *Can J Genet Cytol*. 1974;16:137-44.
721. Ruiz M, Aguiriano E, Fite R, Carrillo JM. Combined use of gliadins and SSRs to analyse the genetic variability of the Spanish collection of cultivated diploid wheat (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum*). *Genet Res Crop Evol*. 2007;54:287-93.
722. Sabot F, Guyot R, Wicker T, Bernard M. Updating of transposable element annotations from large wheat genomic sequences reveals diverse activities and gene associations. *Mol Genet Gen*. 2005;274:119-30.
723. Salamini F, Ozkan H, Brandolini A, Schafer-Pregl R, Martin W. Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nat Rev Genet*. 2002;3:429-41.
724. Salina EA, Numerova OM, Ozkan H, Feldman M. Alterations in subtelomeric tandem repeats during early stages of allopolyploidy in wheat. *Genome*. 2004;47:860-7.
725. Salmon A, Ainouche ML, Wendel JF. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Mol Ecol*. 2005;14(4):1163-75.
726. Salmon, A., Ainouche, M.L. Polyploidy and DNA methylation: new tools available. *Mol Ecol*. 2010;19:213-5.
727. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, editors. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. 1626 p. 931-57.
728. Sandhu D, Gill KS. Gene-containing regions of wheat and the other grass genomes. *Plant Physiology*. 2002;128:803-11.

729. Sarilar V, Palacios PM, Rousselet A, Ridet C, Falque M, Eber F, et al. Allopolyploidy has a moderate impact on restructuring at three contrasting transposable element insertion sites in resynthesized *Brassica napus* allotetraploids. *New Phytol.* 2013;198(2):593-604.

730. Schachermayr G, Siedler H, Gale MD, Winzeler H, Keller B. Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat. *Theor Appl Genet.* 1994;88:110-5.

731. Schmolke M, Mohler V, Hartl L, Zeller FS, Hsam SLK. A new powdery mildew resistance allele at the *Pm4* wheat locus transferred from einkorn (*Triticum monococcum*). *Mol Breed.* 2012;29:449-56.

732. Schnable JC, Springer RM, Freeling M. Differentiation of the maize subgenomes by genome dominance and both ancient and ongoing gene loss. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(10):4069-74.

733. Schneider A, Linc G, Molnar I, Molnar-Lang M. Molecular cytogenetic characterization of *Aegilops biuncialis* and its use for the identification of five derived wheat/*Aegilops biuncialis* disomic addition lines. *Genome.* 2005;48:1070-82.

734. Schneider A, Rakszegi M, Molnar-Lang M, Szakacs E. Production and cytomolecular identification of new wheat-perennial rye (*Secale cereanum*) disomic addition lines with yellow rust resistance (6R) and increased arabinoxylan and protein content (1R, 4R, 6R). *Theor Appl Genet.* 2016;129(5):1045-59.

735. Schubert I, Shi F, Fuchs J, Endo TR. An efficient screening for terminal deletions and translocations of barley chromosomes added to common wheat. *Plant J.* 1998;14:489-95.

736. Schwarzacher T, Leitch AR, Bennett MD, Heslop-Harrison JS. *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann Bot.* 1989;64:315-24.

737. Sears ER. An induced mutant with homoeologous pairing in common wheat. *Can J Genet Cytol.* 1977;19:585-93.

738. Sears ER. Chromosome engineering in wheat. In: *Stadler Symposia*, vol 4. Columbia: University of Missouri; 1972, p. 23-38.

739. Sears ER. Misdivision of univalents in common wheat. *Chromosoma*. 1952;4:535-50.
740. Sears ER. Relationships of chromosomes 2A, 2B and 2D with their rye homoeologue. In: Finlay KW, Shepherd KW, editors. Proceedings of the Third International Wheat Genetics Symposium; 5-9 August, 1968; Australian Academy of Science, Canberra, Australia. Australian Academy of Science; 1968, p. 163-71.
741. Sears ER. The transfer of leaf rust resistance from *Aegilops umbellulata* to wheat. *Brookhaven Symp Biol*. 1956;9:1-22.
742. Sears ER. The transfer to wheat of interstitial segments of alien chromosomes. In: Sakamoto S, editor. Proceedings of the Sixth International Wheat Genetics Symposium; November 28-December 3 1983; Kyoto, Japan. Plant Germ-Plasm Institute, Faculty of Agriculture, Kyoto University; Kyoto, Japan; 1983, p. 5-12.
743. Sears ER. Transfer of alien genetic material to wheat. In: Evans LT, Peacock WJ, editors. *Wheat science – today and tomorrow*. Cambridge University Press, Cambridge, 1981; p. 75-89.
744. Sears ER. The aneuploids of common wheat. *Missouri Agricultural Experiment Station Research Bulletin*. University Archives of the University of Missouri, Columbia, MO. 1954:572.
745. Senerchia N, Felber F, Parisod C. Contrasting evolutionary trajectories of multiple retrotransposons following independent allopolyploidy in wild wheats. *New Phytol*. 2014;202:975-85.
746. Sepsi A, Molnar I, Szalay D, Molnar-Lang M. Characterization of a leaf rust-resistant wheat-*Thinopyrum ponticum* partial amphiploid BE-1, using sequential multicolor GISH and FISH. *Theor Appl Genet*. 2008;116:825-34.
747. Seyfarth R, Feuillet C, Schachermayr G, Winzeler M, Keller B. Development of a molecular marker for the adult plant-leaf rust resistance gene *Lr35* in wheat. *Theor Appl Genet*. 1999;99:554-60.
748. Shaked, H., Kashkush, K., Ozkan H, Fellman M, Levy AA, et al. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses

of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *Plant Cell*. 2001;13(8):1749-59.

749. Shan XH, Liu ZL, Dong ZY, Wang YM, Chen Y, Lin X, et al. Mobilization of the active mite transposons *mPing and Pong* in rice by introgression from wild rice (*Zizania latifolia* Griseb.). *Mol Biol Evol* . 2005; 22: 976–990.

750. Sharma D, Knott DR. The transfer of leaf rust resistance from *Agropyron* to *Triticum* by irradiation. *Can J Genet Cytol*. 1966;8:137-43.

751. Sharma HC, Baenziger PS. Production, morphology and cytogenetic analysis of *Elymus caninus* (*Agropyron caninum*) x *Triticum aestivum* F₁ hybrids and backcross derivatives. *Theor Appl Genet*. 1986;71:750-56.

752. Sharma HC, Ohm H, Goulart L, Lister R, Appels R, Benlhabib O. Introgression and characterization of barley yellow dwarf virus resistance from *Thinopyrum intermedium* into wheat. *Genome*. 1995;38:406-13.

753. Sharma S, Bhat P, Ehdaie B, Close TJ, Close TJ, Lukaszewski AJ, Waines JG. Integrated genetic map and genetic analysis of a region associated with root traits on the short arm of rye chromosome 1 in wheat. *Theor Appl Genet*. 2009;119:783-93.

754. Sharp PJ, Chao S, Desai S, Gale MD. The isolation, characterization and application in the Triticeae of a set of wheat RFLP probes identifying each homoeologous chromosome arm. *Theor Appl Genet*. 1989;78:342-8.

755. Sharpe AG, Parkin IAP, Keith DJ, Lydiate DJ. Frequent nonreciprocal translocations in the amphidiploid genome of oilseed rape (*Brassica napus*). *Genome*. 1995;38:1112-21.

756. Shchapova AI, Kravtsova LA. The production of wheat-rye substitution lines by using the Giemsa staining technique. *Cer Res Commun*. 1982;10:33-9.

757. Sheen SJ, Snyder LA. Studies on the inheritance of resistance to six stem rust cultures using chromosome substitution lines of a Marquis wheat selection. *Can J Genet Cytol*. 1964;6:74-82.

758. Shen X, Ohm H. *Fusarium* head blight resistance derived from *Lophopyrum elongatum* chromosome 7E and its augmentation with *Fhb1* in wheat. *Plant Breeding*. 2006;125:424-9.

759. Shen XK, Ma LX, Zhong SF, Liu N, Zhang M, Chen WQ, et al. Identification and genetic mapping of the putative *Thinopyrum intermedium*-derived dominant powdery mildew resistance gene *PmL962* on wheat chromosome arm 2BS. *Theor Appl Genet.* 2015;128:517-28.

760. Shepherd KW, Islam AKMR. Fourth compendium of wheat-alien chromosome lines. In: Miller TE, Koebner RMD, editors. *Proceedings of the Seventh International Wheat Genetics Symposium*; 13-19 July 1988; Cambridge, England. Institute of Plant Science Research; 1988, p. 1373-98.

761. Shepherd KW. Chromosomal control of endosperm proteins in wheat and rye. In: Finlay KW, Shepherd KW, editors. *Proceedings of the Third International Wheat Genetics Symposium*; 5-9 August, 1968; Australian Academy of Science, Canberra, Australia. Australian Academy of Science; 1968, p. 86-96.

762. Shewry PR, Holford NG, Lafiandra D. Genetics of wheat gluten proteins. *Adv Genet.* 2003; 49:111-71.

763. Shi AN, Leath S, Murphy JP. A major gene for powdery mildew resistance transferred to common wheat from wild einkorn wheat. *Phytopathology.* 1998;88:144-7.

764. Shkutina FM, Khvostov VV, Cytological investigation of Triticale. *Theor Appl Genet.* 1971;41:109-19.

765. Shpylchyn V, Martynenko V, Ternovska T. Genetic instability of amphidiploid Miosa (*Triticum durum* x *Aegilops comosa*, AABBMtMt) resistant to powdery mildew. In: Chen W-Q., editor. *Disease Risk and Food Security. Proceedings of the 13th International Cereal Rust and Powdery Mildews Conference*; 28 Aug.–1 Sep. 2012; Beijing, China. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press; 2012, p. 164-65.

766. Shtefiuk T, Mykhailyk S, Antonyuk M, Ternovska T. Application of RGAP technique for genotype screening of introgressive wheat lines resistant to powdery mildew. In: Buerstmayr H, Lang-Mladek Ch, Steiner B, Michel S, Buerstmayr M, Lemmens M, Vollmann J, Grausgruber H, editors. *Proceedings of the 13th International Wheat Genetics Symposium*; April 23-28, 2017; Tulln, Austria.

University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna; BOKU - University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna Department of Agrobiotechnology (IFA-Tulln) & Department of Crop Sciences, Australia; 2017, p. 244.

767. Shulan F, Zhenling L, Bao, Q, Xiang, G, Jan L, Bao L, et al. Molecular cytogenetic characterization of wheat-*Thinopyrum elongatum* addition, substitution and translocation lines with a novel source of resistance to wheat *Fusarium* head blight. J Genet Genomics. 2012;39:103-10.

768. Sievers F, Wilm A, Dineen DG, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Mol Syst Biol. 2011;7:539-45.

769. Silkova OG, Dobrovolskaya OB, Dubovets NI, Adonina IG. Production of wheat-rye. substitution lines and identification of chromosome composition of karyotypes using. C-banding, GISH, and SSR markers. Rus J Genet. 2006;42:645-53.

770. Singh A, Pallavi JK, Gupta P, Prabhu KV. Identification of microsatellite markers linked to leaf rust resistance gene *Lr25* in wheat. J Appl Genet. 2012;53:19-25.

771. Skalická K, Lim KY, Matyasek R, Matzke M, Leitch AR, Kovarik A. Preferential elimination of repeated DNA sequences from the paternal, *Nicotiana tomentosiformis* genome donor of a synthetic, allotetraploid tobacco. New Phytol. 2005;166:291-303.

772. Slotkin RK, Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. Nat Rev Gene. 2007;8:272-85.

773. Slotkin RK, Nuthikattu S, Jiang N. The evolutionary impact of transposable elements on gene and genome regulation. In: Greilhuber J, Wendel J, editors. Molecular biology and evolution of the plant genome. Springer Press; 2012:35-58.

774. Slotkin RK, Vaughn M, Borges F, Tanurdzic M, Becker JD, Feijo JA, et al. Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. Cell. 2009;136:461-72.

775. Slotte T, Huang HR, Holm K, Ceplitis A, Onge KS, Chen J. et al. Splicing variation at a flowering locus *C* homeolog is associated with flowering time variation in the tetraploid *Capsella bursa-pastoris*. *Genetics*. 2009;183:337-45.
776. Soltis DE, Soltis PS, Tate JA. Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytol*. 2004;161:173-91.
777. Soltis PS, Marchant DB, Van de Peer Y, Soltis DE. Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr Opin Genet Dev*. 2015;35:119-25.
778. Soltis PS, Soltis DE. The role of hybridization in plant speciation. *Annu Rev Plant Biol*. 2009;60:561-88.
779. Somers DJ, Isaac P, Edwards PK. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*. 2004;109:1105-14.
780. Somo M, Chao S, Acevedo M, Zurn J, Cai X, Marais F. A genomic comparison of homoeologous recombinants of the *Lr19* (T4) translocation in wheat. *Crop Sci*. 2014;54:565-75.
781. Song KM, Lu P, Tang KL, Osborn TC. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(17):7719-23.
782. Song L, Jiang L, Han H, Gao A, Yang X, Li L, et al. Efficient induction of wheat–*Agropyron cristatum* 6P translocation lines and GISH detection. *PLoS One*. 2013;8:e69501.
783. Song LQ, Lu YQ, Zhang JP, Pan CL, Yang XM, Li XQ, et al. Physical mapping of *Agropyron cristatum* chromosome 6P using deletion lines in common wheat background. *Theor Appl Genet*. 2016; 129:1023-34.
784. Song LQ, Lu YQ, Zhang JP, Pan CL, Yang XM, Li XQ, et al. Cytological and molecular, analysis of wheat-*Agropyron cristatum* translocation lines with 6P chromosome fragments conferring superior agronomic traits in common wheat. *Genome*. 2016; 59: 840-50.
785. Sourdille P, Cadalen T, Gay G, Gill BS, Bernard M. Molecular and physical mapping of genes affecting awning in wheat. *Plant Breed*. 2002;121:320-24.

786. Sozinov AA. Blocks of cereal storage proteins as genetic markers. In: Graveland A, Moonen JHE, editors. Proceedings of the 2nd International Workshop on Gluten Proteins; 1–3 May, 1984; Wageningen, The Netherlands. The Institute for Cereals, Flour and Bread TNO, Wageningen, The Netherlands; 1984, p. 121-27.

787. Spetsov P, Mingeot D, Jacquemin JM, Samardjieva K, Marinova E. Transfer of powdery mildew resistance from *Aegilops variabilis* into bread wheat. *Euphytica*. 1997;93:49-54.

788. Springer NM, Stupar RM. Allelic variation and heterosis in maize: how do two halves make more than a whole? *Genome Res*. 2007;17:264-75.

789. Stirnweis D, Milani SD, Brunner S, Herren G, Buchmann G, Peditto D, et al. Suppression among alleles encoding nucleotide-binding-leucine-rich repeat resistance proteins interferes with resistance in F1 hybrid and allele-pyramided wheat plants. *Plant J*. 2014;79:893-903.

790. Stoilova T, Spetsov P. Chromosome 6U from *Aegilops geniculata* Roth carrying powdery mildew resistance in bread wheat. *Breed Sci*. 2006;56:351-7.

791. Stupar RM, Springer NM. Cis-transcriptional variation in maize inbred lines B73 and Mo17 leads to additive expression patterns in the F1 hybrid. *Genetics*. 2006;73:2199-210.

792. Subbarao GV, Ban T, Kishii M, Ito O, Samejima H, Wang HY, et al. Can biological nitrification inhibition (BNI) genes from perennial *Leymus racemosus* (Triticeae) combat nitrification in wheat farming? *Plant Soil*. 2007;299:55-64.

793. Sun FL, Guo WW, Du JK, Ni ZF, Sun QX, Yao YY. Widespread, abundant, and diverse TE-associated siRNAs in developing wheat grain. *Gene*. 2013;522:1-7.

794. Sun X, Cao Y, Yang Z, Xu C, Li X, Wang S, et al. Xa26, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. *Plant J*. 2004;37:517-27.

795. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genetics*. 2008;9:465-76.

796. Sybenga J. The quantitative analysis of chromosome pairing and chiasma formation based on the relative frequencies of M1 configurations. I. Introduction: normal diploids. *Genetica*. 1965;36(3):243-52.

797. Szakács É, Molnár-Láng M. Development and molecular cytogenetic identification of new winter wheat/winter barley (Martonvásári 9 kr1/Igri) disomic addition lines. *Genome*. 2007;50:43-50.

798. Szućko I, Rogalska SM. Application of ISSR-PCR, IRAP-PCR, REMAP-PCR, and ITAP-PCR in the assessment of genomic changes in the early generation of triticales *Biologia Plantarum*. 2015;59(4):708-14.

799. Tang KS, Hart GE. Use of isozymes as chromosome markers in wheat-rye addition lines and triticales. *Genet Res*. 1975;26:151-7.

800. Tang S, Li Z, Jia X, Larkin PJ. Genomic in situ hybridization (GISH) analyses of *Thinopyrum intermedium*, its partial amphiploid Zhong 5, and disease-resistant derivatives in wheat. *Theor Appl Genet*. 2000;100:344-52.

801. Tang X, Shi D, Xu J, Li Y, Li W, Ren Z, et al. Molecular cytogenetic characteristics of a translocation line between common wheat and *Thinopyrum intermedium* with resistance to powdery mildew. *Euphytica*. 2014;197:201-10.

802. Tang ZX, Fu SL, Ren ZhL, Zhou JP, Yan BJ, Zhang HQ. Variations of tandem repeat, regulatory element, and promoter regions revealed by wheat-rye amphiploids. *Genome*. 2008;51(6):399-408.

803. Tang ZX, Fu SL, Yan BJ, Zhang HQ, Ren ZL. Unequal chromosome division and inter-genomic translocation occurred in somatic cells of wheat-rye allopolyploid. *J Plant Res*. 2012;125:283-90.

804. Tang ZX, Wu M, Zhang HQ, Yan BJ, Tan FQ, Zhang H. et al. Loss of parental coding sequences in an early generation of wheat-rye allopolyploid. *Int J Plant Sci*. 2012;173:1-6.

805. Tanguy A-M, Coriton O, Abelard P, Dedryver F, Jahier J. Structure of *Aegilops ventricosa* chromosome 6Nv, the donor of wheat genes Yr17, Lr37, Sr38, and Cre5. *Genome*. 2005;48:541-6.

806. Tate JA, Joshi P, Soltis KA, Soltis PS, Soltis DE. On the road to diploidization? Homeolog loss in independently formed populations of the allopolyploid *Tragopogon miscellus* (Asteraceae). *BMC Plant Biology*. 2009;9:80. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-80>.

807. Tate JA, Ni Zh, Scheen A-C, Koh J, Gilbert CA, Lefkowitz D. Evolution and expression of homeologous loci in *Tragopogon miscellus* (Asteraceae), a recent and reciprocally formed allopolyploid. *Genetics*. 2006;173:1599–1611.

808. Tate JA, Symonds VV, Doust AN. Synthetic polyploids of *Tragopogon miscellus* and *T. mirus* (Asteraceae): 60 years after Ownbey's discovery. *Amer J Bot*. 2009;96:979-88.

809. Tayalé A, Parisod C. Natural pathways to polyploidy in plants and consequences for genome reorganization. *Cytogenet Genome Res*. 2013;140:79-96.

810. Teixeira FK, Colot V. Gene body DNA methylation in plants: a means to an end or an end to a means? *EMBO J*. 2009;28:997-8.

811. 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. In: Pogna NE, Romano M, Pogna EA, Galterio G, editors. *Proceedings of the Tenth International Wheat Genetics Symposium; 1-6 September 2003; Paestum, Italy*. Roma: Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura; 2003, p. 1272-4.

812. Ternovskaya TK. Development of alien substitution lines of common wheat by "mixing" chromosomes within a subgenome. In: *Mendel Centenary Congress; March 7-10, 2000, Brno, Czech Republic; Abstracts, Votr. Pflanzenzuchtung; 2000(47):86*.

813. The TT, McIntosh RA, Bennett FGA. Cytogenetical studies in wheat. 1X. Monosomic analysis, telocentric mapping and linkage relationships of genes *Sr21*, *Pm4* and *Mle*. *Aust J Biol Sci*. 1979;32:115-25.

814. The TT. Chromosome location in genes conditioning stem rust resistance transferred from diploid to hexaploid wheat. *Nat New Biol*. 1973;241:256-61.

815. Tiwari VK, Rawat N, Neelam K, Kumar S, Randhawa GS, Dhaliwal HS. Substitutions of 2S and 7U chromosomes of *Aegilops kotschy* in wheat enhance grain iron and zinc concentration. *Theor Appl Genet.* 2010;121:259-69.
816. Tiwari VK, Wang S, Sehgal S, Vrána J, Friebe B, Kubaláková M, et al. SNP discovery for mapping alien introgressions in wheat. *BMC Genomics.* 2014;15:273. doi: 10.1186/1471-2164-15-273
817. Tsujimoto H, Tsunewaki K. Gametocidal genes in wheat and its relatives. I. Genetic analysis in common wheat of a gametocidal gene derived from *Aegilops speltoides*. *Can J Genet Cytol.* 1984;26:78-84.
818. Tsujimoto H, Tsunewaki K. Hybrid dysgenesis in common wheat caused by gametocidal genes. *Jpn. J. Genet.* 1985;60:565-78.
819. Tsujimoto H, Yamada T, Sasakuma T. Molecular structure of a wheat chromosome end healed after gametocidal gene-induced breakage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:3140-44.
820. Tsujimoto H. Gametocidal genes in wheat as the inducer of chromosome breakage. *Wheat Inform Serv.* 2000;100:33-48.
821. Tsunewaki K, Ebaná K. Production of near-isogenic lines of common wheat for glaucousness and genetic basis of this trait clarified by their use. *Genes and Genetic Systems.* 1999;74:33-41.
822. Turner BM. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays.* 2000;22:836-45.
823. Udall JA, Quijada PA, Osborn TC. Detection of chromosomal rearrangements derived from homologous recombination in four mapping populations of *Brassica napus* L. *Genetics.* 2005;169:967-79.
824. Udall JA, Swanson JM, Nettleton D, Percifield RJ, Wendel JF. A novel approach for characterizing expression levels of genes duplicated by polyploidy. *Genetics.* 2006;173:1823-7.
825. Usher J, Bond U. Recombination between homoeologous chromosomes of lager yeasts leads to loss of function of the hybrid GPH1 gene. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:4573-9.

826. Valkoun J, Kucerova D, Bartos P. Transfer of leaf rust resistance from *Triticum monococcum* to hexaploid wheat. *Z Pflanzenzüchtg.* 1986;96:271-8.
827. Valarik M, Bartos J, Kovarova P, Kubalaková M, de Jong JH, Dolezel J. High-resolution FISH on super-stretched flow-sorted plant chromosomes. *Plant J.* 2004;37:940-50.
828. Van de Peer Y, Maere S, Meyer A. The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nat. Rev. Genet.* 2009;10:725-32.
829. Van der Plank JE. Horizontal and vertical resistance. In: *Disease resistance in plants.* Orlando: FL Academic; 1984. 194 p.
830. Vanzetti LR, Brevis JK, Dubcovsky J, Helguera M. Identification of microsatellites linked to *Lr47* *Electronic J Biotech.* 2006;9(3). <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue3/full/23/index.html>
831. Vaucheret H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev.* 2006;20:759-71.
832. Vaucheret H: Plant argonautes. *Trends Plant Sci.* 2008;13:350-8.
833. Vazquez F, Vaucheret H, Rajagopalan R, Lepers C, Gascioli V, Mallory AC, et al. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. *Mol Cell.* 2004;16 :69-79.
834. Vdovychenko Zh, Antonyuk M, Ternovskaya T. Influence of gametocidal chromosome 4Sl on the segregation ratio in genetic analysis of the common wheat lines. In: Pogna NE, Romano M, Pogna EA, Galterio G, editors. *Proceedings of the Tenth International Wheat Genetics Symposium; 1-6 September 2003; Paestum, Italy.* Roma: Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura; 2003, p. 649-51.
835. Vdovychenko ZhV, Antonyuk MZ, Ternovskaya TK. Genetic analysis of the *T. aestivum/Ae. sharonensis* introgressive lines of common wheat for resistance to powdery mildew. *Tsitol Genet.* 2005;39(3):67-74.
836. Verhoeven KJF, van Dijk PJ, Biere A. Changes in genomic methylation patterns during the formation of triploid asexual dandelion lineages. *Mol Ecol.* 2010;19:315-24.

837. Vietia RA. Paralogs in polyploids: One for all and all for one? *Plant Cell*. 2005;17:4-11.
838. Vikal Y, Chhuneja P, Singh R, Dhaliwal HS. Tagging of an *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene *Lr28* with a microsatellite marker in wheat. *J Plant Biochem Biotechnol*. 2004; 3:47-9.
839. Villareal RL, Banuelos O, Mujeeb-Kazi A, Rajaram S. Agronomic performance of chromosome 1B and T1BL.1RS near-isolines in the spring bread wheat Seri M82. *Euphytica*. 1998;103:195–202.
840. Vitte C, Panaud O. LTR retrotransposons and flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model. *Cytogenet Genome Res*. 2005;110:91-107.
841. Vuylsteke M, van Eeuwijk F, Van Hummelen P, Kuiper M, Zabeau M. Genetic analysis of variation in gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 2005;171:1267-75.
842. Wang G-H, Lv J, Zhang J, Han Sh, Zong M, Guo N, et al. Genetic and epigenetic alterations of *Brassica nigra* introgression lines from somatic hybridization: a resource for cauliflower improvement. *Front Plant Sci*. 2016;7:1258. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5003894/>
843. Wang H, Chai Y, Chu X, Zhao Y, Wu Y, Zhao J, et al. Molecular characterization of a rice mutator-phenotype derived from an incompatible cross-pollination reveals transgenerational mobilization of multiple transposable elements and extensive epigenetic instability. *BMC Plant Biol*. 2009;9:63.doi: 10.1186/1471-2229-9-63.
844. Wang J, Tian L, Lee HS, Wei NE, Jiang H, Watson B, et al. Genomewide nonadditive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploids. *Genetics*. 2006;172: 507-17.
845. Wang J, Tian L, Madlung A, Lee H-S, Chen M, Lee JJ, et al. Stochastic and epigenetic changes of gene expression in *Arabidopsis* polyploids. *Genetics*. 2004;167:1961-73.

846. Wang K, Lin Zh, Wang L, Wang K, Shi Q, Du L, et al. Development of a set of PCR markers specific to *Aegilops longissima* chromosome arms and application in breeding a translocation line. *Theor Appl Genet*. 2017. DOI 10.1007/s00122-017-2982-5.

847. Wang L, Liu Y, Du W, Jing F, Wang Z, Wu J, et al. Anatomy and Cytogenetic identification of a wheat-*Psathyrostachys huashanica* Keng line with early maturation. *PLoS One*. 2015;10(10):e0131841.

848. Wang LS, Chen PD. Development of *Triticum aestivum*- *Leymus racemosus* ditelosomic substitution line 7Lr#1S(7A) with resistance to wheat scab and its meiotic behavior analysis. *Chinese Sci Bull*. 2008;53:3522-9.

849. Wang M, Wang Sh, Liang Zh, Shi W, Gao C, Xia G. From genetic stock to genome editing: gene exploitation in wheat. *Trends in Biotechnology*. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.10.002>

850. Wang M, Wang Sh, Xia G. From genome to gene: a new epoch for wheat research? *Trends in Plants Science*. 2015;20(6):380-7.

851. Wang N, Wang H, Wang H, Zhang D, Wu Y, Xiufang Ou, et al. Transpositional reactivation of the *Dart* transposon family in rice lines derived from introgressive hybridization with *Zizania latifolia*. *BMC Plant Bio*. 2010;10:190. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/10/190>

852. Wang RR-C, Chen J, Joppa LR. Production and identification of chromosome specific RAPD markers for Langdon durum wheat disomic substitution lines. *Crop Sci*. 1995;35:886-9.

853. Wang RR-C, Larson SR, Jensen KB. Analysis of *Thinopyrum bessarabicum*, *T. elongatum*, and *T. junceum* chromosomes using EST-SSR markers. *Genome*. 2010;53:1083-9.

854. Wang RR-C, Zhang XY. Characterization of the translocated chromosome using fluorescence in situ hybridization and random amplified polymorphic DNA on two *Triticum aestivum*-*Thinopyrum intermedium* translocation lines resistant to wheat streak mosaic or barley yellow dwarf virus. *Chromosome Res*. 1996;4:583-7.

855. Wang X, Elling AA, Li X, Li N, Peng Z, He G, et al. Genome-wide and organ-specific landscapes of epigenetic modifications and their relationships to mRNA and small RNA transcriptomes in maize. *The Plant Cell*. 2009;21:1053-69.

856. Wang X, Weigel D, Smith LM. Transposon variants and their effects on gene expression in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*. 2013;9:e1003255.

857. Wang XJ, Gaasterland T, Chua NH. Genome-wide prediction and identification of cisnatural antisense transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol*. 2005;6:R30.1-11.

858. Wang YM, Dong ZY, Zhang ZJ, Lin XY, Shen Y, Zhou D, et al. Extensive de novo genomic variation in rice induced by introgression from wild rice (*Zizania latifolia* Griseb.). *Genetics*. 2005;170:1945-56.

859. Wang Zh-H, Zhang D, Bai Y, Zhang Y-H, Liu Y, Wu Y, et al. Genomewide variation in an introgression line of rice-*Zizania* revealed by whole-genome re-sequencing. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e74479.

860. Waninge J. A modified method of counting chromosomes in root tip cells of wheat. *Euphytica*. 1965;14(3):249-50.

861. Wells DG, Kota RS, Sandhu HS, Gardner WS, Finney KF. Registration of one disomic substitution line and five translocation lines of winter wheat germplasm resistant to wheat streak mosaic virus. *Crop Sci*. 1982;22:1277-8.

862. Wendel JF, Cronn RC. Polyploidy and the evolutionary history of cotton. *Adv Agronomy*. 2003;78:139-86.

863. Wendel JF. Genome evolution in polyploids. *Plant Mol Biol*. 2000;42(1):225-49.

864. Whelan EDP. Transmission of a chromosome from decaploid *Agropyron elongatum* that confers resistance to the wheat curl mite in common wheat. *Genome*. 1988;30:293-8.

865. White SE, Habera LF, Wessler SR. Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes: a role for *Copia*-like elements in the evolution of gene structure and expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:11792-6.

866. Whitney KD, Randell RA, Rieseberg LH. Adaptive introgression of abiotic tolerance traits in the sunflower *Helianthus annuus*. *New Phytol.* 2010;187:230-39.

867. Wicker T, Keller B. Genome-wide comparative analysis of *copia* retrotransposons in Triticeae, rice, and *Arabidopsis* reveals conserved ancient evolutionary lineages and distinct dynamics of individual copia families. *Genome Res.* 2007;17:1072-81.

868. Wicker T, Yahiaoui N, Keller B. Contrasting rates of evolution in *Pm3* loci from three wheat species and rice. *Genetics.* 2007;177:1207-16.

869. Wicker Th, Guyot R, Yahiaoui N, Keller B. CACTA transposons in triticeae. A diverse family of high-copy repetitive elements. *Plant Physiol.* 2003;132(1):52-63.

870. Wicker Th, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genetics.* 2007;8(12):973-82.

871. Wiersma AT, Pulman JA, Brown LK, Cowger C, Olson EL. Identification of *Pm58* from *Aegilops tauschii* *Theor Appl Genet.* 2017;130(6):1123-33.

872. Wittkopp PJ, Haerum BK, Clark AG. Evolutionary changes in cis and trans gene regulation. *Nature.* 2004;430:85-8.

873. Wright KM, Pires JC, Madlung A. Mitotic instability in resynthesised and natural polyploids of the genus *Arabidopsis* (Brassicaceae). *Amer J Bot.* 2009;96:1656-64.

874. Wu J, Yang X, Wang H, Li H, Li L, Li X, et al. The introgression of chromosome 6P specifying for increased numbers of florets and kernels from *Agropyron cristatum* into wheat. *Theor Appl Genet.* 2006;114:13-20.

875. Wu Y, Jiang T, Sun Y, Wang Z, Guo G, Sun Sh. Mobilization of diverse transposable elements in rice induced by alien pollination without entailing genetic introgression. *Plant Molecular Biology Reporter.* 2015;33(5):118191.

876. Wu Y, Sun Y, Wang X, Lin X, Sun S, Shen K, et al. Transcriptome shock in an interspecific F1 triploid hybrid of *Oryza* revealed by RNA sequencing. *J Integr Plant Biol.* 2016;58(2):150-64.

877. Wulff BBH, Moscou MJ. Strategies for transferring resistance into wheat: from wide crosses to GM cassettes. *Front Plant Sci.* 2014;5:692. doi: 10.3389/fpls.2014.00692.

878. www.le.ac.uk/bl/phh4/dnaiso.htm

879. Xiao Zh, Tang Sh, Qiu L, Tang Z, Fu Sh. Oligonucleotides and ND-FISH displaying different arrangements of tandem repeats and identification of *Dasypyrum villosum* chromosomes in wheat backgrounds. *Molecules.* 2017; 22:973. doi:10.3390/molecules22060973.

880. Xie C, Sun Q, Ni Z, Yang T, Nevo E, Fahima T. Chromosomal location of a *Triticum dicoccoides* - derived powdery mildew resistance gene in common wheat by using microsatellite markers. *Theor Appl Genet.* 2003;106:341-5.

881. Xie Z, Wang C, Wang K, Wang Sh, Li X, Zhang Zh. Molecular characterization of the celiac disease epitope domains in α -gliadin genes in *Aegilops tauschii* and hexaploid wheats (*Triticum aestivum* L.) *Theor Appl Genet.* 2010;121:1239-51.

882. Xiong LZ, Xu CG, Maroof MAS, Zhang Q. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol Gen Genet.* 1999;261:439-46.

883. Xiong Z, Gaeta RT, Pires JC. Homoeologous shuffling and chromosome compensation maintain genome balance in resynthesized allopolyploid *Brassica napus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108:7908-13.

884. Xu H, Yao G, Xiong L, Yang L, Jiang Y, Fu B, et al. Identification and mapping of *pm2026*: a recessive powdery mildew resistance gene in an einkorn (*Triticum monococcum* L.) accession. *Theor Appl Genet.* 2008;117:471-7.

885. Xu H, Yin D, Li L, Wang Q, Li X, Yang X, et al. Development and application of EST-based markers specific for chromosome arms of rye (*Secale cereale* L.). *Cytogen Genome Res.* 2012;136:220-8.

886. Xu SS, Faris JD, Cai X, Klindworth DL. Molecular cytogenetic characterization and seed storage protein analysis of 1A/1D translocation lines of durum wheat. *Chromosom Res.* 2005;13:550-68.
887. Xu SS, Jin Y, Klindworth DL, Wang RRC, Cai X. Evaluation and characterization of seedling resistance to stem rust Ug99 races in wheat-alien species derivatives. *Crop Sci.* 2009;49:2167-75.
888. Xu SS, Khan K, Klindworth DL, Faris JD, Nygard G. Chromosomal location of genes for novel glutenin subunits and gliadins in wild emmer wheat (*Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides*). *Theor Appl Genet.* 2004;108:1221-8.
889. Xu Y, Zhong L, Wu X, Fang X, Wang J. Rapid alterations of gene expression and cytosine methylation in newly synthesized *Brassica napus* allopolyploids. *Planta.* 2009;229:471-83.
890. Yaakov B, Ben-David S, Kashkush K. Genome-wide analysis of *Stowaway-Like* MITEs in wheat reveals high sequence conservation, gene association, and genomic diversification. *Plant Physiol.* 2013;161(1):486-96.
891. Yaakov B, Kashkush K. Massive alterations of the methylation patterns around DNA transposons in the first four generations of a newly formed wheat allohexaploid. *Genome.* 2011;54(1):42-9.
892. Yaakov B, Kashkush K. Methylation, transcription and rearrangements of transposable elements in synthetic allopolyploids. *Int J Plant Genomics.* 2010;2011,Article ID 569826, 7 pages. doi:10.1155/2011/569826.
893. Yahiaoui N, Srichumpa P, Dudler R, Keller B. Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat. *Plant J.* 2004;37:528-38.
894. Yamamoto M, Mukai Y. Application of fluorescence *in situ* hybridization to molecular cytogenetics of wheat. *Wheat Inf Serv.* 1989;69:30-2.
895. Yan YS, Zhang YM, Yang K, Sun ZX, Fu YP, Chen X, et al. Small RNAs from MITE-derived stem-loop precursors regulate abscisic acid signaling and abiotic stress responses in rice. *Plant J.* 2011;5:820-8.

896. Yang Ch, Zhang T, Wang H, Zhao N, Liu B. Heritable alteration in salt-tolerance in rice induced by introgression from wild rice (*Zizania latifolia*). *Rice*. 2012;5:36. <http://www.thericejournal.com/content/5/1/36>

897. Yang LX, Bennetzen JL. Distribution, diversity, evolution, and survival of *Helitrons* in the maize genome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:19922-7.

898. Yang X, Li X, Wang Ch, Chen Ch, Tian Z, Ji W. Isolation and molecular cytogenetic characterization of a wheat – *Leymus mollis* double monosomic addition line and its progenies with resistance to stripe rust. *Genome*. 2017;60(12):1029-36.

899. Yang X, Cao A, Sun Y, Chen P. Tracing the location of powdery mildew resistance-related gene Stpk-V by FISH with a TAC clone in *Triticum aestivum*-*Haynaldia villosa* alien chromosome lines. *Chin Sci Bull*. 2013; 58: 4084–4091.

900. Yang X, Wang Ch, Li X, Chen Ch, Tian Z, Wang Y. Development and molecular cytogenetic identification of a novel wheat–*Leymus mollis* Lm#7Ns (7D) disomic substitution line with stripe rust resistance. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140227>

901. Yang XF, Wang CY, Chen CH, Zhang H, Tian ZR, Li X, et al. Chromosome constitution and origin analysis in three derivatives of *Triticum aestivum* – *Leymus mollis* by molecular cytogenetic identification. *Genome*. 2014; 57(11–12): 583-589.

902. Yang XF, Wang CY, Li X, Chen CH, Tian ZR, Wang YJ, et al. Development and molecular cytogenetic identification of a novel wheat – *Leymus mollis* Lm#7Ns (7D) disomic substitution line with stripe rust resistance. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140227.

903. Yang Y-C, Tuleen NA, Hart GE. Isolation and identification of *Triticum aestivum* L. em. Thell. cv. Chinese Spring – *T. peregrinum* Hackel disomic chromosome addition lines. *Theor Appl Genet*. 1996;92:591-8.

904. Yang ZJ, Zhang T, Liu C, Li GR, Zhou JP, Zhang Y, et al. Identification of wheat *Dasypyrum breviaristatum* addition lines with stripe rust resistance using C-banding and genomic *in situ* hybridization. In: Appels R, Eastwood R, Lagudah E, Langridge P, Mackay M, McIntyre L, Sharp P (eds) *Proceedings of the 11th*

international wheat genetics symposium. University Press, Sydney, Australia, 2008, <http://hdl.handle.net/2123/3272>

905. Yasuda K, Tsukiyama T, Karki S, Okumoto Y, Teraishi M, Saito H, et al. Mobilization of the active transposon *mPing* in interspecific hybrid rice between *Oryza sativa* and *O. glaberrum*. *Euphytica*. 2013;192:17-24.

906. Ye X, Lu Y, Liu W, Chen G, Han H, Zhang J, et al. The effects of chromosome 6P on fertile tiller number of wheat as revealed in wheat-*Agropyron cristatum* chromosome 5A/6P translocation lines. *Theor Appl Genet*. 2015;128(5):797-811.

907. Yingshan D, Xiuling B, Yushi L, Mengyuan H, Bao L. Molecular characterization of a cryptic wheat-*Thinopyrum intermedium* translocation line: evidence for genomic instability in nascent allopolyploid and aneuploid lines. *Genet Mol Biol*. 2004;27:237-41.

908. Yoo MJ, Szadkowski E, Wendel JF. Homoeolog expression bias and expression level dominance in allopolyploid cotton. *Heredity (Edinb)*. 2013;110:171-80.

909. Yu LX, Liu S, Anderson JA, Singh RP, Jin Y, Dubcovsky J. et al. Haplotype diversity of stem rust resistance loci in uncharacterized wheat lines. *Mol Breed*. 2010. C334DOI 10.1007/s11032-010-9403-7.

910. Yuan Zh, Liu D, Zhang L, Zhang L, Chen W, Yan Z, et al. Mitotic illegitimate recombination is a mechanism for novel changes in high-molecular-weight glutenin subunits in wheat-rye hybrids. *PLoS One*. 2011;6:e23511.

911. Zeller FJ, Fuchs E. Cytologie und Krankheitsresistenz einer 1A/1R- und mehrerer 1B/1R Weizen-Roggen-Translokationsorten. *Z Pflanzenzuchtg*. 1983;90:285-96.

912. Zeller FJ, Hsam SLK. Broadening the genetic variability of cultivated wheat by utilizing rye chromatin. In: Sakamoto S, editor. *Proceedings of the Sixth International Wheat Genetics Symposium*; November 28-December 3 1983; Kyoto, Japan. Plant Germ-Plasm Institute, Faculty of Agriculture, Kyoto University; Kyoto, Japan; 1983, p.161-73.

913. Zeng J, Cao W, Fedak G, Sun S, Mccallum B, Fetch T et al. Molecular cytological characterization of two novel durum – *Thinopyrum intermedium* partial amphiploids with resistance to leaf rust, stem rust and *Fusarium* head blight. *Hereditas*. 2013;150:10-6.

914. Zeng J, Cao W, Hucl P, Yang Y, Xue A, Chi D et al. Molecular cytogenetic analysis of wheat – *Elymus repens* introgression lines with resistance to *Fusarium* head blight. *Genome*. 2013;56:75-82.

915. Zhan H, Zhang X, Li G, Pan ZH, Hu J, Li X, et al. Molecular characterization of a new wheat-*Thinopyrum intermedium* translocation line with resistance to powdery mildew and stripe rust. *Int J Mol Sci*. 2015;16:2162-73.

916. Zhang A, Li W, Wang Ch, Yang X, Chen Ch, Zhu Ch, et al. Molecular cytogenetics identification of a wheat – *Leymus mollis* double disomic addition line with stripe rust resistance. *Genome*. 2017;60(5):375-83.

917. Zhang H, Bian Y, Gou X, Zhu B, Xu C, Qi B. et al. Persistent whole-chromosome aneuploidy is generally associated with nascent allohexaploid wheat. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110,3447-52.

918. Zhang H, Jia J, Gale MD, Devos KM. Relationships between the chromosomes of *Aegilops umbellulata* and wheat. *Theor Appl Genet*. 1995;96:69-75.

919. Zhang H, Li G, Li D, Gao D, Zhang J, Yang E, et al. Molecular and cytogenetic characterization of new wheat-*Dasyphyrum breviaristatum* derivatives with post-harvest re-growth habit genes. *Genes (Basel)*. 2015;6(4):1242-55.

920. Zhang H, Reader SM, Liu X, Jia JZ, Gale MD, Devos KM. Comparative genetic analysis of the *Aegilops longissima* and *Ae. sharonensis* genomes with common wheat. *Theor Appl Genet*. 2001;103:518-25.

921. Zhang J, Liu W, Lu Y, Liu Q, Yang X, Li X, et al. A resource of large-scale molecular markers for monitoring *Agropyron cristatum* chromatin introgression in wheat background based on transcriptome sequences. *Scientific REPOrTS*. 2017;7:11942. DOI:10.1038/s41598-017-12219-4 1.

922. Zhang J, Zhang J, Liu W, Han H, Lu Y, Yang X, et al. Introgression of *Agropyron cristatum* 6P chromosome segment into common wheat for enhanced thousand-grain weight and spike length. *Theor Appl Genet.* 2015;128(9):1827-37.
923. Zhang J-Y, Li X-M, Wang R-C, Cortes A, Rosas V, Mujeeb-Kazi A. Molecular cytogenetic characterization of Eb-genome chromosomes in *Thinopyrum bessarabicum* disomic addition lines of bread wheat. *Int J Plant Sci.* 2002;163:167-74.
924. Zhang N, Yang WX, Liu DQ. Identification and molecular tagging of leaf rust resistance gene (*Lr24*) in wheat. *Agric Sci China.* 2011; 10:1898-905.
925. Zhang P, Dundas IS, McIntosh RA, Xu SS, Park RF, Gill BS, et al. Wheat–Aegilops Introgressions. In: Molnár-Láng M, Ceoloni C, Doležel J, editors. Alien introgression in wheat. Cytogenetics, molecular biology, and genomics. New York (NY): Springer; 2015, p.221-43.
926. Zhang R, Hou F, Feng Y, Zhang W, Zhang M, Chen P. Characterization of a *Triticum aestivum*-*Dasypyrum villosum* T2VS·2DL translocation line expressing a longer spike and more kernels traits. *Theor Appl Genet.* 2015;128:2415-25.
927. Zhang R, Sun B, Chen J, Cao A, Xing L, Feng Y. *Pm55*, a developmental-stage and tissue-specific powdery mildew resistance gene introgressed from *Dasypyrum villosum* into common wheat. *Theor Appl Genet.* 2016;129(10):1975-84.
928. Zhang R, Yao R, Sun D, Sun B, Feng Y, Zhang W, et al. Development of V chromosome alterations and physical mapping of molecular markers specific to *Dasypyrum villosum*. *Mol Breed.* 2017;37:67. DOI 10.1007/s11032-017-0671-3.
929. Zhang W, Zhang R, Feng Y, Bie T, Chen P. Distribution of highly repeated DNA sequences in *Haynaldia villosa* and its application in the identification of alien chromatin. *Chin Sci Bull.* 2013;58:890-7.
930. Zhang Y, Zhang J, Huang L, Gao A, Zhang J, Yang X, et al. A high-density genetic map for P genome of *Agropyron Gaertn.* based on specific-locus amplified fragment sequencing (SLAF-seq). *Planta.* 2015;242:1335-47.

931. Zhang Zh, Song L, Han H, Zhou Sh, Zhang J, Yang X, et al. Physical localization of a locus from *Agropyron cristatum* conferring resistance to stripe rust in common wheat. *Int J Mol Sci.* 2017;18:2403; doi:10.3390/ijms18112403.

932. Zhang ZY, Xin ZY, Larkin PJ. Molecular characterization of a *Thinopyrum intermedium* group 2 chromosome (2Ai-2) conferring resistance to barley yellow dwarf virus. *Genome.* 2001;44:1129-35.

933. Zhao CH, Cui F, Wang XQ, Shan SC, Li XF, Bao YG, et al. Effects of 1BL/1RS translocation in wheat on agronomic performance and quality characteristics. *Field Crops Res.* 2012; 127:79-84.

934. Zhao J, Wang X, Pang Y, Cheng X, Wang L. Molecular cytogenetic and morphological identification of a wheat–*L. mollis* 1Ns (1D) substitution line, DM45. *Plant Mol Biol.* 2016;34(6):1146-52. |

935. Zhao J-X, Du W-L, Wu J, Cheng X-N, Gao Y, Pang Y-H, et al. Development and identification of a wheat-*Leymus mollis* multiple alien substitution line. *Euphytica.* 2013;190(1):45-52.

936. Zhao N, Zhu B, Li MJ, Wang L, Xu LY, Zhang H, et al. Extensive and heritable epigenetic remodeling and genetic stability accompany allohexaploidization of wheat. *Genetics.* 2011;188:499-509.

937. Zhao R, Wang H, Qi J, Jin X, Yuan C, Zhang Y, et al. Development of EST-PCR markers for the chromosome 4V of *Haynaldia villosa* and their application in identification of 4V chromosome structural aberrants. *J Integr Agric.* 2014;13:282-9.

938. Zheng Q, Li B, Li HW, Li ZS. Utilization of blue-grained character in wheat breeding derived from *Thinopyrum ponticum*. *J Genet Genomics.* 2009; 6:575-80.

939. Zhironov E.G. Investigation on wheat cytogenetics at Krasnodar Lukyanenko Research Institute of Agriculture. *EWAC Newsletter. Plant Breeding Inst; Cambridge, 1986:48–52.*

940. Zhou R, Moshgabadi N, Adams KL. Extensive changes to alternative splicing patterns following allopolyploidy in natural and resynthesized polyploids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108: 16122-7.

941. Zhu Z, Bonnett D, Ellis M, Singh P, Heslot N, Dreisigacker S, et al. Mapping resistance to spot blotch in a CIMMYT synthetic-derived bread wheat. *Mol Breeding*. 2014;34:1215-28.

942. Zimmering S, Sandler L, Nicoletti B. Mechanisms of meiotic drive. *Ann Rev Genet*. 1970;4:409-36.

943. Zou J, Fu D, Gong H, Qian W, Xia W Pires JC, et al. De novo genetic variation associated with retrotransposon activation, genomic rearrangements and trait variation in a recombinant inbred line population of *Brassica napus* derived from interspecific hybridization with *Brassica rapa*. *Plant J*. 2011;68:212-24.

ДОДАТОК 1

**ПЕРЕЛІК І ПОСЛІДОВНОСТІ ПРАЙМЕРІВ, ЩО ФЛАНКУЮТЬ
МІКРОСАТЕЛІТНІ ПОВТОРИ У ГЛІАДИНОВИХ ГЕНАХ**

wggm-N-g1-R*	AGCTCCAGTGTGCAGCCATCC
wggm-N-g1-L	CCTTGACCCACCTGTTGTTGCTG
wggm-P3-g1-R	CAGTGTGCAGCCATCCATAG
wggm-P3-g1-L	ATAGTGGCAGCAGGATACGC
wggm-N-o1-R	CAGCCACAACCATTTCGACCACA
wggm-N-o1-L	CCATGCGCTATGTTGTGTTGCTGC
wggm-P3-o1-R	CCACAGTATTCGCAACCACA
wggm-P3-o1-L	TTCCATGCGCTATGTTGTGT
wggm-N-a1-R	TCCACAGCCGCAACCACAGT
wggm-N-a1-L	ACTTGTGAGCTTCCATGCGCT
wggm-P3-a1-R	ACAGCCGCAACCACAGTATT
wggm-P3-a1-L	TTCCATGCGCTATGTTGTGT
wggm-P3-a2-R	CACAACCGCAAGCACAGTAT
wggm-P3-a2-L	TTCCATGCGCTATGTTGTGT
wggm-N-b1-R	GCGGTGCCAAGCCATCCACA
wggm-N-b1-L	TGCTGAGGCTGTTGGAAGGAGACT
wggm-P3-b1-R	AAGCCATCCACAATGTTGTTC
wggm-P3-b1-L	CCTGTGGGTTTTGCTGAGAT

* Розшифровка: Wggm - wheat genic gliadin microsatellite, генний мікросателіт гліадину пшениці.

N – використана програма Primer Blast з порталу ncbi.nlm.nih.gov

P3 – використана програма Primer 3.

g1 – γ -гліадин (1 – номер праймеру до мікросателітного повтору гліадину певного типу); o1 – ω -гліадин; a1 – α -гліадин; a2 – α -гліадин; b1 – β -гліадин.

R – right primer, правий праймер.

L – left primer, лівий праймер.

ДОДАТОК 2

СПИСОК ОПРИЛЮДНЕНИХ 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.
2. Антонюк МЗ, Терновская ТК. Признаки морфологии растений как маркеры гомеологических групп хромосом *Triticeae*. Цитология и генетика. 1997; 31(4): 95–101.
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.
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.
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.
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.
7. Antonyuk MZ, Bodylyova MV, Ternovskaya TK. Genome structure of introgressive lines *Triticum aestivum/Aegilops sharonensis*. Cytology and Genetics. 2009; 43(6): 58-67.
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.
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.

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.
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/.
12. Iefimenko TS, Antonyuk MZ, Martynenko VS, Navalikhina AG, Ternovska TK. Introgression of *Aegilops mutica* genes into common wheat genome. *Cytol Genet*. 2018; 52(1): 21-30.
13. Антолюк 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.
14. Терновська ТК, Антолюк 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.
15. Прокопик ДО, Ющук АІ, Антолюк 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.
16. Маньковська ОС, Терновська ТК, Антолюк 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.
17. Єфіменко ТС, Антолюк 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.
18. Антолюк 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): 10–7.
19. Маньковська ОС, Антолюк МЗ. Гаметоцидні гени представників *Aegilops* L. Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. 2010; 8(1): 140–153.

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.
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.
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, т.16. Київ: Логос; 2015, с. 21–25.
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, т.19. Київ: Логос; 2016, с. 33-37.
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, т.19. Київ: Логос; 2016, с. 55–60.
25. Терновська Т.К., Антонюк М.З., Штефюк Т.В., Мартиненко В.С. 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.
26. Антонюк М.З., Єфіменко Т.С., Наваліхіна А.Г., Терновська Т.К. 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.
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

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, с. 368–375.
29. Терновська Т.К., 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.
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, т.6. Київ: Логос; 2009, с. 28–32.
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, т.9. Київ: Логос; 2010, с. 3–7.
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 ІХ з'їзду УТГіС, т.3 Київ: Логос; 2012, с. 175–180.
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, т.4. Київ: Логос; 2012, с. 13–18.
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, т.3. Київ: Логос; 2012, с. 201–205.
35. Антонюк МЗ, Штефюк ТВ, Терновська ТК. Поліморфізм інтрогресивних ліній м'якої пшениці за алелями мікросателітних локусів. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць, т.12. Київ: Логос; 2013, с. 97–101.

36. Терновська ТК, Антонюк МЗ, Мартиненко ВС. Гени — промотори остистості у геномах *Triticinae*. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць, т.12. Київ: Логос; 2013, с. 164–168.
37. Михайлик СЮ, Антонюк МЗ, Терновська ТК. Можливі молекулярні механізми мінливості гліадинових генів в інтрогресивних лініях пшениці. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць, т.14. Київ: Логос; 2014, с.62–66.
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, т.14. Київ: Логос; 2014, с. 67–71.
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, т.14. Київ: Логос; 2014, с. 86–91.
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 31st – 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 31st – 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. Prokopyk 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 рослин та біотехнологія», 5–7 жовтня 2011; Біла Церква, Україна, 2011: 52.
58. Маньковська О, Терновська Т, Антонюк М. Цитогенетична характеристика стійких до борошнистої роси ліній пшениці з хромосомою 4S^{sh} та без неї і гібридів за їхньою участю. Перша конференція молодих вчених «Біологія рослин 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 рослин та біотехнологія», 5–7 жовт. 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 Agricultural 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 Agricultural Crops: Traditions and Prospects”. October 17-19th, 2012, Odesa, Ukraine; Одеса, 2012: 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. Application 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 Present. 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.