

ЗАЛУЧЕННЯ ІНТРОГРЕСІЙ ВІД *AEGILOPS MUTICA* ДО ГЕНОМУ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

Т.С. ЄФІМЕНКО, М.З. АНТОНЮК, В.С. МАРТИНЕНКО, А.Г. НАВАЛІХІНА, Т.К. ТЕРНОВСЬКА

Національний університет «Києво-Могилянська академія», Київ
E-mail: tern@ukma.kiev.ua

*Інтрогресія генетичного матеріалу від дикорослих родичів до геному м'якої пшениці залишається актуальною, оскільки є природним та невичерпним джерелом збагачення генофонду пшениці за генами, що покращують її адаптивний потенціал. Гексаплоїдні лінії F_4 – F_5 пшеничного типу створено методом гібридизації між м'якою пшеницею Аврора (AABBDD) та геномно-заміщеним амфідиплоїдом Авротіка (AABVTT), який включає до складу свого гексаплоїдного геному диплоїдний генотип TT від родича пшениці *Aegilops mutica* замість субгеному DD м'якої пшениці. Гібриди F_1 – F_3 мали обмежену самофертильність, яка істотно зросла для деяких похідних у F_4 – F_5 . У всіх генераціях створення ліній супроводжувалось цитологічним контролем кількості хромосом, яка коливалась в цілому за генераціями від 33 до 46 та стабілізувалась для більшості нащадків на 42 хромосомах у F_4 за умов добору в кожній генерації рослин з кількістю хромосом 40–44. Лінії F_5 беруть початок від дев'яти самофертильних рослин F_2 , відрізняються від Аврори за деякими ознаками морфології рослин та демонструють наявність у геномі чужинної ДНК за даними дот-блот гібридизації з геномною ДНК *Aegilops mutica* як зондом.*

Ключові слова: інтрогресивні лінії, м'яка пшениця, *Aegilops mutica*, множинні інтрогресії, ознаки морфології пшениці, каріотип, дот-блот гібридизація.

Вступ. Перенесення від дикорослих родичів до геному м'якої пшениці генів, що можуть покращити її адаптивний потенціал, зокрема генів стійкості до біотичних та абіотичних стресів, стало широко визнаним генетичним прийомом. У сучасних оглядах підкреслюється думка, що серед родичів пшениці можна знайти алелі, які потенційно здатні забезпечити генетичну стійкість практично до будь-яких стресових чинників біотичної та абіотичної природи [1–3]. Способи інтрогресії розпочинались створенням пшенично-чужинних амфідиплоїдів, на основі яких отримували набори чужинно-доданих та

чужинно-заміщених ліній, а також ліній з транслокаціями, що виникали спонтанно серед нащадків таких ліній чи створювалися штучно із застосуванням низки методів індукції кон'югації гомеологічних хромосом [4]. В останні десятиріччя прийом створення наборів ліній з чужинними хромосомами з наступним їхнім вивченням щодо ідентифікації гомеологічної належності чужинної хромосоми чи її ділянки став витіснятися іншим підходом до інтрогресії генів до пшеничного геному. З одного боку, почали створювати синтетичні гексаплоїдні пшениці (SHWs) на основі тетраплоїдних пшениць з геномом AABB та диплоїдних видів з геномами D (переважно), A (рідше) та B (зовсім рідко) [5]. Далі SHWs схрещують з м'якою пшеницею та шукають інтрогресивних нащадків, які б характеризувались наявністю тієї ознаки, заради якої планувалась інтрогресія. З іншого боку, з'явилися рекомбінантні лінії від схрещування пшениці з родичами з вторинного та третинного генетичного пулу. Геноми таких ліній могли формуватися спонтанно та містили (за даними аналізу геномів різними придатними для цього цитогенетичними методами) мозаїчні хромосоми з чергуванням ділянок пшеничного та чужинного хроматину [6–8]. Рідше рекомбінантні лінії створювали цілеспрямовано в результаті схрещування так званих альтернативних ліній з майже однаковими чужинними транслокаціями [9]. Найбільш характерним для цієї другої хвилі робіт із залученням інтрогресій стало зміщення акценту з отримання серій гомеологічно ідентифікованих інтрогресій у геномі пшениці різного обсягу, починаючи з хромосоми та закінчуючи невеликими транслокаціями, до простого виявлення серед нащадків від будь-якої форми віддаленого схрещування носіїв ознаки інтересу. Далі виконується аналітична робота з такими нащадками для ідентифікації та хромосомної локалізації

інтрогресованих генів. Очевидно, це пояснюється напрацюванням певного набору методик, як цитологічних [10–12], так і молекулярно-генетичних [13–15], які принципово спростили роботу з ідентифікації гомеологічної належності чужинних інтрогресій та зняли питання гомеологічної ідентифікації з переліку першочергових завдань. Тепер головним стало завдання отримання інтрогресивних ліній з чітко вираженою цільовою ознакою, яка стійко передається через насінневі покоління пшеничних рослин.

Aegilops mutica Boiss (*Amblyopyrum muticum* Eig) — однорічний диплоїдний (геном Т) дикорослий родич пшениці, ендемік центральної Туреччини та Вірменії [16]. Досі цей вид практично не був залучений до інтрогресивної гібридизації. Лише у 2015 р. з'явилося повідомлення про створення чужинно-доданої лінії 6Т із застосуванням амфідиплоїда Чайніз Спринг/*Amblyopyrum muticum*, стійкої до листової іржі, і новий ген названо *LrAmm1t* [17].

Авротику, геномно-заміщений амфідиплоїд з геномною структурою AABBTT, було створено майже 30 років тому [18]. Багаторічними спостереженнями встановлено, що Авротіка, крім стійкості до борошнистої роси та листової іржі, характеризується високою зимостійкістю [19]. Щоб з'ясувати, чи можна цю надзвичайно цінну для селекції ознаку долучити до фенотипу м'якої пшениці шляхом інтрогресії та створити таким чином донор її генетичного забезпечення, спочатку слід отримати розмаїття інтрогресивних ліній *Triticum aestivum*/*Aegilops mutica*, щоб забезпечити подальшу можливість їхнього вивчення щодо зимо-морозостійкості.

Про ознаки стійкості до стресових чинників абіотичної природи вже добро відомо, що їхній генетичний контроль практично ніколи не буває моногенним, а здійснюється в результаті експресії принаймні кількох генів, які утворюють так звані генні мережі [20]. Щоб перенести у геном кілька ключових генів, що утворюють такі мережі, навіть теоретично потрібно починати роботу з геномом, який має кілька чужинних заміщень. Власне саме для отримання множинних заміщень Жировим [21] і було запропоновано та розроблено метод змішування хромосом в одному з трьох субгеномів гексаплоїдного гібрида від схрещування двох

гексаплоїдів, які відрізняються між собою лише одним з трьох субгеномів. Необхідність створення інтрогресивних ліній з множинними інтрогресіями можна пояснити можливістю залучити до геному пшениці гени, що контролюють кілька корисних ознак у складі геному однієї інтрогресивної лінії або одну ознаку, що має немоногенне успадкування. Якщо Авротіка характеризується підвищеною у порівнянні з м'якою пшеницею зимостійкістю, інтерес викликають не лише гексаплоїдні інтрогресивні лінії, які наближаються за цим показником до Авротіки, а і лінії з 44 хромосомами.

Чи пояснюється видатна зимостійкість Авротіки генами, що їх несе власне субгеном Т, чи має місце взаємодія між генами егілопсу та генами, що їх містить тетраплоїдний компонент AABB Аврори, який входить до складу геному Авротіки, на це питання відповіді поки що немає. І шукати її потрібно через створення інтрогресивних ліній, які за зимо-морозостійкістю будуть наближатися до Авротіки, істотно перевищуючи за цим показником сорти м'якої пшениці.

У даній роботі наведено опис процесу створення інтрогресивних ліній Аврора/*Ae. mutica* та їхня характеристика щодо ознак морфології рослин та вмісту чужинного хроматину.

Матеріали та методи. Інтрогресивні лінії створювали із застосуванням методу «змішування» хромосом двох чужинних геномів у гексаплоїдного гібрида між двома пшеничним генотипами, які мають однакові субгеноми AABB і відрізняються за третім субгеномом [21] (рис. 1). Гексаплоїд Авротіка (AABBTT) є амфідиплоїдом тетраплоїдного компонента AABB м'якої пшениці сорту Аврора та диплоїдного виду *Ae. mutica* (ТТ геном). Відповідно до методу змішування геномів було отримано гібрид F₁ між Авророю та Авротікою. Гібриди F₁ та F₂ вирощували у полі при осінньому посіві та природній яровизації. Колосся ізолювали на стадії колосіння до цвітіння. Паростки F₃–F₅ пророщували для визначення хромосомних чисел у первинних корінцях за методикою [22]. Після яровизації у холодильній камері з освітленням при 4 °C протягом 45 днів їх було вирощено до стадії дозрівання у світловій кімнаті за оптимальними для всіх стадій онтогенезу режимами освітлення та температури.

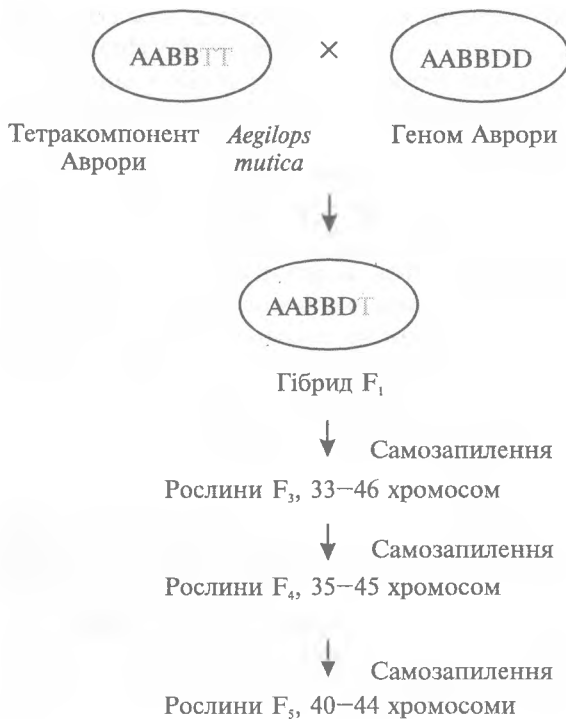


Рис. 1. Схема створення ліній *T. aestivum/Ae. mutica* методом «змішування» хромосом третього субгену у геномі гібрида F₁ між сортом м'якої пшениці Аврора та геномно-заміщеним амфідиплоїдом Авротіка

Мейоз вивчали у материнських клітинах пилку на стадії метафази I. Колосся поміщали у фіксатор Карнуа на стадії, коли колос знаходився у трубці між другим та третім листками. Забарвлювали 2%-ним ацетокарміном.

Геномну ДНК виділяли за методикою з буфером на основі ЦТАБ [23]. Дот-блот гібридизацію здійснювали у відповідності до рекомендації виробника набору реактивів («Fermentas», Литва). Для проведення дот-блоту на мембрані іммобілізують краплини геномної ДНК ліній пшениці, які досліджують на наявність в їхніх геномах генетичного матеріалу від *Aegilops mutica*. Попередньо фрагментовану геномну ДНК виду *Ae. mutica*, помічену біотином, використано як зонд. Гібридизація відбувається між гомологічними ділянками ДНК *Ae. mutica* та геномної ДНК ліній пшениці, якщо лінія має інтрогресію в своєму геномі. Крапки ДНК, де відбулась гібридизація між ДНК лінії та зондом, набувають фіолетового забарвлення.

Крапки, де гібридизації не відбулось, залишаються безбарвними. Отже геном ліній, ДНК яких дала безбарвні крапки, не містить чужинної ДНК або містить її в кількостях, не достатніх для гібридизації із зондом.

Рослини оцінювали візуально за низкою ознак морфології, перелік яких з описом градацій, що відрізняються від характерних для сорту Аврора, наведено у результатах. Оцінку на стійкість до борошнистої роси виконували за 9-бальною шкалою, за якою стійка рослина оцінюється балом 9, а рослини з балами 0–6 вважаються сприйнятливими в різному ступені.

Результати досліджень та їх обговорення. Створення інтрогресивних ліній на основі гібрида Авротіка × Аврора залежало від фертильності рослин покоління F₁: якби вони були самостерильними, потрібно було б бекросувати їх Аворою, як це робилося раніше при створенні інтрогресивних ліній — похідних Аврорати (AABBUU) та Аврозису (AABBS^{sh}S^{sh}) [21]. Проте гібриди AABBDТ виявилися самофертильними, як і гібриди між Авродесом (AABBSS) та Аворою [24]. Тому бекросування з м'якою пшеницею, не застосовували, а використовували насіння лише від самозапилення гібридів різних генерацій. Можливо фертильність рослин F₁ та частини рослин наступних поколінь F₂–F₃ пояснюється тим, що хромосоми геномів D і T здатні кон'югувати. У рослин F₁ замість очікуваної конфігурації асоціації хромосом у метафазі мейозу I материнських клітин пилку (M1 МКП) 14^{II} + 14^I спостерігали збільшення кількості бівалентів до 19 при максимальній асоціації хромосом.

Від 109 ізольованих колосів рослин F₁ було отримано 515 насінин F₂. Середня фертильність при визначенні її як кількості зернин на колосок була 0,20 з мінімальним значенням 0 та максимальним 0,74. Розподіл показників фертильності не відповідав нормальному і мав позитивний ексцес ($E = 1,15 \pm 0,072$, $t = 15,9$). Мода становила 0,25. Насіння F₂ без визначення кількості їхніх хромосом було висіяне восени в полі для природної яровизації. З цих 515 насінин сходи отримали лише з 219 (42,5 ± 2,18 %). Рослин F₂, що дали насіння від самозапилення під ізоляторами, було 41 (18,7 ± 2,64 % від пророслих насінин). Насіння F₃ було пророщено для визначення кількості хромосом у первинних

корінцях. Їхню оцінку вдалось здійснити для 137 паростків F_3 (табл. 1).

Після яровизації вижило 97 рослин F_3 ($70,8 \pm 3,88 \%$). Насіння F_4 після їхнього самозапилення отримали від 76 рослин з кількістю хромосом від 35 до 46. З паростками, одержаними з насіння F_4 та F_5 , працювали за такою самою схемою: насіння пророщували, кількість хромосом визначали у первинних корінцях, паростки яровизували і після яровизації вирощували у світловій кімнаті для самозапилення. Від рослин F_4 із задовільною фертильністю брали лише по 10 насінин F_5 . Для пророщування та визначення кількості хромосом насінини брали лише від тих рослин F_4 , в яких було виявлено від 40 до 43 хромосом. Рослини саме з такими числами можуть продукувати гексаплоїдних (42-хромосомних) нащадків, потенційно інтрогресивних. Тому розподіл хромосомних чисел серед паростків F_5 (табл. 2) вже не презентує загальний розмах варіювання за кількістю хромосом серед рослин (Авротіка \times Аврора) F_5 .

За Жировим [21], при створенні інтрогресивних ліній методом «змішування» хромосом третього субгеному у гібриді AABBDX, де X — геном егілопсу, в отриманих лініях цілі хромосоми егілопсу можуть замішувати хромосоми пшеничного субгеному D або додаватися до повного геному пшениці. Це відбувається за таким механізмом: теоретично в M1 мейозу МКП рослин F_1 з геномом AABBDX має бути 14 бівалентів і 14 унівалентів, якщо хромосоми геному D не кон'югують з гомеологічними хромосомами егілопсу. В анафазі для будь-якого унівалента існують три можливості: залишитися в цитоплазмі (за даними літератури [25] імовірність — 0,5), відійти до одного полюсу веретена поділу (імовірність складає 0,25) або відійти до іншого полюсу (0,25). В двох останніх випадках унівалент бере участь у створенні гамет, проте різних. Оптимальна умова формування гексаплоїдної зиготи — об'єднання 21-хромосомних гамет, але це досить малоімовірна подія, яка кількісно характеризується першим членом при розкритті

Таблиця 1. Самофертильність та розподіл кількості хромосом у паростках F_3 – F_4 від схрещування Авротіка \times Аврора

Покоління	Фертильність		Кількість паростків з певною кількістю хромосом														
	мін.	макс.	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	
F ₃	1,5	18	2	2	7	4	5	17	12	31	24	17	8	6	1	1	
F ₄	8,5	49,5	—	—	1	—	8	12	10	44	92	36	28	8	3	—	

Примітка. Фертильність визначено тут як кількість насінин, отриманих з обмолочених колосів для кожної рослини вказаного покоління.

Таблиця 2. Характеристика паростків F_5 за кількістю хромосом

Кількість хромосом	Рослини з певними хромосомними числами та особливостями каріотипу, шт.					
	Без особливостей	1 супутник	4 супутники	1 телоцентрик	2 телоцентрики	Всього рослин
40	39	1		3		43
41	69	1		2		72
42	42		1	11	2	56
43	7			2		9
44	1				1	2
						182

біному $(0,25 + 0,75)^7$, тобто 0,0000610352. Саме тому гібриди покоління F_1 з різними третіми субгеномами характеризуються, як правило, самостерильністю [18].

В $M1$ мейозу МКП гібрида AABBDT спостерігали збільшення кількості бівалентів порівняно з очікуваною 14, отже мейоз був більш упорядкованим та відбувалося формування насіння від самозапилення рослин F_1 . Коли створювали чужинно-заміщені лінії — похідні Авродесу (AABBSS) [24], збільшення в метафазі 1 мейозу МКП рослин покоління F_1 кількості бівалентів проти 14 можна було пояснити наявністю у гібриді F_1 AABBDSS геному S, який пригнічує дію гена *Ph1*, інгібітора кон'югації гомеологічних хромосом пшениці [26, 27] і, отже, сприяє кон'югації гомеологічних хромосом. Про геном T відомо, що при схрещуванні *Aegilops mutica* з видами, що несуть геном D, у гібридах F_1 хромосоми геному T кон'югують з хромосомами геному D майже регулярно [28, 29]. Саме цим слід пояснювати збільшення кількості бівалентів до 19 проти очікуваних 14 у гібридах між Авророю та Авротікою. Мультивалентів у МКП таких гібридів не спостерігали, отже нема підстав вважати, що геном T сприяє кон'югації негомолотичних хромосом. Можливо, що саме кон'югацією хромосом T та D в гібридах F_1 та F_2 від схрещування Аврора і Авротіка пояснюється відносно висока самофертильність гібридних рослин і значна кількість 42-хромосомних паростків у поколіннях F_3 та F_4 порівняно з кількістю таких нащадків, що спостерігалась при створенні інтрогресивних ліній з хромосомами від *Ae. sharonensis*, *Ae. speltoides*, *Ae. umbellulata* [18].

Для створення гексаплоїдних інтрогресивних ліній становлять інтерес лише рослини з такою кількістю хромосом, від яких у перспективі можна отримати 42-хромосомні еуплоїдні рослини. Тому визначення кількості хромосом у гібридах було важливим етапом отримання ліній. Розподіл кількостей хромосом у рослинах F_3 , що визначали у первинних корінцях паростків, був від 33 до 46 хромосом (табл. 1), хоча не всі рослини, що з них вирости, були життєздатними та фертильними: у рослинах F_4 — від 37 до 45 хромосом, у F_5 — від 40 до 44 хромосом з неухильним збільшенням кількості паростків, для яких встановлювали хро-

мосомні числа. Від рослин F_1 – F_3 брали для проростання всі утворені рослинами насіння, щоб не втратити потенційного розмаїття чужинних включень, за якими розрізнялися нащадки, починаючи з насіння F_2 гібридних рослин F_1 . Починаючи з покоління F_4 , для яровизації та вирощування добирали паростки з кількістю хромосом, не меншою 40, найбільш перспективних для створення гексаплоїдних ліній. Рослина, що має 40 хромосом, може бути подвійним моносоміком, який є потенційним засновником двох різних чужинно-заміщених ліній, якщо така рослина буде життєздатною та самофертильною.

Загалом розмах варіювання за кількістю хромосом у поколінні F_5 був 40–44 хромосоми, сім рослин серед них були такими, що дали тільки 42-хромосомних нащадків. Рослини з кількістю хромосом більше 42 залишали для подальшого самозапилення як цінне джерело множинних чужинних заміщень.

Процес формування гібридних геномів не обмежується лише комбінуванням хромосом двох різних геномів. Він може супроводжуватися також міжхромосомними та внутрішньохромосомними перебудовами. Це припущення частково засвідчується вже простим спостереженням метафазних пластинок: зустрічаються паростки, хромосомний набір яких включає телоцентрики, дицентричні та демінутивні хромосоми, зміну кількості супутникових хромосом проти очікуваної на підставі каріотипів Аврори та Авротіки (рис. 2).

Під час створення інтрогресивних ліній *Triticum aestivum/Aegilops mutica*, крім контролю кількості хромосом, важливо перевірити наявність чужинного генетичного матеріалу у геномах цих рослин. Першим доказом наявності чужинного генетичного матеріалу у складі геному лінії інтрогресивного походження можуть бути результати оцінки ліній за ознаками морфології сформованої рослини.

Порівняльне вивчення сорту Аврора та геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка показало, що вони відрізняються за кількома ознаками морфології колосу та вегетативної частини рослини, а також за стійкістю до борошністої роси та зимостійкістю. Різним проявам ознаки (градаціям) були привласнені для зручності опису ліній номери, причому града-

ція «1» за будь-якою ознакою характеризувала сорт Аврора, градація «2» — Авротіку. Серед ліній було виявлено інші градації, яких не було в жодного з компонентів схрещування при створенні гібридів F_1 (табл. 3).

Оцінку рослин за ознаками морфології виконували у всіх поколіннях, що розщеплювались, починаючи з F_2 . Було задіяно ті ознаки морфології колосу та вегетативної частини, за якими відрізняються компоненти схрещування, Аврора та Авротіка. За такими ознаками серед розмаїття гібридних нащадків було зареєстровано від двох до шести градацій. Градаціям було привласнено порядкові номери, які використовували для опису рослин, (табл. 3):

- опушення вегетативної частини рослини: без опушення (1), опушені вушка (2), опушені вушка та край основи листка (3), опушені вушка, край основи листка та край листової піхви (4), опушені вушка, край основи листка та листовка пластинка (5), опушені вушка та край основи листка, край листової піхви та листовка пластинка (6);

- остистість: колос безостий (1), остистий (2), напівостистий (3), остеоподібні відростки (4), розвинена ость на апікальному колоску безостого колосу (5);

- форма та щільність колосу: веретеновидний (1), спельтоїдний (2);

- воскова осуга: вся рослина покрита восковою осугою (1), вся рослина позбавлена воскової осуги (2), вегетативна частина з восковою осугою, колос без воскової осуги (3);

- колір зрілого колосу: червоний (1), світло-коричневий (2), темно-коричневий (3), чорний (4);

- опушення луски: відсутнє (1), густе рівномірне (2), густе нерівномірне, коли на найбільш опуклій частини опушення більш слабке геть до відсутності трихом (3), зріджене рівномірне (4), зріджене нерівномірне (5), щетинисте рівномірне (6), щетинисте нерівномірне (7), трихоми лише на кілю та центральній жилці луски;

- форма плеча: пряме (1), вузьке (2), скошене (3), виімчасте (4), відсутнє (5);

- форма луски: овальна (1), видовжена (2);

- удавленість у основі луски: у наявності (1), відсутня (2), стан проміжний, важкий для визначення (3);

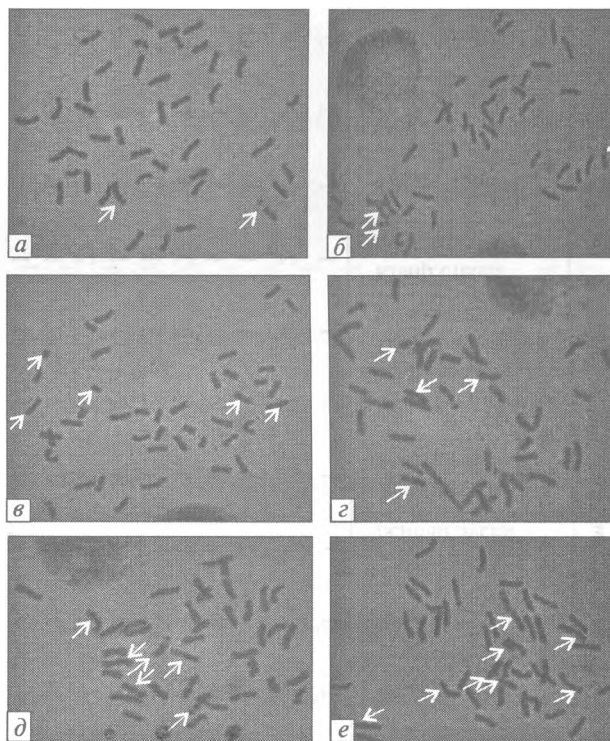


Рис. 2. Метафазні пластинки у клітинах корінців паростків покоління F_4 : а — каріотип Аврори, 42 хромосоми, з них дві зі супутниками; б — 42 хромосоми, 3 супутникові, одна з яких телоцентрична; в — 42 хромосоми, дві з яких нетипово маленькі (демінітивні?), дицентрик, три супутникові, дві з яких не схожі на супутникові хромосоми каріотипу Аврори; г — 42 хромосоми, серед них один телоцентрик, три дицентрики; д — 40 хромосом, з них два дицентрики, чотири супутникові; е — 44 хромосоми, один телоцентрик, чотири дицентрики, три супутникові

- ламкість колосового стрижня: неламкий (1), ламкий (2);

- жорсткість луски: м'яка (1), жорстка (2), дуже жорстка (3);

- рівномірність забарвлення луски: нерівномірне, коли на найбільш опуклій частини луски пігментація послаблюється (1), пігмент на лусці розподілений рівномірно (2);

- колір стебла під колосом: солом'яно-жовтий (1), фіолетовий (2);

- колір зернівки: червоний (1), темно-червоний (2), зеленуватий (3), зелений (4);

- стійкість до борошнистої роси: рослина сприйнятлива (1), рослина стійка (2).

Таблиця 3. Характеристика рослин (Авротіка × Аврора) F₄ за ознаками

Рослини			Кількість хромосом		Опушення зеленої рослини	Остистість	Форма та щільність колосу	Воскова осуга	Колір стиглого колосу
F ₂	F ₃	F ₄	F ₄	F ₅					
Аврора					1	1	1	1	1
Авротіка					2	2	2	2	2
18	3.1	1.7*	42	41–42	3	1	1	1	1
50	5.2	8.1*	42	41–42	3	1	2	2	1
		8.2	41	41	4	1	1	2	2
		8.3*	41	40–41	3	1	2	2	1
		8.7	42	42	4	1	1	2	1
		10.4	41	—	1	1	1	1	1
57	10.4	13.4*	41	—	1	1	1	1	1
66	11.2	14.3	41	42	2	1	2	1	4
		14.4*	43	41–42	1	1	1	1	1
		15.2*	42	42	1	1	1	1	1
65	12.1	15.3	41	40–41	1	1	1	1	1
		12.4	41	41–42	1	1	1	1	2
		16.5	40	41	1	1	1	1	1
		12.6	41	41–42	1	1	1	1	1
		13.3	41	41–42	6	4	1	2	1
67	13.3	21.4	42	41–43	6	4	1	2	1
		21.5*	41	41–42	2	2	1	2	1
		13.5	41	40–42	2	4	1	2	1
		23.2*	42	40–42	2	3	1	2	1
		13.6	41	41–42	6	4	1	2	1
	13.6	24.1*	41	41–42	6	4	1	2	1
		24.2	42	42	3	1	1	2	1
		24.3*	43	41–42	4	4	1	3	1
		24.4	41	42	3	4	1	3	1
		24.5*	41	40–41	2	3	1	2	1
13.8	13.8	26.1*	41	41–42	3	1	1	3	1
		26.2*	41	41–42	3	1	1	3	1
	13.10	29.1*	42	42	4	5	1	3	1
		29.3	42	42	2	4	1	3	1
		29.5*	42	40–42	2	1	1	3	1

з поліморфним виразом у Аврори та Авротіки

Опушення луски	Форма плеча	Форма луски	Удавленість основи луски	Ламкість коло- сового стрижня	Жорсткість луски	Рівномірність за- барвлення луски	Колір стебла під колосом	Колір зернівки	Стійкість до бо- рошністої роси	Фертильність
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
1	2	2	2	1(2)	2	2	2	2	2	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0,6
1	4	2	2	1	2	2	1	3	2	0,8
1	4	2	2	1	2	2	2	3	2	0,9
1	4	2	2	1	3	2	1	3	2	0,6
1	2	2	2	1	2	1	1	3	2	0,2
1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	0,6
2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	0,1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0,7
1	4	1	2	1	2	2	1	1	2	0,7
1	4	1	2	1	2	2	1	1	2	0,5
1	4	1	2	1	1	2	1	1	2	0,6
1	4	1	2	1	1	2	1	1	2	0,4
1	4	1	2	1	1	2	1	1	2	0,7
1	4	1	2	1	2	2	1	3	2	0,9
1	4	1	2	1	2	2	1	3	2	1,2
1	4	1	1	1	2	2	1	3	2	1,2
1	4	1	2	1	2	2	1	2	2	1,2
1	4	1	1	1	2	2	1	1	2	1,3
1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	1
1	1	1	3	1	2	3	1	1	2	1,2
1	2	1	1	1	1	1	1	4	2	1,4
1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1,3
1	1	1	1	1	3	1	1	1	2	1,2
1	1	1	1	1	1	1	1	1,3	2	0,4
1	1	1	1	1	1	1	1	1,3	2	1,1
1	2	1	2	1	2	1	1	1,3	2	0,4
1	2	1	2	1	1	1	1	1,3	2	0,6
1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1,1

Т.С. Єфіменко, М.З. Антоноук, В.С. Мартиненко та ін.

Закінчення табл. 3

Рослини	Кількість хромосом		Опушення зелених рослин	Остистість	Форма та щільність колосу	Воскова осуга	Колір стиглого колосу	Опушення луски	Форма плеча	Форма луски	Удавленість основи луски	Ламкість колосового стрижня	Жорсткість луски	Рівномірність забарвлення луски	Колір стебла під колосом	Колір зернівки	Стійкість до борошнистої роси	Фертильність
	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₄	F ₅	F ₄	F ₅	F ₄	F ₅	F ₄	F ₅	F ₄	F ₅	F ₄	F ₅	F ₄	F ₅
			45.3	40	42	2	1	1	4	2	2	1	3	2	1	2	2	1,1
			45.4	42	42	2	2	1	4	2	2	1	3	2	1	1,2	2	0,5
			45.5*	42	41-42	1	1	1	4	2	2	1	2	1	1	1	2	0,6
	17.7		46.3*	41	42	1	2	1	1	1	2	1	3	2	1	2	2	1,3
			46.4*	42	41-42	1	1	1	1	1	2	1	3	2	1	2	2	1,5
			46.5	42	42	2	2	1	4	2	2	1	3	2	1	2	2	1,3
	17.8		47.4*	42	42	1	1	1	4	1	1	1	1	2	1	2	2	0,9
			47.5	42	42	1	2	1	1	1	2	1	2	2	1	1	2	1,4

Примітка. Градація «1» для кожної з ознак, наведених у шапці таблиці, відповідає фенотипу Аврори, опис всіх інших градацій наведено у тексті. Фертильність визначали як кількість зерен на один колосок колосу. * ДНК рослин F₄ вивчено через дот-блот гібридизацію (рис. 4).

У табл. 3 наведено результати оцінки рослин F₄, приклади морфотипів наведено на рис. 3. Оскільки саме з цього покоління для самозапилення відбирали лише рослини, нащадки яких протягом одного-двох поколінь досягнуть кількості хромосом 42, рослинам цього покоління привласнили номери та дали морфологічний опис. З табл. 3 видно, що все розмаїття рослин, які в перспективі є джерелом цитологічно стабільних 42-хромосомних ліній, походить всього лише з 9 рослин F₂ з ініціальної кількості 41 рослина F₂, що перезимували у полі та дали насіння F₃. Серед них рослини № 58 та 59 оцінювались за стійкістю до борошнистої роси балом 7, решта — балом 9. Саме тому у табл. 3 всі лінії оцінюються градацією 2 як такою, що притаманна Авротіці, а не Аврорі. Спеціального добору стійких рослин не здійснювали, хоча можна вказати, що серед 98 рослин із загальної кількості 219 таких, що перезимували та досягли стадії колосіння, на якій визначали стійкість, балом 7-9 було оцінено 88 рослин, решта — балом 6-5 (сприйнятливі). Від сприйнятливих рослин не було отримано нащадків F₃ або через самостерильність таких рослин, або через знижену життєздатність паростків, якщо насіння F₃ все ж було отримано.

З табл. 3 видно, що серед наявного розмаїття рослин F₄ не було таких, які хоча б за двома ознаками не відрізнялись від Аврори. Серед ознак, за якими більшість ліній була схожа не з Авророю, а з Авротікою, виявлено опушення зеленої рослини, відсутність воскової осуги на колосі та вегетативних частинах рослини, форма луски та пов'язана з нею форма плеча, відсутність удавленості в нижній частині луски та пов'язане з цим рівномірне забарвлення луски, без більш світлої найбільш опуклої її частини, колір зрілої зернівки. За такими ознаками, як форма та щільність колосу та жорсткість колоскової луски, частки ліній, подібні чи до Аврори, чи до Авротіки, приблизно однакові. За кольором соломини під колосом переважна більшість ліній були схожі з Авророю. Очевидно, частота нащадків F₄ з певними ознаками Авротіки прямо залежить від кількості нащадків F₃-F₄, які пішли від конкретної рослини F₂. Так, від рослин F₂ № 18 та 57 утворилось по одному нащадку F₄, а від рослин



Аврора Авротіка 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Рис. 3. Зріле колосся Аврори, Авротіки та деяких ліній (1–11)

№ 58 та 67 — відповідно 27 та 15 нащадків. Звичайно ознаки, притаманні останнім рослинам F_2 , будуть розповсюджені серед рослин F_4 та наступних поколінь інтрогресивних ліній.

Лінії за ознаками ламкості колоскового стрижня, опушення луски, забарвлення зрілої луски та зернівки демонстрували градації, не властиві жодній з батьківських форм. Так, ні Аврора, ні Авротіка не мають опушення на лусках чи темно забарвлених лусок, чи зеленого кольору насінини, а серед ліній такі з'явилися. Диплоїдний егілопс, донор геному Т Авротіки, також має світлі луски і насіння, не забарвлені у зелений колір. Щодо ламкості колоскового стрижня Авротіка не була ламкою у першій генерації після свого створення. Після певної кількості генерацій зрілий колос амфідиплоїда став відламуватися від соломини при легкому натисканні, тобто з'явилася ламкість в одній точці, характерна для деяких дикорослих родичів пшениці. Пізніше дедалі частіше почав реєструватися факт розсіпання колосу Авротіки на окремі колоски при його дозріванні, тому у табл. 3 Авротіка за цієї ознакою має подвійну характеристику.

Результати оцінки ліній, наведені у табл. 3, дають змогу припустити, що вони є носіями частки генетичного матеріалу егілопсу, чим і пояснюється наявність у описаних ліній гра-

дацій ознак, не властивих сорту м'якої пшениці Аврора. Для первинної швидкої оцінки рослин покоління F_4 на наявність в їхньому геномі генетичного матеріалу *Aegilops mutica* тотальну ДНК, виділену з окремих рослин F_4 , було використано для дот-блот гібридизації.

Метод дот-блот ґрунтується на гібридизації гомологічних послідовностей ДНК, використовується для аналізу геномів [30] і може бути корисним для виявлення інтрогресій в геномі [31, 32]. На рис. 4 представлені результати дот-блоту. Крапки в крайньому лівому стовпчику представляють ДНК Аврори та Авротіки. Аврора, як видно на рис. 4, не має сигналу гібридизації (відсутній фіолетовий колір), оскільки у Аврори відсутній генетичний матеріал від *Ae. mutica* (негативний контроль). Авротіка має геном Т від *Ae. mutica*, і для неї у наявності сигнал гібридизації (позитивний контроль).

Інші крапки на рис. 4 показують місця на мембрані, де була нанесена ДНК рослин F_4 (знизу підписано номер лінії). Майже всюди в наявності сигнал гібридизації (фіолетове забарвлення). Не дали позитивного сигналу ДНК лише лінії 1.3, 8.1, 30.1 та 80.2. З них за морфологією було оцінено лише лінію 8.1, і вона відрізнялась від Аврори за кількома ознаками. Отже, майже всі рослини покоління F_4 містять у своєму геномі інтрогресії, що походять з геному

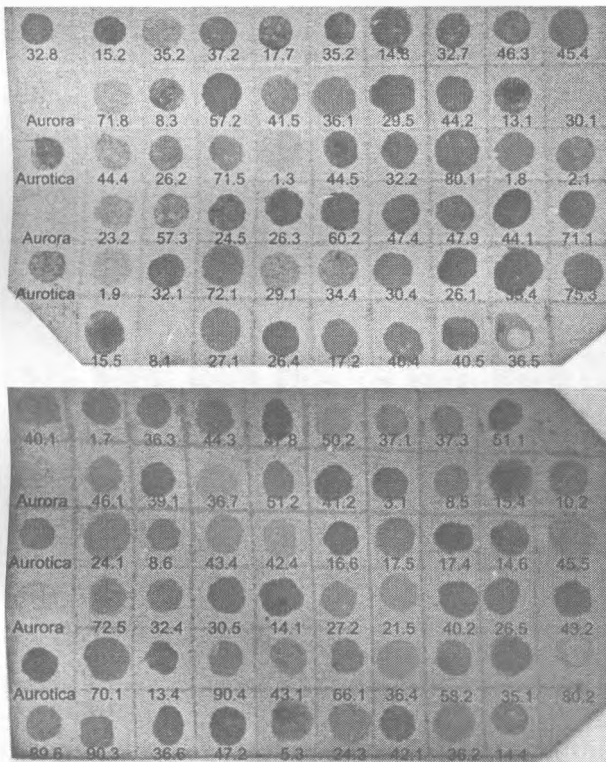


Рис. 4. Дот-блот з ДНК гібридних рослин покоління F_4 від схрещування Аврора і Авротіка з використанням як зонда геномної ДНК *Aegilops mutica*

Т *Aegilops mutica*. Це скоріш за все пояснюється дуже вузьким горлечком, крізь яке пройшли нащадки від схрещування Авротіка × Аврора: із загальної кількості утворених під ізоляторами насінин F_2 нащадків F_4 з інтрогресіями виділено лише 9 з 515.

Висновки. Отримано гексаплоїдні лінії F_4 – F_5 пшеничного типу від схрещування озимого сорту м'якої пшениці Аврора з геномно-замішеним амфідиплоїдом Авротіка, геном якого містить тетраплоїдний компонент AABB сорту Аврора та геном TT диплоїдного родича пшениці *Aegilops mutica*. Лінії беруть початок від дев'яти самофертильних рослин F_2 та є стійкими до борошнистої роси. За ознаками морфології колосу та вегетативної частини рослин кожна з них відрізняється від сорту Аврора та за деякими з них демонструє подібність до амфідиплоїда Авротіка або виявляє градації ознак, які не були властивими жодному з компонентів схрещування. За даними дот-блот гібридизації із перевірених 108 рослин різних лі-

ній лише чотири не дали позитивного сигналу на наявність чужинної ДНК у геномі.

INTROGRESSIONS FROM *AEGILOPS MUTICA* INTO THE COMMON WHEAT GENOME

T.S. Iefimenko, M.Z. Antonyuk,
V.S. Martynenko, A.G. Navalihina, T.K. Ternovska

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

Introgression of genetic material from wild relatives to the genome of common wheat is relevant because it is a natural and inexhaustible source for the enrichment of the wheat gene pool with genes improving its adaptive potential. Hexaploid F_5 lines of wheat type were developed by crossing common wheat Aurora (AABBDD) to genome substitution amphidiploid Aurotica (AABBTT), which carries diploid genome TT from wheat relative *Aegilops mutica* instead of common wheat DD subgenome. F_1 – F_3 hybrids revealed limited self-fertility, which increased significantly in some plants of F_4 – F_5 generations. During introgressive lines development cytological control of chromosome number was conducted for all generations, and observed chromosome numbers which varied from 33 to 46, and stabilized for most progenies at 42 chromosomes in F_4 generation by selection of 40–44 chromosome plants in each generation. Introgression F_4 lines originated from nine self-fertile plants of F_2 generation; these lines differ from Aurora for some morphological traits, and carry alien DNA in their genomes, which was demonstrated by dot-blot hybridization with *Aegilops mutica* genome DNA as probe.

ВОВЛЕЧЕНИЕ ИНТРОГРЕССИЙ ОТ *AEGILOPS MUTICA* В ГЕНОМ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Т.С. Ефименко, М.З. Антонюк,
В.С. Мартыненко, А.Г. Навалихина, Т.К. Терновская

Интрогрессия генетического материала от дикорастущих сородичей в геном мягкой пшеницы остается актуальной, так как является естественным неиссякаемым источником обогащения генофонда пшеницы генами, которые улучшают ее адаптивный потенциал. Гексаплоидные линии F_5 пшеничного типа созданы методом гибридизации между мягкой пшеницей Аврора (AABBDD) и геномно-замещенным амфидиплоидом Авротика (AABBTT), который включает в состав своего гексаплоидного генома диплоидный геном TT сородича пшеницы *Aegilops mutica* вместо субгенома DD мягкой пшеницы. Гибриды F_1 – F_3 выявили ограниченную самофертильность, существенно возросшую для некоторых производных в F_4 – F_5 . Во всех генерациях создание линий сопровождалось цитологическим конт-

ролем количества хромосом, которое колебалось в целом по генерациям от 33 до 46 и стабилизировалось для большинства потомков на 42 хромосомах в F₄ при условии отбора в каждой генерации растений с числом хромосом 40–44. Интрогрессивные линии F₄ берут начало от девяти самофертильных растений F₂, отличаются от Авроры некоторыми признаками морфологии растений и демонстрируют наличие в геноме чужеродной ДНК по результатам дот-блот гибридизации с геномной ДНК *Aegilops mutica* в качестве зонда.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Bedő, Z., Lång, L., Wheat breeding: current status and bottlenecks, *Alien Introgression in Wheat. Cytogenetics, Molecular Biology, and Genomics*, Molnár-Lång, M., Ceoloni, C., and Doležel, J., Eds, Springer, 2015, chapter 3, pp. 77–101.
- Mujeeb-Kazi, A., Kazi, A.G., Dundas, I., Rasheed, A., Ogonnaya, F., Kishii, M., Bonnett, D., Wang, R.R.C., Xu, S., Chen, P., Mahmood, T., Bux, H., and Farrakh, S., Genetic diversity for wheat improvement as a conduit to food security, *Advances in Agronomy*, Sparks, D.L., Ed., Elsevier, 2013, vol. 122, pp. 179–258.
- Ceoloni, C., Kuzmanovic, L., Forte, P., Virili, M.E., and Bitti, A., Wheat-perennial Triticeae introgressions: major achievements and prospects, *Alien Introgression in Wheat. Cytogenetics, Molecular Biology, and Genomics*, Molnár-Lång, M., Ceoloni, C., and Doležel, J., Eds, Springer, 2015, chapter 11, pp. 179–257.
- Gill, B.S., Friebe, B., Raupp, W.J., Wilson, D.L., Cox, T.S., Sears, R.G., Brown-Guedira, G.L., and Fritz, A.K., Wheat Genetic Resource Center: The first 25 years, *Advances in Agronomy*, 2006, vol. 89, pp. 73–136.
- Ogonnaya, F.C., Abdalla, O.S., Mujeeb-Kazi, A., Kazi, A.G., Xu, S.S., Gosman, N., Lagudah, E.S., Bonnett, D.G., Sorrells, M.E., and Tsujimoto, H., Synthetic hexaploids: harnessing species of primary gene pool for wheat improvement, *Plant Breed. Rev.*, 2013, vol. 37, pp. 35–122.
- Liu, W.X., Jin, Y., Rouse, M., Friebe, B., Gill, B.S., and Pumphrey, M.O., Development and characterization of wheat – *Ae. searsii* Robertsonian translocations and a recombinant chromosome conferring resistance to stem rust, *Theor. Appl. Genet.*, 2011, vol. 122, no. 8, pp. 1537–1545.
- Liu, W., Rouse, M., Friebe, B., Jin, Y., Gill, B.S., and Pumphrey, M.O., 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, vol. 19, no. 5, pp. 669–682.
- Kuraparthi, V., Chhuneja, P., Dhaliwal, H.S., Kaur, S., Bowden, R.L., and Gill, B.S., 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, vol. 114, no. 8, pp. 1379–1389.
- Mago, R., Verlin, D., Zhang, P., Bansal, U., Bariana, H., Jin, Y., Ellis, J., Hoxha, S., and Dundas, I., Development of wheat-*Aegilops speltoides* recombinants and simple PCR-based markers for *Sr32* and new stem rust resistance genes on the 2S#1 chromosome, *Theor. Appl. Genet.*, 2013, vol. 126, no. 12, pp. 2943–2955.
- Friebe, B., Jiang, J., Raupp, W.J., McIntosh, R.A., and Gill, B.S., Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status, *Euphytica*, 1996, vol. 91, pp. 59–87.
- Tang, S., Li, Z., Jia, X., and Larkin, P.J., Genomic in situ hybridization (GISH) analyses of *Thinopyrum intermedium*, its partial amphiploid Zhong 5, and disease-resistant derivatives in wheat, *Theor. Appl. Genet.*, 2000, vol. 100, no. 3–4, pp. 344–352.
- Han, F., Liu, B., Fedak, F., and Liu, Z., 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, vol. 109, no. 5, pp. 1070–1076.
- Sharp, P.J., Chao, S., Desai, S., and Gale, M.D., The isolation, characterization and application in the Triticeae of a set of wheat RFLP probes identifying each homoeologous chromosome arm, *Theor. Appl. Genet.*, 1989, vol. 78, no. 3, pp. 342–348.
- Chen, Q., Lu, Y.L., Jahier, J., and 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, vol. 89, no. 1, pp. 70–75.
- Wang, R.C., Larson, S.R., and Jensen, K.B., Analysis of *Thinopyrum bessarabicum*, *T. elongatum*, and *T. junceum* chromosomes using EST-SSR markers, *Genome*, 2010, vol. 53, no. 12, pp. 1083–1089.
- Kilian, B., Mammen, K., Millet, E., Sharma, R., Graner, A., Salamini, F., Hammer, K., and Ozkan, H., *Aegilops*, *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. Cereals, Kole, Ch., Ed., Springer, 2013, pp. 1–76.
- Dundas, I., Verlin, D., and Islam, R., Chromosomal locations of stem and leaf rust resistance genes from *Ae. caudata*, *Ae. searsii* and *Ae. mutica*, BGRI Workshop, 17–20 Sept. 2015, Sydney, <http://www.globalrust.org/sites/default/files/posters/dundas.pdf>
- Zhirov, E.G., *Wheat Genomes and Their Constitution*, Diss. doctor biol. sci., Krasnodar, 1989 [in Russian].

19. Iefimenko, T.S., Fedak, Yu.G., Antonyuk, M.Z., and Ternovska, T.K., Microsatellite analysis of chromosomes from the fifth homoeologous group in the introgressive *Triticum aestivum*/*Amblyopyrum muticum* wheat lines, *Cytol. Genet.*, 2014, vol. 48, no. 6, pp. 189–197.
20. Yang, Y., Sornaraj, P., Borisjuk, N., Kovalchuk, N., and Haefele, S.M., Transcriptional network involved in drought response and adaptation in cereals, *Abiotic and Biotic Stress in Plants Recent Advances and Future Perspectives*, Shanker, A.K., Shanker Ch., Eds., Publ. ExLi4EvA, 2016, chapter 1, pp. 3–29.
21. Zhirov, E.G., Ternovskaya, T.K., Genome engineering in wheat, *Vestnik S.-kh. Nauk*, 1984, vol. 10, p. 58–66 [in Russian].
22. Waninge, J., A modified method of counting chromosomes in root tip cells of wheat, *Euphytica*, 1965, vol. 14, no. 3, pp. 249–250.
23. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., Molecular cloning: A laboratory manual, New York, Cold Spring Harbor laboratory press, 1989, 545 p.
24. Zhirov, E.G., Ternovskaya, T.K., and Bessarab, K.S., Investigation on wheat cytogenetics at Krasnodar Lukyanenko Research Institute of Agriculture, *EWAC Newsletter*, Plant Breeding Inst., Cambridge, 1986, pp. 48–52.
25. Kihara, H., *Wheat studies. Retrospect and prospects*, Elsevier, 1982, 308 p.
26. Dvořák, J., Genetic variability in *Aegilops speltoides* affecting homoeologous pairing in wheat, *Can. J. Genet. Cytol.*, 1972, vol. 14, no. 2, pp. 371–380.
27. Maestra, B., Naranjo, T., Homoeologous relationships of *Aegilops speltoides* chromosomes to bread wheat, *Theor. Appl. Genet.*, 1998, vol. 97, no. 1–2, pp. 181–186.
28. Jones, J.K., Majisu, B.N., The homoeology of *Aegilops mutica* chromosomes, *Can. J. Genet. Cytol.*, 1968, vol. 10, no. 3, pp. 620–626.
29. Ohta, S., Phylogenetic relationship of *Aegilops mutica* Boiss. with the diploid species of congeneric *Aegilops-Triticum* complex, based on the new method of genome analysis using its B-chromosomes, *Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ.*, 1991, no. 137, pp. 1–116.
30. Shirasawa, K., Shiokai, S., Yamaguchi, M., Kishitani, S., and Nishio, T., Dot-blot-SNP analysis for practical plant breeding and cultivar identification in rice, *Theor. Appl. Genet.*, 2006, vol. 113, no. 1, pp. 147–155.
31. Rey, M.-D., Prieto, P., Detection of alien genetic introgressions in bread wheat using dot-blot genomic hybridization, *Mol. Breed.*, 2017, vol. 37, no. 3, pp. 32.
32. Besse, P., McIntyre, C.L., Burner, D.M., and Almeida, C.G., Using genomic slot dot hybridization to assess intergeneric *Saccharum* × *Erianthus* hybrids (Andropogoneae–Saccharinae), *Genome*, 1997, vol. 40, no. 4, pp. 428–432.

Надійшла 22.06.17