

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ «КИЄВО-МОГИЛЯНСЬКА
АКАДЕМІЯ»
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Шпильчин Віталій Віталійович

УДК 631.523:581

ДИСЕРТАЦІЯ

ЗМІНА ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА w^I У ПОКОЛІННЯХ АМФІДИПЛОЇДІВ
TRITICINAE

03.00.15. «Генетика»

біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
(доктора філософії)

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

Шпильчин В.В.

Науковий керівник: **Терновська Тамара Костянтинівна**, доктор біологічних наук, професор

Київ – 2018

АНОТАЦІЯ

Шпильчин В.В. Зміна експресії гена W^I в поколіннях амфідиплоїдів *Triticinae*. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.15 «Генетика».

Місце виконання роботи: Національний університет «Києво-Могилянська академія», Міністерство освіти і науки України.

Захист відбудеться у спеціалізованій вченій раді К 26.202.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України, Київ, 2018.

Дисертаційне дослідження присвячене виявленню причини перманентної зміни прояву ознаки наявність/відсутність воскової осуги у пшеничних амфідиплоїдів, інтрогресивних ліній та гібридів, що від них походять.

Мінливість за описаною ознакою спостерігається серед штучних гексаплоїдів у геномно-заміщених, геномно-доданих та інтрогресивних лініях, створених на основі геномно-заміщених гексаплоїдів. Мінливість за своєю суттю є нелегітимною, оскільки виявлялась серед популяцій теоретично гомозиготних рослин перманентною – рослини з восковою осугою неочікувано з'являються постійно в кожній наступній генерації, та незворотною, оскільки рослини зі зміненим фенотипом в наступних поколіннях ніколи не поверталися до вихідного фенотипу. Неочікувана мінливість за даною ознакою є наслідком процесів, які відбуваються в природних та штучних амфідиплоїдах під час формування їхніх геномів.

Генетичний контроль прояву даної ознаки здійснюється серією ортологічних генів-промоторів ($W1$, $W2$, Ws) та інгібіторів ($Iw1$, $Iw2$, $Iw3$). Локуси Iw є епістатичними інгібіторами локусів W , що проявляється в запобіганні накопичення бета-дикетонів на поверхні рослин і, як результат, відсутності воскової осуги.

Особливості успадкування ознаки вивчалися на геномно-заміщених лініях Авродес (AABBSS), Аврозис (AABBS^{shSh}), Авролата (AABB^{UU}) та

Авротіка (AABVTT) та геномно-доданих амфідиплоїдах Міоза (AABVMM) та МІТ (AABVDD). Хоча наявність воскової осуги є рецесивною ознакою, в F₁ від схрещування контрастних батьківських форм часто з'являлись рослини з восковою осугою або такі, що мали третій фенотип – зелений колос, листя вкриті восковою осугою. Враховуючи схему походження рослинного матеріалу, причиною цього слід вважати певну зміну в геномі до моменту утворення гібриду, а також те, що рослини з домінантним фенотипом є гетерозиготами за домінантним алелем. Результати оцінки гібридів від схрещування контрастних амфідиплоїдів Авротіка та геномно-доданого амфідиплоїда Міоза не додали розуміння ситуації. Хоча гібриди F₁ для деяких комбінацій мали очікуваний фенотип, але у F₂ спостерігався надлишок рецесивних фенотипів.

Наявний рослинний матеріал був проаналізований за допомогою білкових маркерів. Спектри контрастних за восковою осугою рослин виявилися мономорфними за глютенінами, альфа-амілазою, бета-амілазою та гліадинами. Виключенням стали контрастні зразки Авротіки, які виявилися поліморфними в ω -зоні гліадинів. Продукти даної зони контролюються генами, розташованими на хромосомах першої гомеологічної групи.

Був проведений мікросателітний аналіз з застосуванням праймерів до мікросателітних локусів, специфічних до 2D хромосоми, щоб з'ясувати наявність зміни експресії гена, який розташований на хромосомах другої гомеологічної групи третього субгеному відповідних штучних гексаплоїдів. Для ліній похідних геномно-заміщених форм вдалося ідентифікувати продукти ампліфікації у денатуруючих умовах для трьох локусів: *Xcfd51*, *Xcfd56* та *Xbarc159*. Аналіз показав, що спектр ампліфікації ДНК ліній-похідних Арозису з восковою осугою збігається зі спектром Аврори за трьома мікросателітними локусами, спектр похідних Авролати без воскової осуги збігається зі спектром відповідного амфідиплоїда, що також осуги не має. Щодо спектрів продуктів ампліфікації Авродеса – результати були отримані неоднозначні, що може бути пояснено рекомбінантною структурою відповідної хромосоми. Як і очікувалося, спектри ліній з фенотипом зелений колос, листя і стебло вкриті

восковою осугою не виявили подібності до спектрів Аврори чи Авродеса за трьома локусами. Це пояснюється тим, що у контролі такого фенотипу бере участь ген *Iw3*, локалізований на хромосомі 1В, а використані локуси специфічні до хромосом 2-ої групи.

Застосування мікросателітного аналізу щодо контрастних форм Авротіки і геномно-доданого амфідиплоїда Міоза показало різницю для локусів, локалізованих як на короткому плечі 2D хромосоми так і на обох плечах хромосоми 2В контрастних за ознакою інтересу рослин Міози.

Для проведення генетичного аналізу Авротіки були залучені 5 контрастних за ознакою інтересу зразків амфідиплоїда: Авротіка 1 (без воскової осуги), Авротіка 1 (зелений колос, листя та стебло з восковою осугою), Авротіка 2 (без воскової осуги), Авротіка 2 (зелений колос, листя та стебло з восковою осугою) та Авротіка 2 (з восковою осугою). На підставі наших знань щодо походження амфідиплоїда і генетичного контролю даної ознаки були запропоновані гаплотипи за генами інтересу. Вихідний амфідиплоїд (без воскової осуги) мав такий гаплотип: *iw3(1B) W1(2B) iw1(2B) Iw2(2T) Iw3(1T)*. Зелено-блакитна форма, яка відрізняється від вихідного за одним геном: *iw3(1B) W1 (2B)iw1(2B) iw2(2T) Iw3(1T)*, гаплотип форми з восковою осугою – *iw3(1B) W1(2B) iw1(2B) iw2(2T) iw3(1T)* – різниця у двох генах.

Популяція, що розщеплюється за ознакою інтересу [Авротіка 1(зелена) х Авротіка 2(блакитна)]F₂, була піддана мікросателітному аналізу з застосуванням праймерів до коротких плечей 2В та 2D хромосом. П'ять локусів (два до 2В, та 3 до 2D хромосом) виявилися поліморфними і селективно-нейтральними і були перевірені щодо їхнього зв'язку з ознакою інтересу. Локуси *Xgwm429* та *Xbarc167* знаходяться поруч з генами *W1* та *Iw1*, проте, за запропонованими нами гаплотипами, розщеплення за даними генами не спостерігається і зв'язку між ними не було виявлено. Локуси *Xgwm702*, *Xgwm102* і *Xbarc 142*, специфічні до хромосоми 2В пшениці, ампліфікуються за наявністю ДНК Авротіки, отже є специфічними до хромосоми 2Т. Успадковуються незалежно від локусів, розташованих на 2В хромосомі. Для

локуса *Xgwm702* була показана відсутність незалежного успадкування щодо гена *Iw2(T)*, отже даний локус і ген можуть бути зчеплені у хромосомі 2Т.

Контрастні за восковою осугою гібридні рослини були проаналізовані за допомогою маркерних систем IRAP та REMAP. З IRAP-праймерами пари *Nikita/Nikita* були отримані поліморфні продукти для зразків Авротіка 1 без воскової осуги та Авротіка 2 з восковою осугою. Пара *Sukkula/Sukkula* давала поліморфні продукти з ДНК контрастних морфотипів Міози. Майже в усіх випадках спектри амфідиплоїдів відрізнялися від спектрів Аврори.

Для більш специфічного аналізу контрастних форм (Авротіка 2 блакитна та деякі лінії F4) + (Авротіка 1 зелена та деякі лінії F4) був застосований метод REMAP у модифікованому варіанті, коли одним з праймерів виступав специфічний мікросателітний локус. Були обрані локуси *Xgwm102*, *Xbarc142* та *Xgwm702*. В ході аналізу було перевірено 20 комбінацій REMAP праймерів, з 15 були отримані продукти ампліфікації. Загалом порівняно зі спектрами, отриманими в результаті ампліфікації з IRAP праймерами, кількість продуктів розділення значно зменшилася. Зменшилася також кількість продуктів, отриманих з ДНК батьківських форм. Майже всі комбінації продукували мономорфні продукти, окрім комбінації *Xgwm702F/REMAPCAn*. Ампліфікація з даною парою праймерів продукувала додатковий компонент спектру ДНК гібридних ліній, що мали воскову осугу. Оскільки за нашими даними локус *Xgwm702* є зчепленим з геном *Iw2(T)*, утворення поліморфних продуктів в комбінації з праймером до довгого термінального повтору ретротранспозону вказує на наявність перебудов, пов'язаних з активністю мобільних генетичних елементів поблизу даного гена та може бути причиною втрати домінантного стану гена *Iw2(T)*, що проявляється як перманентна зміна прояву ознаки наявність/відсутність воскової осуги у пшеничних амфідиплоїдів.

Наукова новизна. Вперше доведено факт перманентної та односпрямованої зміни прояву ознаки наявність/відсутність воскової осуги на пшеничних амфідиплоїдах, яка відбувається у всіх популяціях, генераційних та сегрегаційних, у штучних амфідиплоїдів пшениці та інтрогресивних лініях, що

від них походять. Вперше встановлено, що зміна рослиною пшениці фенотипу «зелений» на фенотип «зелено-блакитний» є наслідком мутації $Iw2 \rightarrow iw2$, а фенотипа «зелено-блакитний» на «блакитний» – наслідком мутації $Iw3 \rightarrow iw3$ за умов гомозиготного стану за рецесивним алелем гена $iw2$. Вперше показано, що молекулярним механізмом, який призводить до мутування домінантних алелів генів-інгібіторів воскової осуги до рецесивних, є рух ретротранспозонів; зокрема, такий рух зареєстрований на хромосомній ділянці, розташованій поряд з геном $Iw2(T)$ геному Авротіки. Вперше ідентифіковано ортологічні гени на хромосомах 2T *Ae. mutica* та 2M *Ae. comosa* (серія $Iw2$) та 1T (серія $Iw3$) *Ae. mutica*.

Практичне значення. Створено модель для молекулярно-генетичного дослідження, спрямованого на пошук зв'язку між зміною фенотипного виразу ознаки, що постійно відбувається у гомогенних за походженням популяціях штучних амфідиплоїдів пшениці та сегрегаційних популяціях їхніх гібридів, та генетичними змінами, які відбуваються у геномах, що мають гібридне походження. Сформульовано методичну рекомендацію для проведення гібридологічного аналізу рослинного матеріалу, коли до схрещувань залучаються представники, які демонструють перманентну фенотипну нестабільність: компоненти схрещування *a posteriori* мають бути перевірені на гомозиготність для гарантії гетерозиготного стану гібридів F_1 , генотипи рослин F_2 мають бути верифіковані на гомозиготність за домінантним алелем за фенотипами рослин F_3 . Модифіковано методику REMAP, в якій замість використання у якості другого праймера повторюваної послідовності мікросателіта, що забезпечує скринування поліморфізму за повним геномом (як у оригінальній методиці), використовується хромосома-специфічна фланкуюча послідовність SSR-локусу, чим забезпечується хромосомна специфічність наявного поліморфізму; запропонована модифікація перетворює поліморфні спектри на локус-специфічні, що потенційно робить метод REMAP високоспецифічним до певної хромосомної ділянки, зменшує кількість

компонентів у спектрі та збільшує роздільну здатність методу при аналізі спектрів ампліфікації.

Ключові слова: воскова осуга, геномно-заміщені амфідиплоїди, геномно-додані амфідиплоїди, мікростателітні локуси, IRAP, REMAP, мінливість.

SUMMARY

V.V. Shpylchyn. Changes in expression of the gene W^1 in the generations of *Triticinae* amphidiploids. – Manuscript.

A dissertation submitted to acquire the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 03.00.15 – genetics. – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2018.

The work on dissertation was conducted in the National University of “Kyiv-Mohyla Academy” Ministry of Education and Science of Ukraine.

The dissertation is devoted to the discovery of the phenomena of permanent change in a manifestation of a glaucousness trait in wheat amphidiploids, introgressive lines and hybrids derived from them. The variation for the trait is observed among artificial genome substituted, genome added hexaploids, and introgressive lines. Variation in its essence is illegitimate, as it was found among the populations of theoretically homozygous plants. It is permanent, because glaucous plants constantly appeared in each subsequent generation, and also irreversible, since plants with a changed phenotype in subsequent generations never returned to the original phenotype. Unexpected variation for this trait is the result of processes occurring in natural and artificial amphidiploids during the formation of their genomes.

The glaucousness trait is controlled by a series of orthologous promoters ($W1$, $W2$, Ws) and inhibitors ($Iw1$, $Iw2$, $Iw3$). Iw loci are an epistatic inhibitors of W loci, preventing the accumulation of beta-diketones on the plant surface and, which result in non-glaucous phenotype.

The inheritance of the trait were studied in the genome substitution lines Aurodes (AABBSS), Aurosis (AABBS^{sh}S^{sh}), Aurolata (AABB^{UU}) and Aurotica (AABB^{TT}) and genome addition amphidiploids Miosa (AABB^{MM}) and MIT (AABB^{DD}). Although glaucousness is a recessive trait, in F₁ from crossing of contrast parent forms, almost all plants were glaucous or had an another phenotype (non-glaucous spike and glaucous leaves). Considering the origin of the plant material, the reason for this is a certain change in the genome of parent plants before gametogenesis. It should also be taken in account that plants with a dominant phenotype could have been heterozygous. The results of hybrid analysis of contrast Aurotica amphidiploids and genome addition amphidiploids Miosa did not clarify the situation. Although some of F₁ plants had expected dominant phenotype, in F₂ an excess of plants with recessive phenotype were observed.

Studied plant material was analyzed using protein molecular markers. Electrophoretic spectra of glaucous and non-glaucous plants were monomorphic by glutenins, alpha-amylase, beta-amylase and gliadins. Only glaucous and non-glaucous Aurotica samples were polymorphic in the ω -zone of gliadins. The protein products of this zone are controlled by the genes located on the chromosomes of the first homeology group.

Microsatellite marker analysis with primers to loci specific to the 2D chromosome was performed to determine changes in the expression of a gene located on the chromosomes of the 2nd homeologous group from the 3rd subgenome of the corresponding artificial hexaploids. The amplification products in denaturing conditions were identified for introgression lines for three SSR loci: *Xcfd51*, *Xcfd56*, and *Xbarc159*. Microsatellite analysis showed that components for three SSR loci of glaucous introgression lines derived from Aurosis have electrophoretic mobility same as Aurora components. The PCR spectra of non-glaucous derivatives of Aurolata were identical to the spectra of the corresponding non-glaucous morphotypes. Regarding the electrophoretic spectra of Aurodes, the results were ambiguous, which could be explained by the recombinant structure of the chromosome with introgressions. As expected, electrophoretic spectra of the lines with an intermediate

phenotype were not similar to the spectra of Aurora or Aurodes for three SSR loci. This can be explained by the fact that changes in *Iw3* gene, located on chromosome 1B, cause appearance of glaucous phenotype, while SSR loci used in the analysis are specific to the chromosomes of the 2nd homeologous group.

The microsatellite analysis glaucous and non-glaucous Aurotica plants and genome addition amphidiploid Miosa showed a difference for loci located on a short arm of chromosome 2D and for the loci on a short and a long arms of chromosome 2B respectively.

For the genetic analysis of amphidiploid Aurotica, five contrast for glaucousness trait morphotypes were used: Aurotica 1 (non-glaucous), Aurotica 1 (glaucous leaves and non-glaucous spike, third phenotype), Aurotica 2 (non-glaucous), Aurotica 2 (third phenotype), and Aurotica 2 (glaucous). Based on our knowledge about the origin of amphidiploids and the genetic control of this trait, haplotypes were suggested for the genes of interest. The initial amphidiploid (non-glaucous) had the following haplotype – *iw3(1B) W1(2B) iw1(2B) Iw2(2T) Iw3(1T)*., and third phenotype plants differ from the initial genotype for one gene – *iw3(1B) W1(2B)iw1(2B) iw2(2T) Iw3(1T)*, a haplotype of the glaucous morphotype – *iw3(1B) W1(2B) iw1(2B) iw2(2T) iw3(1T)* differs from the initial haplotype by two genes.

Segregation population [Aurotica 1 (non-glaucous) x Aurotica 2 (glaucous)] F₂ was subjected to microsatellite analysis using SSR primers specific to the short arms of 2B and 2D chromosomes. Five loci (two to 2B, and 3 to 2D chromosomes) were polymorphic and selective neutral and were tested for their linkage with glaucousness trait. The *Xgwm429* and *Xbarc167* loci are adjacent to the *W1* and *Iw1* genes. According to the haplotypes we proposed, there is no evidence of segregation caused by these genes, and no association was found. The *Xgwm429* and *Xbarc167* loci are located near *W1* and *Iw1* genes. However, according to the proposed haplotypes, there is no evidence of segregation caused by these genes, and no association was found. The *Xgwm702*, *Xgwm102*, and *Xbarc167* loci are located on the 2T chromosome and inherited independently from those loci located on a 2B

chromosome. For the *Xgwm702* locus no independent inheritance with the *Iw2(T)* gene was shown, hence, they may be linked on the 2T chromosome.

Contrasting on glaucousness trait hybrid plants have been analyzed using IRAP and REMAP markers. From the IRAP primers of the *Nikita/Nikita* pair, polymorphic products were obtained for DNA samples of Aurotica 1 (non-glaucous) and Aurotica 2 (glaucous). With the *Sukkula/Sukkula* pair polymorphic DNA products were produced of contrasting Miosa morphotypes. In almost all cases, the electrophoretic spectra of amphidiploids differed from the Aurora spectra. For a more specific analysis of contrast forms (Aurotica 2 (glaucous) and some F₄ lines) + (Aurotica 1 non-glaucous and some F₄ lines), the modified REMAP method was used when one of the primers was a specific microsatellite locus. Three loci – *Xgwm102*, *Xbarc124*, and *Xgwm702* have been selected. In the analysis, 20 combinations of REMAP primers were tested, and with 15 of them amplification products were obtained. In general, compared to the electrophoretic spectra obtained from amplification with IRAP primers, the number of amplification products with REMAP primers significantly decreased. In addition, the number of products derived from DNA of parent plants has decreased. Almost all combinations produced monomorphic products, except for the combination *Xgwm702F/REMAPCAn*. Amplification with this pair of primers produced an additional component in an electrophoretic spectra of glaucous hybrid lines. According to our data, the *Xgwm702* locus is linked to the *Iw2(T)* gene and appearance of polymorphic products with the primer to LTR of retrotransposon indicates changes caused by the activity of mobile genetic elements near the *Iw2(T)* gene. Such activity can affect expression of *Iw2(T)* gene resulting in a permanent changes in the manifestation of glaucousness trait in wheat amphidiploids.

Scientific novelty. For the first time, the fact of a permanent and unidirectional change in manifestation of glaucousness trait on wheat amphidiploids that occurs in generative and segregation populations of artificial wheat amphidiploids and introgressive lines was proved. For the first time, it has been established that changes from the “green” phenotype to the “green-blue” phenotype is the result of the mutation *Iw2* → *iw2*, and change of the phenotype “green-blue” to “blue” is the result

of the mutation $Iw3 \rightarrow iw3$ under conditions of homozygous state for the recessive allele of the $iw2$ gene. It has been shown that the molecular mechanism that leads to the mutation of the wax inhibitor genes from the dominant alleles to the recessive is the activity of retrotransposons; in particular, such activity was identified in the locus near $Iw2$ (T) gene. Orthologous genes on the chromosomes 2T of *Ae. mutica* and 2M of *Ae. comosa* ($Iw2$ series) and 1T ($Iw3$ series) of *Ae. mutica* have been identified.

Practical significance. A model for a molecular genetic study aimed to find a connection between the change of phenotypic expression of the trait that constantly occurs in homogeneous populations of artificial wheat amphidiploids and segregation populations of their hybrids, and genetic changes occurring in genomes with hybrid origin have been developed. A methodical recommendation was formulated for conducting a hybridological analysis of a plant material, when representatives which demonstrate permanent phenotypic instability are involved in hybridization: the crossing components must be checked for homozygosity *a posteriori* to assure the heterozygous state of F_1 hybrids, genotypes of F_2 plants must be verified for homozygosity by dominant allele using phenotypes of F_3 plants. A REMAP method has been modified to use a chromosome-specific flanking sequence of the SSR locus instead of using a repeating sequence of a microsatellite that provides polymorphism screening for the complete genome (as in the original method), which provides chromosomal specificity of the available polymorphism; the proposed modification transforms polymorphic spectra into locus-specific, which potentially makes the REMAP method highly specific to a particular chromosome site, reduces the number of components in the spectra, and increases the resolution of the method.

Key words: glaucousness, genome substitution amphidiploid, genome addition amphidiploids, microsatellites, IRAP, REMAP, variation.

Список опублікованих праць за темою дисертації

Статті:

1. Shpylchyn V.V., Antonyuk M.Z., Ternovska T.K. Genetic analysis of artificial Triticinae amphidiploid Aurotica based on the glaucousness trait. Cytology and

- Genetics. 2014; 48(5): 43-53. (Особистий внесок здобувача: польова оцінка, гібридизація, ПЛР аналіз, взято участь в аналізі результатів, написання статті).
2. Antonyuk M.Z., Shpylchyn V.V., Ternovska T.K. Permanent genetic variability in introgressive lines and amphidiploids of Triticinae. Cytology and Genetics. 2013; 47(4):58-68. (Особистий внесок здобувача: польова оцінка, електрофоретичне розділення білків, участь в обговоренні результатів та написанні статті).
 3. Шпильчин В.В., Терновська Т.К. Застосування технології IRAP та REMAP для пошуку поліморфізму серед амфідиплоїдів, нестабільних за ознакою воскова осуга. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. 2013; 12: 181-185. (Особистий внесок здобувача: підбір праймерів, ПЛР аналіз, обговорення результатів, участь в написання статті).
 4. Шпильчин В.В., Михайлик С.Ю., Терновська Т.К. Активність транспозона як чинник втрати функції гена *Iw2* (T) у нащадків штучних амфідиплоїдів Triticinae. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016;19: 51-54. (Особистий внесок здобувача: ПЛР аналіз, взято участь в обговоренні і аналізі результатів, написання статті).
 5. Шпильчин В. В., Мартиненко В. С., Терновська Т. К. Генетичний аналіз Авротіки (AABVTT) за ознакою наявності воскової осуги. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. 2014;14: 82-86. (Особистий внесок здобувача: польова оцінка, гібридизація, ПЛР аналіз, написання статті).
 6. Шпильчин В.В., Терновська Т.К. Зміна прояву ознаки воскова осуга у генераціях амфідиплоїдів підтриби Triticinae. Наукові записки НаУКМА. 2011; Т.119. Біологія та екологія: 3–7. (Особистий внесок здобувача: польова оцінка, ПЛР аналіз, взято участь в обговоренні і аналізі результатів, та написанні статті).
 7. Шпильчин В.В. М.З. Антонюк, Т.К. Терновська. Фенотипний поліморфізм за ознакою воскова осуга серед представників підтриби Triticinae.

Наукові записки НаУКМА. 2010; Т.106. Біологія та екологія: 3–8. *(Особистий внесок здобувача: польова оцінка, ПЛР аналіз, взято участь в обговоренні результатів та написанні статті).*

8. Шпильчин В.В., Терновська Т.К. Мобільні генетичні елементи рослин. Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. 2010;8(1):154-164. *(Особистий внесок здобувача: пошук, аналіз літературних джерел, взято участь в написанні статті).*

Тези наукових доповідей:

1. Шпильчин В.В., Терновська Т.К. Зміна прояву ознаки воскова осуга у поколіннях амфідиплоїдів підтриби Triticinae. VI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології", С. 45, Львів 21.09.2010 – 24.09.2010. *(Особистий внесок здобувача: польова оцінка, ПЛР аналіз, участь в обговоренні результатів, написання тез).*

2. Shpylchyn V.V., Ternovska T.K. Variation in Glaucousness Appearance in Artificial Wheat Amphidiploids. The 4th International IMBG Conference for Young Scientists "Molecular Biology: Advances and Perspectives, P. 89, Kyiv, 14.09.2011 – 17.09.2011. *(Особистий внесок здобувача: польова оцінка, молекулярний аналіз, участь в обговоренні результатів, написання тез).*

3. Шпильчин В.В., Терновська Т.К. Мінливість за ознакою наявності воскової осуги у генераціях штучних амфідиплоїдів пшениці. Перша конференція молодих вчених «Біологія рослин та біотехнологія», С. 54, Біла Церква, 5.10.2011 – 7.10.2011. *(Особистий внесок здобувача: польова оцінка, ПЛР аналіз, участь в обговоренні результатів, написання тез).*

4. Shpylchyn V.V., Ternovska T.K. Changes in appearance of glaucousness in generations of amphidiploids in the Triticinae subtribe. 9 Plant Genomics European Meetings, P. 68, Istanbul, 04.05.2011 – 05.11.2011. *(Особистий внесок здобувача: польова оцінка, електрофоретичне розділення білків, участь в обговоренні результатів, написанні тез).*

5. Shpylchyn V.V., Martynenko V.S., Ternovska T.K. Genetic instability of amphidiploid Miosa (*Triticum durum***Aegilops comosa*, AABBMtMt) resistant to powdery Mildew, 13th International Cereal Rusts and Powdery Mildews Conference, Beijing, P. 164, 28.08.2012 - 31.08.2012. (*Особистий внесок здобувача: польова оцінка, ПЛР аналіз, участь в обговоренні результатів, написання тез*).
6. Shpylchyn V.V., Antonyuk T.K., Mykhaylyk S.Y. Application of IRAP and REMAP techniques for polymorphism studying of wheat genome with hybrid origin, 12th International Wheat Genetics Symposium, P.6-30.Yokohama, Japan, 08.10.13-14.10.13. (*Особистий внесок здобувача: польова оцінка, ПЛР аналіз, участь в обговоренні результатів, написання тез*).

ЗМІСТ

ВСТУП.....	18
Актуальність теми.	18
Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.	20
Мета і завдання дослідження.	21
Методи дослідження.	22
Наукова новизна одержаних результатів.....	22
Практичне значення одержаних результатів.....	23
Особистий внесок здобувача.....	23
Апробація результатів дисертації.....	23
Публікації.....	24
Структура і обсяг роботи.....	24
РОЗДІЛ 1	25
БІОСИНТЕЗ КОМПОНЕНТІВ ТА ГЕНЕТИЧНА РЕГУЛЯЦІЯ ВОСКОВОЇ ОСУГИ У РОСЛИН (огляд літератури).....	25
1.1. Воскова осуга.....	25
1.2. Генетичний контроль біосинтезу поверхневих восків	27
1.3. Генетичний контроль ознаки воскова осуга.....	36
1.4. Роль алополіплоїдизації у формуванні та стабілізації геномів	38
1.5. Роль транспозонів в структурних та функціональних змінах геному	49
РОЗДІЛ 2	56
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	56
2.1. Рослинний матеріал	56
2.2. Реактиви, розчини, обладнання	58
2.3. Фенотипна оцінка рослинного матеріалу	60

2.4. Методика гібридизації пшениці	62
2.5. Методи роботи з ДНК.....	62
2.5.1. Виділення геномної ДНК з зелених листків та колеоптиле.	62
2.5.2. Розробка олігонуклеотидних послідовностей до мікросателітних повторів.	63
2.5.3. Полімеразна ланцюгова реакція.	69
2.5.4. Електрофоретичне розділення продуктів ПЛР в агарозному гелі.	69
2.5.5. Електрофоретичне розділення продуктів ПЛР в акриламідному гелі.	70
2.5.6. Електрофоретичне розділення та візуалізація продуктів ПЛР в системі ALFexpress II.	71
2.6. Методи роботи з білками.....	71
2.6.1. Екстракція та електрофоретичне розділення гліадинів.	71
2.6.2. Екстракція та електрофоретичне розділення глютенінів.....	72
2.6.3. Екстракція і електрофоретичне розділення бета-амілази.	73
2.6.4. Екстракція і електрофоретичне розділення альфа-амілази.	74
2.7. Статистична обробка результатів.....	74
РОЗДІЛ 3	75
РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	75
3.1. Встановлення моделі успадкування ознаки наявності/відсутності воскової осуги	75
3.1.1. Гібридологічний аналіз.....	75
3.1.2. Мікросателітний аналіз.	81
3.2. Зміна прояву ознаки воскова осуга у генераціях амфідиплоїдів підтриби Triticinae	84

3.3. Генетичний аналіз амфідиплоїда Авротіка за ознакою наявності/відсутності воскової осуги	93
3.3.1. Гібридологічний аналіз.....	93
3.3.2. Мікросателітний аналіз.	103
3.3.3. Пошук асоціації між SSR-локусами та генами інтересу.....	109
3.4. Дослідження поліморфізму ДНК контрастних морфотипів методами IRAP та REMAP.....	112
3.4.1. Дослідження поліморфізму за ретротранспозонними системами між гексаплоїдами Авротіки та Міози з восковою осугою та без неї.....	112
3.4.2. Дослідження поліморфізму ампліконів, отриманих методом REMAP, з використанням SSR-локусів, локалізованих поряд з генами <i>Iw2</i>	117
УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	123
ВИСНОВКИ.....	128
ЛІТЕРАТУРНІ ДЖЕРЕЛА	130

ВСТУП

Актуальність теми. Воскова осуга вкриває поверхню вегетативних органів всіх наземних рослин, хоча експресивність ознаки може значно варіювати. Зокрема, у злаків добре розрізняються дві градації: восковий шар настільки міцний, що рослина набуває блакитний відтінок, осуга у наявності. Восковий шар слабкий, рослина виглядає яскраво-зеленою, таку градацію назвали «зелена» (без осуги). Ознака наявності/відсутності воскової осуги не є селективно-нейтральною. Відмічається, що серед дикорослих представників *Triticinae* переважають рослини без воскової осуги, в той час як культивовані сорти злаків майже завжди мають осугу. [1] Наявність воскової осуги асоційована з підвищеною врожайністю, особливо за посушливих умов, [2] більшою ефективністю використання води, газообміну та фотосинтезу [3,4] і, за деякими даними, є стійкішими до патогенів. [5] Проте, за іншими даними, такі рослини можуть бути більш чутливими до збудників грибних уражень листків, що може пояснюватися поганою змочуваністю їхньої поверхні при обробці фунгіцидами. [4] Крім того, рослини без воскової осуги мають більш тривалу вегетацію. [1]

Відомо, що наявність воскової осуги у пшениці м'якої контролюється двома ортологічними серіями генів: домінантні промотори розвитку осуги W , та епістатичні до промоторів домінантні інгібітори розвитку осуги W^I , обидві – на хромосомах 2-ої гомеологічної групи. [6] Після ідентифікації ще однієї групи інгібіторів розвитку осуги на хромосомах 1-ої групи, інгібіторам дали іншу назву, Iw , і текст роботи написаний з використанням цієї сучасної назви гена W^I .

Відсутність воскової осуги є домінантною ознакою, оскільки вона зумовлюється наявністю хоча б одного домінантного алеля гена-інгібітора. Наявність воскової осуги – ознака рецесивна, тому що такий фенотип властивий лише рецесивним гомозиготам за будь-яким з трьох генів-інгібіторів.

Мінливість за описаною ознакою спостерігається серед штучних гексаплоїдів Triticinae. [7] Тридцять років тому було створено чотири геномно-заміщених амфідиплоїди, в яких субгеном DD озимого сорту м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L., AABBDD) Аврора був заміщений геномом одного з диплоїдних видів егілопсу: *Aegilops speltoides* у Авродеса (AABBSS), *Ae. sharonensis* у Аврозиса (AABBS^{sh}S^{sh}), *Ae. umbellulata* в Авролати (AABBUU) та *Ae. mutica* в Авротіки (AABBTT). [8,9] Гібриди F₁ від схрещування цих амфідиплоїдів з генотипом Аврора послужили джерелом для створення певного розмаїття 42-хромосомних інтрогресивних ліній м'якої пшениці з різним обсягом чужинного хроматину. [10,11] Іншу групу амфідиплоїдів, геномно-доданих, було отримано через об'єднання геному лінії тетраплоїдної пшениці *T. durum* Desf. (AABB) з геномом М диплоїда *Ae. comosa* (Міоза, AABBMM) та D виду *Ae. tauschii*, природного джерела субгенома D м'якої пшениці (MIT^D, AABBDD). [9,12] Мінливість за ознакою наявності/відсутності воскової осуги спостерігали як у генераціях амфідиплоїдів, так і усередині створених на їхній основі 42-хромосомних інтрогресивних ліній пшениці м'якої з різним обсягом чужинного хроматину. Завжди спостерігалась одна і та сама зміна у експресії гена-інгібітора воскової осуги від домінантної ознаки (новостворені амфідиплоїди завжди зелені) до рецесивної. До 30% рослин, вирощених з насіння зеленого амфідиплоїда, у наступній генерації набували неочікуваного рецесивного фенотипу. Ця зміна експресії виявляється перманентною, тобто рослини зі зміненим проявом ознаки з'являлись в кожній наступній генерації амфідиплоїду чи лінії, для яких таку зміну було одного разу виявлено. Зміна односпрямована, тільки від домінантної ознаки до рецесивної, та незворотна – рослини зі зміненим фенотипом ніколи не повертались до вихідного фенотипу. [7]

Останнім часом інтенсивно досліджуються процеси, які відбуваються в природних та штучно створених амфідиплоїдах під час формування їхнього геному. [2,4,7,13,14] Результати спростовують нашу впевненість у стабільності геному протягом онтогенезу, перш за все геному гібридного походження. [15–

19] Зміни рееструються на епігенетичному (регуляція експресії генів) та на генетичному рівні. Зміни у послідовності нуклеотидів (мутації) відбуваються у геномах гібридного походження з підвищеною, у порівнянні з усталеними геномами, частотою через внутрішньохромосомні та міжхромосомні перебудови. Активність ретротранспозонів внаслідок «геномного стресу» [20], який складається при об'єднанні різних геномів у один, розглядається наразі як один з найміцніших промоторів таких перебудов. [21–25] Ознака наявності/відсутності воскової осуги є, безумовно, придатною моделлю для вивчення молекулярно-генетичних процесів, що відбуваються у об'єднаному геномі, та виявляються як геномний стрес. По-перше, фенотипна зміна домінантної ознаки на рецесивну неодмінно виникає в окремих рослинах всіх штучних амфідиплоїдів у різний час після їхнього створення, і після виникнення повторюється у наступних генераціях аж до повного зникнення нащадків з домінантною ознакою. Ця перманентність дає вихід на одну з «гарячих точок» молекулярних перебудов, що відбуваються при об'єднанні різних геномів. По-друге, ознака виявляє повну пенетрантність та добру експресивність, фенотипна оцінка рослин завжди однозначна і ніколи не викликає сумнівів, що є дуже важливим при спробах зв'язати певний морфологічний фенотип з фенотипом молекулярним. По-третє, досліджуваний рослинний матеріал характеризується геномами різного складу, їх об'єднує лише гібридність походження. Саме тому амфідиплоїди та їхні різноманітні нащадки, оцінені за ознакою наявності/відсутності воскової осуги, є привабливою моделлю для вивчення внутрішньогеномних процесів, які відбуваються під час стабілізації гібридних геномів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано у рамках наукових проектів кафедри біології НаУКМА «Інтрогресивні процеси у геномі м'якої пшениці та їх застосування для генетичного аналізу *Triticinae*», № держреєстрації 0110U001273, «Формування геному поліплоїдних злаків за умов штучної інтрогресії чужинного хроматину та у природних умовах» № держреєстрації 0110U001272, «Підвищення

екологічної пластичності м'якої пшениці через індукцію рекомбіногенезу за участю інтрогресивного хроматину», № держреєстрації 0112U003159.

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – встановити молекулярно-генетичну причину перманентної зміни прояву (експресії) ознаки наявності/відсутності воскової осуги у пшеничних амфідиплоїдів, та їхніх нащадках, гібридах та інтрогресивних лініях.

Відповідно до мети були поставлені такі завдання:

1. Виконати оцінку досліджуваного матеріалу, геномно-заміщених та геномно-доданих амфідиплоїдів, інтрогресивних ліній, що від них походять, щодо частоти появи блакитних рослин поміж зелених аналогів, які є гомозиготними через схему свого походження.
2. Вивчити успадкування ознаки в інтрогресивних ліній. Для цього залучити до гібридологічного аналізу лінії, похідні Авродесу, Аврозису, Авролати, нестабільні за проявом ознаки інтересу (рослина зелена/блакитна). Отримати та оцінити гібридні популяції F_1 та F_2 від схрещування контрастних фенотипів.
3. Вивчити успадкування ознаки у амфідиплоїдів Авротіка та Міоза через схрещування контрастних морфотипів та оцінку гібридних популяцій F_1 та F_2 за ознакою інтересу.
4. Виконати мікросателітний аналіз геномів рослин з контрастними фенотипами серед нестабільних за ознакою наявності/відсутності воскової осуги інтрогресивних ліній – похідних Аврозису, Авродесу, Авролати та геномів амфідиплоїдів Авротіка та Міоза для хромосомної локалізації гена, у якому відбувається мутація від домінантного до рецесивного алелю.
5. За допомогою мікросателітного аналізу гібридних популяцій від схрещування контрастних фенотипів здійснити пошук мікросателітних маркерів, зчеплених з геном інтересу.
6. За допомогою методів IRAP та REMAP скринувати геноми контрастних морфотипів Міози, Авротіки та гібридів F_4 від

схрещування зелених та блакитних аналогів Авротіки, на наявність руху ретротранспозонів.

7. Використати метод REMAP у модифікованому варіанті в спробі виявити асоціацію між рухом ретротранспозона та мікросателітним локусом, зчепленим з геном, мутація в якому виявляється як вищеплення блакитних рослин у популяції зелених рослин, за походженням гомозиготних.

Об'єкт дослідження – штучні амфідиплоїди пшениці з перманентною мінливістю за ознакою відсутність/наявність воскової осуги.

Предмет дослідження – молекулярно-генетичні процеси, що відбуваються при стабілізації новостворених геномів гібридного походження.

Методи дослідження. Метод штучної гібридизації рослин, виділення ДНК зі СТАВ (ЦТАБ – цетил триметил амоній бромід) буфером, ПЛР, електрофорез в поліакриламідному гелі за денатуруючих умов та в агарозному гелі, екстракція та електрофорез білків (гліадини, глютеніни, альфа-амілаза, бета-амілаза), оцінка рослин за ознаками морфології, методи статистичної обробки даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше доведено факт перманентної та односпрямованої зміни прояву ознаки наявність/відсутність воскової осуги на рослинах пшениці, яка відбувається у всіх популяціях, генераційних та сегрегаційних, штучних амфідиплоїдів пшениці та інтрогресивних лініях, що від них походять. Вперше встановлено, що зміна рослиною пшениці фенотипу «зелений» на фенотип «зелено-блакитний» є наслідком мутації $Iw2 \rightarrow iw2$, а фенотипа «зелено-блакитний» на «блакитний» – наслідком мутації $Iw3 \rightarrow iw3$ за умов гомозиготного стану за рецесивним алелем попереднього гена. Вперше показано, що молекулярним механізмом, який призводить до мутування домінантних алелів генів-інгібіторів воскової осуги до рецесивних, є рух ретротранспозонів; зокрема, такий рух зареєстрований у хромосомній ділянці, розташованій поряд з геном $Iw2(T)$ геному Авротіки. Вперше ідентифіковано гени інгібітори – члени ортологічних серій пшеницевих

на хромосомах 2Т *Ae. mutica* та 2М *Ae. comosa* (серія Iw2) та 1Т (серія Iw3) *Ae. mutica*.

Практичне значення одержаних результатів. Створено модель для молекулярно-генетичного дослідження, спрямованого на пошук зв'язку між зміною фенотипного виразу ознаки, що постійно відбувається у гомогенних (за походженням) популяціях штучних амфідиплоїдів пшениці та сегрегаційних популяціях їхніх гібридів, та генетичними змінами, які відбуваються у геномах, що мають гібридне походження. Сформульовано методичну рекомендацію для проведення гібридологічного аналізу рослинного матеріалу, коли до схрещувань залучаються представники, які демонструють перманентну фенотипну нестабільність: компоненти схрещування *a posteriori* мають бути перевірені на гомозиготність для гарантії гетерозиготного стану гібридів F₁, генотипи рослин F₂ мають бути верифіковані на гомозиготність за домінантним алелем за фенотипами рослин F₃. Модифіковано методику REMAP, в якій замість використання у якості другого праймера повторюваної послідовності мікросателіта, що забезпечує скринування поліморфізму за повним геномом (як у оригінальній методиці), використовується хромосомно-специфічна фланкуюча послідовність SSR-локуса, чим забезпечується хромосомна специфічність наявного поліморфізму; запропонована модифікація перетворює поліморфні спектри на локус-специфічні, що потенційно робить метод REMAP високоспецифічним до певної хромосомної ділянки, зменшує кількість компонентів у спектрі та піднімає роздільну здатність методу при аналізі спектрів ампліфікації.

Особистий внесок здобувача. Написання огляду літературних джерел, виконання експериментальної частини роботи та її оформлення у дисертаційний рукопис було здійснено особисто здобувачем. Планування експерименту та обговорення отриманих результатів здійснювалися разом з науковим керівником Терновською Т.К.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідалися на таких наукових конференціях: VI Міжнародна наукова

конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології (Львів, 2010), The 4th International IMBG Conference for Young Scientists "Molecular Biology: Advances and Perspectives (Kyiv, 2011), Перша конференція молодих вчених «Біологія рослин та біотехнологія», (Біла Церква, 2011), 9 Plant Genomics European Meetings, (Istanbul, 2011), 13th International Cereal Rusts and Powdery Mildews Conference, (Beijing, 2012), 12th International Wheat Genetics Symposium, (Yokohama, 2013).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 14 наукових робіт: 8 статей у наукових журналах, в тому числі 6 – у фахових виданнях, серед них 2 статті оприлюднені в журналі, що реферується у базі Scopus, тези 6 доповідей у збірниках матеріалів міжнародних і всеукраїнських конференцій.

Структура і обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, чотирьох розділів, три є яких є експериментальними, висновків та списку використаних джерел. Загальний обсяг дисертації – 148 сторінок, вона містить 16 рисунків, 13 таблиць, 202 цитованих джерела.

РОЗДІЛ 1

БІОСИНТЕЗ КОМПОНЕНТІВ ТА ГЕНЕТИЧНА РЕГУЛЯЦІЯ ВОСКОВОЇ ОСУГИ У РОСЛИН (огляд літератури)

1.1. Воскова осуга

1.1.1. Загальна характеристика компонентів, що утворюють воскову осугу. Воскова осуга або віск, що вкриває поверхню багатьох наземних рослин, в тому числі й пшениці, є збірним поняттям, що описує різноманітні ліпідні компоненти кутикули. Основою кутикули є кутикулярні воски та полімер кутин, який утворюється похідними C16 та C18 жирних кислот, що з'єднані епоксидними та ефірними зв'язками, та стабілізовані гліцеролом. Біохімічну основу кутикулярних восків складають насичені жирні кислоти з дуже довгими ланцюгами, алкани, первинні та вторинні спирти, альдегіди, кетони, β -дикетони, естери, тритерпени і стероли. [26] У пшеничних рослин на репродуктивній стадії β -дикетони складають більше 60% складу воскової осуги, приблизно 15% припадає на жирні кислоти і алкани, та до 4% на первинні спирти. Саме наявність β -дикетонів та їхніх похідних зумовлюють фенотипний прояв даної ознаки, що проявляється у вигляді сизого нальоту на вегетативних та генеративних органах рослин. [27]

Визначення понять, що описують воскову осугу, вперше було запропоновано Мартіном і Джуніпером, які в своїй роботі [28] назвали восковий покрив рослин «кутикулярною мембраною», яка складається з наступних компонентів: кристалів епікутикулярного шару, що взаємодіють із зовнішнім середовищем, та інтракутикулярного шару, що взаємодіє з клітинною стінкою і складається з кутину, зв'язаного з інтракутикулярним воском (рис. 1.1).

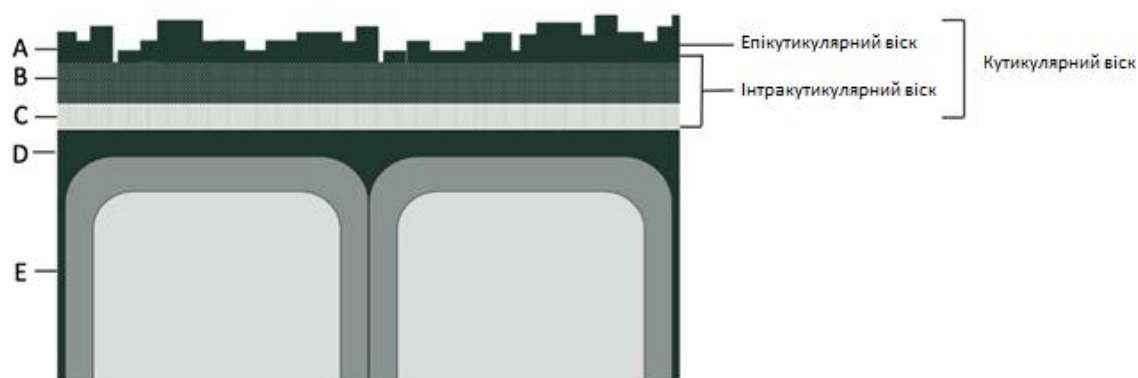


Рис. 1.1. Схематична будова кутикули. [зі змінами за (34)]

A – епікутикулярний віск

B – вбудований в віск кутин

C – ділянка, що містить кутин, віск та вуглеводні полімери

D – пектин

E – клітинна стінка

Кутикула складається з нерозчинного ковалентно зв'язаного полімеру кутину, що формує міцний шар, який вкриває епідермальні клітини. Інтракутикулярний шар описується як аморфна суміш ліпідів, вбудованих в кутин, яка зв'язує кутикулу з клітинною стінкою. Епікутикулярний віск являє собою поверхневі ліпіди, що формують кристалоподібну або гладеньку зовнішню плівку кутикули. [28] Згодом було надано більш точне, хімічно обґрунтоване визначення, яке описувало кутикулу як поліефірну матрицю з гідрокси- і гідроксиепоксидних C16 і C18 жирних кислот, що оточені кутикулярним воском. [29]

Для молекулярно-генетичного аналізу генів, пов'язаних з восковою осугою, для неї зазвичай використовують наступне визначення: «ліпіди, які видаляються з поверхні рослин шляхом короткотривалої взаємодії з органічними розчинниками». [30] Фенотипно воскова осуга проявляється у вигляді сизого нальоту на рослинних поверхнях, що відповідає наявності епікутикулярного воску, здатного до розсіювання світла. Склад воскового шару

може варіювати залежно від стадії розвитку рослини, її органів, а також від умов навколишнього середовища.

1.1.2. Роль воскової осуги в фізіології рослин. Фізичні та хімічні властивості кутикулярного воску зумовлюють його функції в житті рослин. Дослідження демонструють, що рослини з восковою осугою мають збільшену продуктивність і біомасу, підвищений рівень фотосинтезу і зменшений рівень транспірації, а також зменшену температуру поверхні під час фотосинтезу в експериментах у парникових умовах. [13,14] Воскова осуга значно зменшує рівень транспірації вночі, впливаючи на ефективність використання води рослиною. Нещодавні дослідження демонструють, що зелені рослини без воскової осуги за такими показниками ефективності як втрата води і вилучення хлорофілу значно поступаються рослинам, що вкриті осугою. [27] Наявність воскової осуги перешкоджає позапродиховій втраті води, захищає рослини від ультрафіолетового випромінювання, зменшує затримку води на поверхні рослини, таким чином мінімізуючи накопичення рослиною пилу, пилку та інших мікрочастинок, що зустрічаються в повітрі. [31] Існують припущення, що поверхневий віск відіграє важливу роль в захисті рослин від бактеріальних та грибних патогенів, а також бере безпосередню участь у взаємодії рослини з комахами. [29] Хоча, за даними деяких дослідників, не вкриті восковою осугою сорти пшениць демонструють підвищену врожайність завдяки тому, що вони ефективніше використовують спектр сонячного світла. [1]

1.2. Генетичний контроль біосинтезу поверхневих восків

Експресивність ознаки воскова осуга може варіювати. Проте, при візуальній оцінці і у літературних джерелах [3,32,33], як правило, розрізняють дві її градації. У першому випадку наявний міцний восковий шар, і рослина набуває блакитного відтінку, завдяки чому вважається, що воскова осуга наявна. У другому випадку, коли восковий шар слабкий, та рослина виглядає яскраво-зеленою, таку градацію називають «відсутність воскової осуги».

Мутації, які призводять до модифікації складу кутикулярних восків були досліджені у пшениці, жита, сорго, кукурудзи та арабідопсиса. У арабідопсиса і жита такі мутанти мають назву *eceriferum* (*cer*), що дослівно можна перекласти як «невкриті». У арабідопсиса досліджено 22 таких *cer* локуси, у жита – більше 1500 *cer* мутантів було об'єднано в 85 комплементарних груп. У кукурудзи локуси, які регулюють утворення воску, мають назву *glossy* (*gl*). На даний момент досліджено 30 *gl* локусів, які залучені в процеси накопичення кутикулярних восків. Для рису в контролі ознаки бере участь 11 локусів *OsGL*. Мутанти з порушеннями в накопиченні поверхневих восків у сорго мають назву *bloomless* (*bm*). [32,34–36]

1.2.1. Характеристика генів *CER Arabidopsis thaliana*. Лише частина з відомих 22 *cer* локусів була детально досліджена і описана. [37] Наведемо приклади деяких з них. Ген *CER1* кодує декарбоксилазу, що є одним з ферментів біосинтезу алканів, тому носії мутантного гена *cer1* мають брак алканів у складі епікутикулярного воску. [38] Ген *CER2* кодує елонгазу жирних кислот, яка подовжує ланцюг (до C28) жирних кислот з дуже довгими ланцюгами. Тому носіям мутантного *cer2* у складі бракує жирних кислот з дуже довгими ланцюгами та первинних спиртів у складі епікутикулярного воску. [39] Ген *CER3* кодує ферментативний комплекс, що разом з *CER1* та *CYTB5* каталізують утворення алканів. Ген *CER4* кодує ацил-КоА редуктазу жирних кислот, що впливає на кількість первинних спиртів та ефірів у складі поверхневого воску. Ген *CER5* відповідає за синтез ABC-транспортера, який є переносником жирних кислот. У клітинах рослин з мутантним геном в цитоплазмі накопичуються аномальні утворення, що містять жирні кислоти, в наслідок того, що порушується система ліпідного транспорту. [40] Ген *CER7* кодує 3' → 5' екзорибонуклеазу. У дефектних на цим геном рослинах поверхневий віск не накопичується. Ген *CER9* кодує білок, який діє як негативний регулятор синтезу жирних кислот з дуже довгими ланцюгами. У мутантів за цим геном аномально підвищуються рівні C18, C24, C26 жирних кислот з дуже довгими ланцюгами в складі поверхневого воску. [41]

1.2.2. Характеристика генів *GL* кукурудзи. Серед 30 відомих локусів *GL* сім генів було клоновано та охарактеризовано. Ген *GL1* є ортологом гена *WAX2* арабідопсиса та кодує фермент, що відповідає за утворення альдегідів. Мутації цього гену призводять до суттєвого зниження кількості альдегідів та спиртів у складі кутикулярних восків ювенільних листків кукурудзи. [42,43] Ген *GL2* є ортологом *CER2*, що кодує елонгазу жирних кислот, яка відповідає за заключний етап подовження ланцюга жирних кислот. Дефект гена призводить до п'ятикратного зменшення кількості воску, порівняно з диким типом. [27,34,44] Ген *GL3* кодує транскрипційний фактор R2R3-MYB, *GL4* є ортологом гена *CUT1* арабідопсиса, що кодує β -кетоацил-КоА синтетазу [45]. Ген *GL8* кодує β -кетоацил-КоА редуктазу. [46] Ген *GL13* кодує білок, що залучений в транспорті епікутикулярних восків на поверхню епідермальних клітин. *GL15* кодує транскрипційний фактор APETALA2, який залучений в процесі переходу листя від ювенільної до зрілої стадії. [44]

1.2.3. Характеристика генів *OsGL1* риса. Порівняно з арабідопсисом і кукурудзою у риса ідентифіковано та досліджено функцію відносно невеликої кількості генів, що відповідають за утворення воску. Ген *wsl1*, розташований на хромосомі 6, кодує β -кетоацил-КоА синтазу і є гомологом *CER6*. Носії мутантного гена майже позбавлені кутикулярного воску на поверхнях рослини. [47]

Одинадцять генів *GL1* було досліджено в риса (*OsGL1-1* – *OsGL1-11*). [48,49] Гени *OsGL1-1/WSL2*, *OsGL1-2* та *OsGL1-3* споріднені з генами *GL1* кукурудзи та *WAX2/YRE/CER3/FLP* арабідопсиса – їх класифікують у *GL1*-подібну групу. Гени *OsGL1-4*, *OsGL1-5/Wda1*, *OsGL1-6* та *OsGL-7* дуже подібні до *CER1*, який є гомологом *GL1*, тому їх об'єднують в *CER*-подібну групу. Гени *OsGL1-8*, *OsGL1-9*, *OsGL1-10* та *OsGL1-11* кодують фермент стеролдесатуразу, що також залучений у синтез восків. Таким чином, всі перелічені вище гени мають подібну структуру і функції з відповідними гомологами, описаними у арабідопсиса та кукурудзи. [50,51]

1.2.4. Біосинтез компонентів поверхневих восків. Процес біосинтезу восків складається з чотирьох кроків: утворення малоніл-КоА, синтез жирних кислот *de novo*, подовження ланцюгів жирних кислот до утворення жирних кислот з дуже довгими ланцюгами і модифікації жирних кислот з дуже довгими ланцюгами. [29]

Синтез жирних кислот починається за відомою схемою в пластидах: малоніл-КоА синтезується із ацетил-КоА за участю ацетил-КоА карбоксилази. [36] Далі в стромі відбуваються реакції нарощування ланцюгів C16 та C18 жирних кислот за участі ферментативного комплексу – синтази жирних кислот. Після переміщення малоніл-КоА трансацилазою розпочинається цикл послідовних реакцій, що каталізуються ферментами синтазами жирних кислот. Даний цикл включає чотири ензиматичні реакції, в результаті яких утворюється ланцюги жирних кислот довжиною 16-18 атомів карбону. [41]

На наступному етапі відбувається вивільнення в цитоплазматичний матрикс за участі тіоестерази В C16 та C18 жирних кислот з АСР-транспортного білка, їхня доставка в цитоплазму і подальша активація до КоА-тіоестерів довголанцюговою ацил-КоА синтетазою. [52] Білки LACS1/CER8 та LACS2 (*Arabidopsis thaliana*), що локалізовані на ендоплазматичному ретикулумі беруть участь в цьому біосинтетичному шляху. [26]

Активовані форми жирних кислот потрапляють до ендоплазматичного ретикулуму, де за допомогою комплексу елонгаз жирних кислот (FAE) їхні ланцюги подовжуються. Комплекс FAE складається з чотирьох типів ензимів: β -кетואцил-КоА синтази (KCS), β -кетואцил-КоА редуктази (KCR), 3-гідро-ацил-КоА дегідратази (HCD), та еноіл-КоА редуктази (ECR). За синтез відповідних ензимів у арабідопсиса відповідають гени *ECERIFERUM 6 (CER6)*, *KCR1*, *PAS2B* та *CER10* відповідно. Показано, що у кукурудзи фермент β -кетואцил-КоА редуктаза кодується геном *gl8*. [41,53]

Першим кроком в процесі подовження ланцюгів жирних кислот є приєднання двох атомів вуглецю до ацил-КоА, що каталізується KCS, який є визначальним для специфічної активності всього комплексу FAE. В

арабідопсиса наявна велика родина KCS, що налічує 21 представника [32]. Вони мають різну субстратну специфічність щодо ланцюгів жирних кислот з різною кількістю карбонів та подвійних зв'язків (рис 1.2).

Ферментативний комплекс FAE1 каталізує біосинтез жирних кислот з дуже довгими ланцюгами (C20 та C22) для запасних ліпідів насіння. KCS20 та KCS2/DAISY необхідні для подовження ланцюга жирних кислот, необхідних для біосинтезу соберину та кутикулярного воску. KCS6/CER6/CUT1 та KCS5/CER60 залучені в утворенні жирних кислот з більше ніж 28 карбонами в ланцюзі, що є структурними компонентами кутикулярного воску та ліпідів, що вкривають пилок. Ген *GL4* кукурудзи та ген *WSL1* рису є гомологами *CER6/CUT1* і можуть виконувати подібні функції. [27,47] KCS1 діє специфічно щодо насичених та мононенасичених жирних кислот (C16 - C24), а KCS9 подовжує жирні кислоти (C16) до жирних кислот (C22).

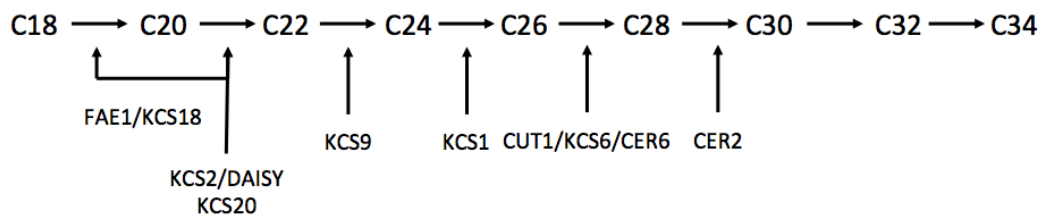


Рис. 1.2. Схематичне зображення субстратної специфічності родини білків KCS, залучених в утворення жирних кислот з дуже довгими ланцюгами у *Arabidopsis thaliana*. [зі змінами за [54]]

На відміну від KCS, інші білки комплексу FAE – KCR1, HCD/PAS2 та ECR/CER10 не мають специфічності щодо довжини ланцюга жирних кислот. [41]

За утворення бічних ланцюгів відповідає інших клас ферментів – тип III полікетид синтази (PKS), задача яких полягає в утворенні точок розгалуження ланцюга жирної кислоти з подальшим нарощуванням бічного ланцюга. Цей процес призводить до утворення аліфатичних ланцюгів, що несуть кисневмісні

групи. Це відбувається завдяки тому, що даний ферментативний комплекс оминає реакції відновлення кетогруп, в результаті чого кетогрупи та гідроксильні групи залишаються в ацильних ланцюгах. Досліджено, що PKS можуть відігравати роль в біосинтезі β -дикетонів у Gramineae. [26]

1.2.5. Модифікація та транспорт жирних кислот з дуже довгими ланцюгами. У подальшому продукти згаданих вище реакцій можуть перетворюватися або в первинні спирти (шлях ацильної редукції), або в алкани (шлях декарбоксилювання), або в β -дикетони [55]. У випадку дії ацил-КоА редуктази CER4 жирні кислоти з довгими ланцюгами перетворюються на відповідні первинні спирти, і воскова естерсинтаза використовує жирні кислоти з довгим і дуже довгим ланцюгом, а також C16 жирні кислоти для синтезу воскових ефірів. Що стосується реакцій декарбоксилювання, то CER1 взаємодіє з CER3, асоційованим з воском білком і цитохромом b5, що локалізований на ендоплазматичному ретикулумі, і таким чином відбувається біосинтез алканів. Подібним чином за участі алкан-гідроксилази 1 і цитохрому P450 утворюються вторинні спирти та кетони. [27] Остаточний склад поверхневих восків зумовлюється видовою належністю. Наприклад, основними компонентами кутикулярних восків кукурудзи є первинні спирти та воскові ефіри – продукти реакцій ацильного відновлення. [36] Алкани займають провідне місце у складі восків багатьох рослин. У арабідопсиса вони складають більше 70% від загальної композиції воску. [56] У представників Triticeae біохімічні реакції, пов'язані з ацил-опосередкованим подовженням ланцюгів жирних кислот, їхнім вкороченням та синтезом багатих на спиртовмісні сполуки восків, переважають на вегетативній стадії розвитку рослин. Паралельний шлях, який переважає на репродуктивній стадії, полягає в біосинтезі β -дикетонів (гентриаконтан-14,16-діона та його гідроксипохідних). [26]

За допомогою молекулярно-генетичного аналізу було встановлено, що утворення первинних спиртів у арабідопсиса здійснюється ацил-КоА редуктазою FAR3/CER4. Після цього утворені спирти та C16:O ацил-КоА

конденсуються в воскові ефіри за допомогою біфункціональної воскової синтази/ацил-КоА:діацилгліцерол ацилтрансферази (WSD1). [27]

У реакціях шляху утворення алканів – гідроксилювання алканів з утворенням вторинних спиртів та їхнє подальше окислення в кетони каталізується середньоланцюговою гідролазою алканів (MAH1). Утворення алканів каталізується мультиферментним комплексом, який складається з альдегід декарбоксилази CER1, ферментів, що утворюють альдегід CER3/WAX2/YRE та ізоформами цитохрому b5 – CYTB5. [56] Кукурудза має локус *GL1*, який є гомологічним до *CER3/WAX2* і може виконувати подібні функції. [27]

Шлях утворення β -дикетонів відрізняється від інших шляхів специфічністю субстратів та інгібіторів, а також генами, задіяними у ньому. Складність дослідження β -дикетонного синтезу компонентів воскової осуги полягає в тому, що в арабідопсиса та риса, які використовуються в ролі модельних організмів для дослідження різноманітних процесів, β -дикетони в складі поверхневих восків відсутні. [27]

В подальшому синтезовані на ендоплазматичному ретикулумі ліпіди транспортуються на поверхню клітини за участі ABC-транспортерів ABCG12/CER5 та ABCG11/WBC11. [57,58] Також в цьому процесі беруть участь якірні транспортні білки ліпідів (LTP), які є частиною ланцюга доставки ліпідів, а також виконують регуляторну функцію. У арабідопсиса білки LTPG1 та LTPG2 беруть участь у транспорті та накопиченні кутикулярних восків. [41]

1.2.6. Регуляція біосинтезу та транспорту компонентів поверхневих восків. Показана роль транскрипційних факторів, чутливих до етилену, в регуляції утворення воску. Родина білків AP2/ERF включає транскрипційні фактори, що містять один або декілька доменів AP2. Першим ідентифікованим фактором, здатним регулювати утворення та запасання воску в арабідопсиса, є WIN1/SHN1. В геномі арабідопсиса налічується три гомологічних гени, що кодують WIN1/SHN1. Першим є *WIN1/SHN1*, він експресується в коренях і органах квітки. Ген *SHN2* відповідає за розкриття пиляків, а отже експресується

в рослинних органах, що несуть цю функцію. Третій ген, *SHN3*, експресується в усіх рослинних органах. Показано, що транскрипційні фактори, які кодуються *WIN1/SHN1*, регулюють активність дванадцяти генів. Надекспресія *WIN1/SHN1* впливає на збільшення вмісту алканів які є головним компонентом воску арабідопсиса. [59]

Гени *NFXL2* та *SPY* виступають в ролі негативних регуляторів генів *SHN*. *NFXL2* регулює *SHN* шляхом прямої репресії їхньої транскрипції, *SPY* є зв'язаною N-ацетилглюкозамін трансферазою, що модифікує продукти експресії гена *SHN*. [60]

У риса було ідентифіковано чотири гомологи генів *WIN1/SHN1*: *OsWR1*, *OsWR2*, *OsWR3*, and *OsWR4*. Послідовність гену *OsWR1* має високий відсоток подібності до *WIN1/SHN1* (68.8%) та експресується в усіх органах рослини, окрім кореня. За механізмом активації він є індукцибельним геном: його експресія викликається абсцизовою кислотою, посухою або сольовим стресом. Активність *OsWR1* напряду впливає на експресію генів, залучених у синтезі воску та його запасанні: зростає синтез жирних кислот, ефірів C48 та алканів C25, а синтез спиртів зменшується. [61]

Ген *GL15* кодує транскрипційний фактор з родини AP2 та залучений в процесі переходу листків від ювенільної стадії до зрілої. Відомо, що у кукурудзи однією з відмінностей ювенільних листків від зрілих є склад воску. Ювенільні лиски здебільшого містять спирти та альдегіди, а основою восків зрілого листа є воскові ефіри. Було показано, що міРНК *miR172* знижує рівень експресії *GL15*, що впливає на перехід між стадіями дозрівання лисків. [62,63]

Ген *WXP1*, досліджений на *Medicago truncatula*, має низький відсоток подібності з членами родини *WIN1/SHN* (28.6%). Як і *OsWR1*, він є індукцибельним геном, рівень експресії якого зростає у відповідь на абсцизову кислоту, холод та посуху. На трансгенних лініях *Medicago truncatula* показано, що надекспресія *WXP1* призводить до збільшення накопичення листового воску на 29-37% завдяки зростанню синтезу первинних спиртів C30. У той же час відсоток стеблового воску залишається незмінним, що доводить участь

даного гену саме в шляху ацильної редукції, фінальним продуктом якого є синтез первинних спиртів. [64]

В регуляції біосинтезу восків залучені транскрипційні фактори родини MYB. Індуцибельний ген арабідопсиса *AtMYB41* кодує транскрипційний фактор MYB типу R2R3. Експресія гена активується сольовим стресом, посухою та підвищеними рівнями абсцизової кислоти. Транскрипційний фактор *AtMYB41* впливає на експресію генів *LACS2*, *WIN1/SHN* та *ATT1*. Показаний його вплив на підвищення рівня експресії локуса *At3g44540*, що кодує фермент FAR, залучений в шляху синтезу первинних спиртів. Подібним чином цей ген регулює експресію *At4g36610*, що відповідає за процес полімеризації карбонових ефірів у кутикулі. [65]

Ще одним представником R2R3-MYB родини є транскрипційний фактор MYB96. Він активує експресію великої групи генів, які кодують ферменти, залучені в біосинтезі кутикулярного воску. MYB96 виконує роль проміжної ланки між зовнішніми чинниками (посуха, наявність абсцизової кислоти) та експресією цільових генів. Таким чином активується низка генів, що кодують ферменти, залучені у біосинтезі і транспортуванні компонентів воску, наприклад, *KCS1*, *KCS2*, *KCS6*, *KCR1*, *CER1*, *CER3*, *WBC11*, *WSD1* та *LTP3*. [66]

ZmOCL1 є транскрипційним фактором з підкласу HD-ZIP IV гомеодомених білків. Ген *ZmOCL1* експресується в листках на початковій стадії розвитку, а також в квіткових органах кукурудзи. Надекспресія цього гена мало впливає на фенотип кукурудзи, проте змінює склад воску. Зростає відсоток спиртів з дуже довгими ланцюгами та C44/C48 воскових ефірів, відповідно зменшується відсоток альдегідів у складі листового воску. *ZmOCL1* регулює експресію генів, залучених в метаболізмі та транспорті ліпідів, а саме: ген білка переносника ліпідів, ген карбоксиестерази, ген білка переносника фосфатиділінозиту, три гена ABC-транспортера та ген редуктази жирних кислот. [67]

1.2.7. Посттранскрипційна та посттрансляційна регуляція біосинтезу поверхневих восків. Показано, що рослини з мутантним геном *cer7* мають значно нижчі рівні транскриптів генів *CER3/WAX2/YRE*. Білок CER3 необхідний для біосинтезу алканів. Ген *CER7* кодує 3'→5' екзорибонуклеазу, яка є основною субодиницею екзосомного комплексу, що відповідає за процесинг та деградацію РНК. Вважається, що CER7 рибонуклеаза контролює рівні транскрипції *CER3/WAX2/YRE* шляхом руйнування мРНК репресора *CER3/WAX2/YRE*. Два інших гена беруть участь в репресії *CER3*: *RDR1* – кодує РНК-залежну РНК полімеразу 1, яка утворює dsРНК, *SGS3* – супресор гена *silencing3*, який кодує білок, що зв'язується з одноланцюговою РНК для її стабілізації. Після цього одноланцюгова РНК перетворюється на дволанцюгову РНК. У дикому типі попередник кіРНК, що регулює експресію *CER3*, розщеплюється за допомогою CER7: білок CER3 експресується, а кутикулярний віск утворюється. У випадку мутантного генотипу *cer7*, попередник кіРНК не розщеплюється, а використовується для утворення кіРНК за допомогою RDR1 та SGS3. Зменшення біосинтезу воску викликається кіРНК, яка замовчує *CER3*. [68]

1.3. Генетичний контроль ознаки воскова осуга

Для представників підтриби *Triticinae* основними є два шляхи біосинтезу воскової осуги. Як вже зазначалося вище, перший шлях (утворення алканів та спиртів) є активним підчас вегетативної стадії розвитку рослини, тоді як другий шлях (синтез β -дикетонів) діє на генеративній стадії. Рослини, що не мають воскової осуги (зелені) відрізняються від рослин з восковою осугою (блакитні) саме вмістом β -дикетонів. [27]

Генетичний контроль ознаки на сьогодні визначено наступним чином. У пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.) домінантні алелі серії гомеологічних генів, *W1* (знаходиться на хромосомі 2BS), *W2* (2DS) забезпечують наявність

інтенсивного шару осуги. Рецесивні гомозиготи за алелями *w1* та *w2* воскової осуги не мають. [69,70] Існують дані щодо існування третього гену даної серії – *W3*, що розташованого на хромосомі 2BS. Показано, що мутація в цьому гені призводить до зменшення синтезу β -дикетонів на 99%, порівняно з диким генотипом. [51] Друга серія гомеологічних генів – *Iw1* (2BS), *Iw2* (2DS). Їхні домінантні алелі інгібують дію домінантних алелів першої серії, воскова осуга у носіїв цих алелів відсутня. Відомо, що *Iw1* пригнічує біосинтез β -дикетонів або впливає на його регуляцію шляхом продукування міРНК, яка виступає репресором *W1* та *W2*. [1,71,72] Рецесивні алелі *iw1*, *iw2* інгібуючої дії не мають. [70,73,74] Для тетраплоїдної пшениці *T. turgidum* було показано, що існує третій ген-інгібітор воскової осуги – *Iw3*, розташований на короткому плечі 1В хромосоми. Наявність цього гена була підтверджена і у пшениці м'якої. [51] Крім того відомо, що ген *Ws* відповідає за наявність воскової осуги на пшеничному колосі і знаходиться на короткому плечі 1А хромосоми. [75,76] Ортологічні локуси, які відповідають за наявність воскової осуги, наявні на короткому плечі 2Н хромосоми ячменю (*gs1*, *gs6* та *gs8*), довгому плечі хромосоми 7R жита (*wa1*) та кукурудзи (*gl2*). Ген, що відповідає за блакитний фенотип у пшениці твердої, був ідентифікований на 2А хромосомі. [73] Показано, що локус *ser-cqu* ячменю, який відповідає за процеси синтезу β -дикетонів, картований на субтеломерній ділянці хромосоми 2НС і, ймовірно, є ортологом пшеничного гену *W1*. [26] Чужинно-заміщені лінії, в яких хромосома 1D сорту Аврора була заміщена гомеологом з геному *S Ae. speltoide*s або *S^{sh} Ae. sharonensis*, характеризувалися яскраво-зеленим колосом та листками, вкритими восковою осугою. [77] Отже, інгібітор воскової осуги на колосі властивий не лише тетраплоїдній пшениці, а й видам егілопса також. На хромосомі 1BS *T. dicoccoides* локалізовано ген *Ws* [78] і відомо, що це ген-регулятор розвитку воскової осуги на колосі без жодних інших пояснень. Невідомо, чи є алельними гени *Iw3* та *Ws*, адже їхнє розташування на карті хромосоми 1BS приблизно збігається.

Було створено серії майже ізогенних ліній, що мали мутації у *W1*, *W2*, *Iw1*, та *Iw2*. [27,70] Лінії з генотипами *Iw1iw2*, *iw1Iw2* та *w1w2*, що не мали воскової осуги, демонстрували низький рівень β -дикетонів в складі поверхневих восків. Це показує, що рецесивні алелі генів *W* (*w1w2*) або наявність домінантного інгібітору (*Iw1iw2*, *iw1Iw2*) в цих лініях не забезпечують синтез β -дикетонів. У шляху синтезу β -дикетонів гени-промотори воскової осуги можуть брати участь в активації генів, що кодують KCS та генів, залучених у шляху декарбоксилювання, а гени *Iw* можуть виступати їхніми супресорами. [27]

Серед рослин, що не мають воскової осуги, кількість кутикулярних восків варіює в межах 60%. Так, у рослин без воскової осуги з генотипами *Iw1iw2* та *w1w2* кількість воску на поверхні зменшена на 50% та 68% відповідно, порівняно з рослинами, що мають генотип *W1W2*. Це підтверджує припущення, що саме якісний склад воску, а не його кількість чи просто факт наявності його на поверхні зумовлює фенотипне вираження ознаки наявності воскової осуги. Порівняно з рослинами, що мають воскову осугу, кількість β -дикетонів у рослин, які мають два рецесивних гена (*w1w2*) зменшена на 8%, а у рослин з хоча б одним домінантним геном-інгібітором (*iw1Iw2* або *Iw1iw2*) дані компоненти відсутні взагалі. При цьому у рослин з генотипом *w1w2* зростає частка алканів серед воскових компонентів (до 45%), що засвідчує специфічність генів *W* до синтезу саме β -дикетонів. Разом з тим, у випадку наявності хоча б одного гена-інгібітора (*Iw1* або *Iw2*), втрата β -дикетонів компенсується зростанням частки альдегідів та первинних спиртів. Це засвідчує, що *Iw* гени пригнічують синтез β -дикетонів, а також спрямовують їхні субстрати до біохімічного шляху, пов'язаного з ацил-КоА редуктазами. Доведено, що інгібуюча дія *Iw2* є значно потужнішою за *Iw1*. [27]

1.4. Роль алополіплоїдизації у формуванні та стабілізації геномів

Процес утворення гібридів між близькоспорідненими видами супроводжується подвоєнням хромосомного набору, що призводить до алополіплоїдизації. Алополіплоїди об'єднують геноми, що походять від різних видів, та закріплюють гетерозиготний стан, який позначається на поліпшеній їхній життєздатності та стійкості, що в свою чергу сприяє природному добору та доместикації. [79,80] Багато сільськогосподарських видів пройшли процес алополіплоїдизації, такі як пшениці м'яка та тверда, овес, бавовна, цукрова тростина, ріпак, кава, тютюн, тощо. Пшениця м'яка належить до триби *Triticeae*, яка є частиною підродини *Pooideae*. Триба *Triticeae* містить більше 500 видів, багато з яких являють собою наочну демонстрацію внеску міжвидової гібридизації та алополіплоїдизації в еволюційний процес та видоутворення. [81–83]

Молекулярні механізми фенотипних та морфологічних змін в гібридах та нещодавно утворених алополіплоїдах вивчені недостатньо, хоча інтерес до їхнього дослідження останнім часом значно зріс. [84,85] Існують докази того, що гібридизація призводить до різких змін рівнів експресії генів у відповідь на «геномний шок». [20,23,86] Причини цього явища мають як генетичну (структурні та функціональні перетворення) так і епігенетичну (регуляція експресії генів з залученням метилювання, малих РНК, ремодулювання хроматину) природу. [81,87–89] Задokumentованими проявами змін у структурі геномів є зникнення послідовностей, міжхромосомні та внутрішньохромосомні перебудови, серед епігенетичних змін показано відмінності у метилюванні цитозинів, ковалентних модифікаціях гістонових білків, зміну активності малих РНК, та рух транспозонів. [21,84,90–92]

1.4.1. Структурні і функціональні перетворення геному внаслідок алополіплоїдизації. Дослідження штучно створених поліплоїдів, а також вивчення вже секвенованих послідовностей вказує на тісний зв'язок між різноманітними генетичними перебудовами та фактами гібридизації і поліплоїдизації. [15,17,93–95]

Еволюція пшеничних алополіплоїдів відбувалася внаслідок гібридизації та залучення нових геномних варіантів та комбінацій. Прикладами таких процесів є інтрогресії між алотетраплоїдними егілопсами та тетраплоїдною пшеницею та алотетраплоїдними егілопсами між собою. [89,96,97] Причому показано, що різні типи мутацій (точкові мутації, рух мобільних генетичних елементів), які призводять до структурних та функціональних змін, відбуваються у поліплоїдів прискореними темпами у порівнянні з геномами диплоїдними. [81,83,88,90,98,99] Наявність генетичного матеріалу у подвійній та більш високій дозі створює умови для збереження мутацій у мультиплікованих генах, що відкриває можливості для утворення нових комбінацій алелів гомеологічних генів і дає змогу накопичувати та переносити їх у наступні покоління з більшою ймовірністю, ніж це відбувається у диплоїдних видах. Непрямим доказом цього є те, що стійкість пшениці м'якої до радіації є значно вищою ніж у диплоїдних видів роду *Triticum*. [100]

До структурних перетворень відносять втрату некодуючих малокопійних послідовностей, зникнення генів, втрату, скорочення або ампліфікацію повторюваних послідовностей, внутрішньогеномні вставки, втрату рДНК, міжгеномні та внутрішньогеномні транслокації, інтрогресії чужинних хромосомних сегментів. [15,89,101] Так виникають рекомбінантні геноми. Транскрипційна активація та рух транспозонів, належить до генетичних змін, що відбуваються на функціональному рівні через їхній вплив на експресію сусідніх генів. [21,81,102] Епігенетичні перетворення, які безпосередньо не призводять до змін в послідовностях ДНК, стосуються різноманітних модифікацій хроматину, метилювання та деметилювання ДНК, зміни активності малих РНК та транспозонів. [16,103,104]

Алополіплоїдизація викликає спонтанну та не випадкову елімінацію специфічних малокопійних та багатокопійних ДНК послідовностей. Такі послідовності зазвичай наявні в багатьох диплоїдних видів *Aegilops* та *Triticum* і є хромосомоспецифічними. У випадку поліплоїдів, вони локалізуються на кількох парах хромосом одного геному і є геномно специфічними. [90,105] Це

явище було досліджено завдяки порівнянню кількості ДНК у натуральних алополіплоїдів, диплоїдних предків, а також новосинтезованих гібридів. Природні алополіплоїди містять на 2-10% менше ДНК, ніж їхні предки сумарно. [106] Для штучно створених форм характерна подібна тенденція, причому процес втрати ДНК відбувається одразу після утворення гібриду, а надалі кількість генетичного матеріалу майже не змінюється. Показано, що різні геноми зазнають неоднакової втрати: у трітікале пшенична частина залишається відносно консервативною, в той час, як житня зазнає значних втрат та перебудов. [107,108] Показано, що у пшеничних алогексаплоїдах найбільших кількісних змін зазнає субгеном D, а субгеноми A та B майже не змінюються в розмірі. [106] Крім того показано, що на хромосомному рівні елімінація генетичного матеріалу відбувається не випадково. Так, на довгому плечі хромосоми 5B розташовані специфічні послідовності, які утворюють кластери у термінальній та субтермінальній ділянках і відіграють важливу роль в розпізнаванні гомологів у мейозі. [109] Очевидно, що процеси втрати ДНК залежать від проміжку часу після процесу об'єднання, комбінації геномів або типу послідовностей, що аналізуються. Деякі дані демонструють, що елімінація ДНК не спостерігається в перших поколіннях синтетичних алополіплоїдів. [89]

Іншим прикладом перетворень, що зазнають гібридні геноми, є поступові структурні зміни, що відбувалися протягом еволюції алополіплоїдних геномів, які не є характерними для диплоїдних батьківських форм. Прикладами таких подій є внутрішньогеномне перенесення хромосомних сегментів, повторюваних послідовностей, транспозонів або окремих генів. Транслокації між гомеологічними геномами, такі як, наприклад, передача послідовностей з B геному в A геном, ймовірно спровоковані активністю транспозонів, були визначені в дикорослої тетраплоїдній пшениці (*Triticum dicoccoides*) завдяки методиці GISH. [110] Подібні явища визначають пластичність геному та збільшують ймовірність утворення нових генетичних комбінацій після поєднання двох різних геномів. [81]

На функціональному рівні алополіплоїдизація впливає на функцію окремих генів. Поліплоїдизація може призвести до втрати функції (внаслідок делецій та/або утворення псевдогенів), набуття геном нової функції (неофункціоналізація та виникнення нового фенотипу), субфункціоналізації (розподілу деяких предкових функцій серед копій генів). [81,83,111]

1.4.2. Вплив епігенетичних змін на успадкування та прояв ознак.

Результати міжвидової гібридизації як у природних умовах, так і під час експериментів бувають досить непередбаченими. Такі феномени як стерильність, нежиттєздатність, домінування гібридного фенотипу над батьківським пояснюються структурними та функціональними модифікаціями або порушеннями систем епігенетичного контролю. [112] Термін «епігенетичний» стосується змін в експресії генів, які не супроводжуються змінами в послідовності ДНК. Особливу роль в цьому процесі відіграють ковалентні модифікації хроматину (ацетилювання, метилювання та інші модифікації гістонів) та ДНК (метилювання залишків цитозину), які успадковуються, не призводячи до змін на нуклеотидному рівні. [113–115] Ковалентна модифікація гістонів полягає в метилюванні залишків лізину та аргініну, та ацетилюванні залишків лізину, що переважно знаходяться на N-кінцях гістонових білків. Реакції каталізуються ферментативними комплексами метилтрансфераз та деметилаз, ацетилаз та деацетилаз, та призводять до змін в будові хроматину, що врешті позначається на транскрипційному потенціалі. Механізм метилювання ДНК полягає в реакції приєднання метильної групи до залишку цитозину, що каталізується ДНК-метилтрансферазами. [113,116]

Такі явища, як замовчування генів безпосередньо пов'язані з метилюванням ДНК у визначеному локусі. Залежність генної експресії від рівня метилювання ДНК також спостерігається на прикладі створених штучних алополіплоїдів у пшениці і арабідопсису. Експериментальні дані свідчать про те, що лише 3 (0,4%) з 700 проаналізованих генів перебували у замовчуваному стані. Такі зміни в рівнях генної експресії можуть пояснити появу нетипових фенотипів, що спостерігається зі зміною плоідності рослини. [15,117]

Доведено, що варіабельність метильованих ділянок ДНК є стабільною, вона передається з покоління в покоління. [84] У рослин біотичні та абіотичні стреси є тригерами змін рівнів метилювання цитозину, що у багатьох випадках призводить до адаптації протягом індивідуального розвитку. Такі зміни, що відбуваються в ДНК соматичних клітин, можуть бути успішно переданими до статевих клітин і впливати на наступні генерації. [114] Природні популяції, в яких відбувається гібридизація та поліплоїдизація, є носіями поліморфних епіалелів (метилюваних ділянок), що свідчить про значну роль епігенетичної мінливості у еволюційному процесі. [84,113]

Окремо потрібно відзначити функції молекул, які мають назву малі РНК. До цієї групи належать мікроРНК (miRNA), короткі інтерферуючі РНК (siRNA), в тому числі зв'язані з повторами, транс-активуючі малі інтерферуючі РНК (ta-siRNA) та природні антисенсові кіРНК (nat-siRNA). Всі вони виступають у ролі регуляторних молекул, механізм дії яких полягає або в деградації цільової мРНК або інгібуванні процесу трансляції мРНК. [16,118] У рослин кіРНК можуть транскрибуватися з послідовностей транспозонів та перицентромерних ділянок за участі РНК полімерази IV. Одним з механізмів дії малих РНК є РНК-залежне метилювання ДНК та модифікація хроматину, що пригнічує активність мобільних генетичних елементів (кіРНК) та регулює експресію власних генів, найчастіше – транскрипційних факторів (міРНК). [119–121]

Було досліджено, що, враховуючи властивості міРНК та їхню роль у еволюції, дані молекули відіграють провідну роль у процесах швидкої адаптації до різного роду стресів, і тому їхні гени широко розповсюджені у рослинному геномі. [103] На підтримку цієї думки була ідентифікована послідовність некодуючої РНК, яка бере участь у регуляції стресової відповіді у древньої рослини *Craterostigma plantagineum*. Дана послідовність бере участь у негативній регуляції генів стійкості до нестачі вологи. Також за нуклеотидним складом вона є схожою на SINE-подібні ретротранспозони. [122]

1.4.3. Менделівське успадкування при утворенні міжвидових гібридів. Прикладами процесів, що є наслідком зміни експресії генів, але не пов'язані зі змінами на рівні нуклеотидних послідовностей є ядерцеве домінування, геномний імпринтинг та парамутації. [84]

Досить поширеним є явище ядерцевого домінування. Воно проявляється у багатьох гібридних організмах, коли в їхньому геномі від двох батьківських видів з'являються дві нетранскрибовані повторювані ділянки, що кодують рРНК. Втрата здатності до транскрипції призводить до втрати ядерця одного з геномів поліплоїдного організму, причому вибір батьківського геному, інформація якого буде замовчуватися, є не випадковим. Дослідження, проведені на синтетичних алополіплоїдах *Brassica* та *Arabidopsis* [123,124], показали, що причиною ядерцевого домінування є вибіркова активація замовчуваних генів рРНК внаслідок ковалентних модифікацій хроматину та ДНК, а саме метилювання цитозину та ацетилювання гістонів. [124]

Явище геномного імпринтингу полягає в вибірковій експресії генів в залежності від їхнього походження (від матері чи від батька), що також має епігенетичну природу. Переважно геномний імпринтинг спостерігається в ендоспермі, проте також показано, що частина генів *Arabidopsis thaliana* [125], рису [126] та кукурудзи [127] імпринтується на ембріональній стадії. Однакові алелі одного гена, що відповідають за синтез запасного білка зеїну у кукурудзи, а також гена *R*, що регулює синтез антоціаніну, експресуються не рівноцінно, коли материнський організм має $2n$, а батьківський n , і внаслідок об'єднання утворюється триплоїдний ендосперм. Відповідно до незвичайної плідності ендосперму, такі спостереження спочатку відносили до поняття «доза гена», але потім з'явилася допоміжна гіпотеза, яка пояснювала це явище. Згідно з нею послідовність ДНК у визначеному локусі несе додаткову інформацію. Хоча послідовність ДНК залишається незмінною при утворенні материнського або батьківського гаметофіту, під час цього процесу на послідовності залишаються відбитки або імпринти, які вказують на її походження, та зумовлюють таким чином різницю в експресії цієї послідовності. Зараз є зрозумілим той факт, що

імпринуються (замовчуються) гени ендосперму, що походять від батьківського організму, і для них характерним є мовчання під час нормального розвитку ембріона та проростання насінини. [115]

Парамутації – стійкі зміни властивостей алеля певного гена внаслідок взаємодії з іншим алелем того ж гена, що не супроводжується змінами на нуклеотидному рівні. Загалом, у даному процесі беруть участь парамутагенні та парамутабельні алелі. Парамутагенний алель у порівнянні з парамутабельним характеризується зниженням експресії гена. Коли парамутагенний та парамутабельний алелі зустрічаються у гетерозиготі, парамутагенні алелі мають здатність перетворювати парамутабельні алелі в парамутагенні, що проявляється в значному зниженні рівня експресії перетвореного алелю. При цьому перетворений алель набуває властивостей парамутагенного і передається нащадкам саме як парамутагенний. Модифікований алель у наступних поколіннях проявляє здатність до модифікації парамутабельних алелів. Як правило, цей новий стан алелю є стабільним, хоча він і має здатність спонтанно перетворюватися у свій вихідний стан, тобто стати знову парамутабельним. [128,129] У кукурудзи парамутації були найкраще вивчені на прикладі двох генів: *b* та *r*. Обидва гени кодують транскрипційні фактори, що регулюють синтез антоціанових пігментів. У цих локусах парамутабельні алелі мають вищий рівень експресії, ніж парамутагенні. [130] На молекулярному рівні явище парамутацій пов'язують з наявністю певних повторів, які можуть бути розташовані навіть поза межами структурної частини гена. Метилування повторів призводить до транскрипційної дезактивації гена. Парамутабельний алель має повтор в неметильованому стані та є транскрипційно активним. Вплив парамутагенного алелю полягає у ініціації метилування раніше неметильованих повторів та замовчуванню раніше активно транскрибованого алеля. [131] Показано, що сила парамутагенності частково визначається числом повторів, які входять до складу алелю, оскільки рекомбінантні алелі зі зменшеним числом повторів виявляють слабкі парамутагенні властивості. Крім парамутагенних та парамутабельних реєструється ще нейтральний алель для

генів, здатних до імпринтингу. До складу нейтрального алеля не входять повтори і він не може піддаватися впливу з боку парамутагенного алеля. Аналіз рівня метилювання ДНК і структури хроматину у цих повторах показав, що у транскрипційно активних парамутабельних *B-I* алелях повтори є гіпометильованими з відкритою структурою хроматину, як і показували результати дослідження з використанням ДНКазі I. Що ж до транскрипційно малоактивного парамутагенного *B'* алелю, то він має високий рівень метилювання і більш згорнуту структуру хроматину. Хоча точний механізм парамутацій залишається не до кінця зрозумілим, наведені вище результати досліджень свідчать про те, що ці явища пов'язані зі змінами у структурі хроматину. Різниця у рівнях метилювання ДНК відображає зміни у структурі хроматину і може слугувати механізмом, який гарантує стабільну передачу генетичної інформації наступним поколінням. [132]

Ще одним прикладом парамутацій є зміна експресії гена *Sr6*, який зумовлює стійкість до стеблової іржі, у пшениці м'якої. Відомо, що дія цього гена залежить від таких чинників, як температура та освітлення. Наприклад, лінія, що має ген *Sr6* виявляється стійкою до лінійної іржі за температури 18°C, але чутливою за 24°C. Ген може бути домінантним або рецесивним і зумовлювати стійкість, в залежності від раси патогену і напрямку схрещування. Дослідження засвідчили, що локус *Sr6* є складним, і його дія залежить від наявності *sr6* алелів у гетерозиготі. При деяких комбінаціях схрещувань спостерігається такий характер прояву стійкості, як і у випадках парамутацій. [133]

1.4.4. Гетерозисний ефект та феномен низької життєздатності гібридів. Як було зазначено вище, генетичний контроль ознаки воскова осуга у *Triticum aestivum* здійснюється групою гомеологічних генів, локалізованих на різних субгеномах. Така ситуація є характерною для всіх алополіплоїдів, у котрих велика кількість локусів представлена у множинній кількості. Це може сприяти поліпшенню існуючих або утворенню нових ознак, не характерних для батьківських організмів. У випадку наявності гомеоалелів в різних субгеномах,

експресія гомеологів може відрізнятися від середньобатьківського значення в більшу чи в меншу сторону. Це призводить до виникнення гетерозисного ефекту якщо результат від такої експресії є позитивним, і до низької життєздатності гібрида якщо результат є негативним. [79] Гетерозис добре досліджений на генах, які кодують функціональні протеїни, що збільшують біохімічний потенціал гібридних рослин. Міжсубгеномна взаємодія генів має пряме відношення до утворення селективно корисних ознак. Унікальні властивості глютенових білків, велика кількість колосків на колосі, стійкість до широкого спектру умов середовища є прикладами неадитивної дії генів, що походять з різних (суб)геномів. Таким чином, у алогексаплоїдів результатом взаємодії генів внаслідок поєднання кількох геномів може бути поява нових ознак, не характерних для батьківських диплоїдних видів. Прикладом може бути вищезгадані унікальні хлібопекарські властивості зерна пшениці м'якої, що проявляється лише на гексаплоїдному рівні. [79,134] Іншим прикладом є наслідок об'єднання геному D *Ae. tauschii* з тетраплоїдною пшеницею (донор геномів A та B), яке дозволило суттєво розширити ареал вирощування пшениці на північні райони. Разом з тим, у лініях-похідних алогексаплоїдів нерідко спостерігається поновлення активності замовчаних генів, що є результатом нових цис-транс взаємодій, а також епігенетичних змін. Низка досліджень стосується порівняння рівнів експресії в алополіплоїдах, порівняно з батьківськими формами. В дослідженні [135] показано, що у синтетичної гексаплоїдної пшениці у першому поколінні 132 (16%) із 825 проаналізованих генів проявляли неадитивну експресію. В інших дослідженнях щодо аналізу десятків тисяч транскриптів в кількох лініях синтетичної гексаплоїдної пшениці було показано, що 7% і 19% вивчених генів демонстрували неадитивну експресію. [136] Генетичний аналіз штучного алогексаплоїда *T. turgidum*-*Ae. tauschii* показав, що експресія значної частки генів (7,7%) була змінена відносно середньобатьківського значення, і що гени *Ae. tauschii* найбільше були піддані цим змінам. Загалом різні дослідження демонструють, що відхилення в експресії генів між батьківськими і гібридними формами в середньому є

загальною рисою, хоча і оцінюються в різних алогексаплоїдах по-різному. [135] Що стосується природних алогексаплоїдних пшениць (наприклад, сорту Chinese Spring), показано що замовчуваними є одні і ті самі гени. [137] Аналіз експресії генів аналогічних зразків природних і синтетичних пшениць показав, що відповідний рівень експресії встановлюється після алополіплоїдизації і підтримується протягом поколінь. [138] Деякі гени, які перебували в замовчуваному стані в батьківських видах, ставали активними в новоутвореному алогексаплоїді. [105,137]

В той же час, надмірна експресія гомеоалелів може призводити до утворення проміжних фенотипів за деякими з ознак. [139] Гібридні рослини часто не здатні давати нащадків і проявляють зменшену життєздатність. Як правило, таке явище пояснюється взаємодією між двома епістатичними локусами, що походять від різних батьків. [140] Показана роль генів резистентності, необхідних для індукції некрозу при деяких внутрішньовидових схрещуваннях у *Arabidopsis thaliana*. Епістатична взаємодія генів *RPP1* та *SRF3* індукує некроз гібрида. Таким чином гібридний некроз викликається особливими алелями генів резистентності, які індують аутоімунні відповіді при епістатичній взаємодії з іншими визначеними локусами. [141] Іншим прикладом є некроз типу I у пшениці, що викликається комплементарними генами *Ne1-Ne2*, епістатичне поєднання яких викликає також аутоімунну відповідь та супроводжується утворенням реактивних форм кисню. [140] Триплоїдні гібриди між тетраплоїдною пшеницею та дикорослим диплоїдом *Ae. tauschii* демонструють аномальний ріст, гібридний некроз та гібридну стерильність. [142] Припускається, що основну роль у вищезгаданих процесах відіграють малі некодуючі РНК. [143] У пшениці було досліджено, що число молекул міРНК зростає разом з рівнем плоїдності. У алотетраплоїдного гібрида *Arabidopsis suecica* загальна кількість міРНК в F_1 є значно нижчою, ніж в у F_7 , що може свідчити про функціональну несумісність механізмів утворення міРНК одразу після гібридизації, яка відновлюється в більш пізніх поколіннях. [144]

1.5. Роль транспозонів в структурних та функціональних змінах геному

У рослин мобільні генетичні елементи займають до 90% від загального об'єму геному. Серед усіх типів мобільних генетичних елементів найбільш розповсюдженими є MITE-елементи та ретротранспозони з довгими термінальними повторами (LTR). Останні, до того ж, мають найбільші розміри, що робить їхній внесок до геному найвагомим серед усіх досліджених мобільних послідовностей. [145] Розповсюджені мобільні генетичні елементи по геному нерівномірно. Найбільша їхня щільність спостерігається в центромерних та теломерних ділянках хромосом. Не викликає сумнівів те, що ампліфікація транспозонів призводить до збільшення розмірів геному. Існують механізми зменшення геному за рахунок видалення з нього транспозонів. Одним з таких механізмів є гомологічна рекомбінація між довгими термінальними повторами одного і того самого ретротранспозона, що призводить до видалення внутрішньої ділянки цього елемента. Якщо рекомбінація відбувається між двома такими елементами, це може призвести до втрати сусідніх послідовностей, викликати хромосомні перебудови, як внутрішньохромосомні, так і міжхромосомні, включаючи дуплікації, інсерції та транслокації. [25,98,146,147] Іншим прикладом негативного ефекту від активності транспозонів є ініціація процесу ектопічної рекомбінації, яка є механізмом хромосомних перебудов. Ініціація відбувається внаслідок того, що громіздкі мобільні генетичні елементи здатні «захоплювати» і переносити відносно великі кількості геномної ДНК до нових сайтів. [148]

Аналіз експресованих послідовностей показує, що сліди транспозонів знаходяться у великій кількості транскриптів пшеничних алогексаплоїдів. [149] Відомо, що рівень транскрипції ретротранспозонів з довгими термінальними повторами є вищим у синтетичних тетраплоїдах, порівняно з батьківськими диплоїдними видами. [150] Транскрипція LTR-ретротранспозона *Wis 2-1A* може

впливати на експресію сусідніх генів у пшеничних алополіплоїдах, якщо дані послідовності знаходяться поряд. У такому випадку зчитування генетичної інформації починається з фланкуючих послідовностей транспозона, що призводить до утворення нетипового транскрипту. [151] Показано, що кілька видів транспозонів здатні до активної транспозиції та проліферації. Це *Sunfish* у алотетраплоїдних арабідопсисах [152] та *Viju* ретротранспозони у алогексаплоїдній пшениці. [79]

В ході еволюції діяльність транспозонів зводилася до більш-менш нейтральної щодо геному, захисна система якого також розвивалася в напрямку попередження особливо високих та небезпечних рівнів транспозиційної активності. Звичайно, захисна система, яка викликає формування гетерохроматину у послідовностях з високою активністю транспозонів, сама може спричиняти шкідливі наслідки шляхом замовчування генів, які розміщені у сусідніх послідовностях.

Інтеграція транспозонів всередину кодуючих генів або близько до них призводить до появи нових фенотипових варіантів як у дикорослих рослин, так і у тих, що культивуються. [21] Хоча існує значна різниця між популяціями, що культивуються, та рослинами, геном яких змінюється безпосередньо під впливом природного добору, точка зору про те, що мобільні генетичні елементи можуть поповнювати пул генетичної інформації і привносити зміни в кодуючі ділянки, знайшла підтримку у доказах, що рештки транспозонів дуже часто зустрічаються в еухроматинових ділянках хромосом. [153] Біоінформатичні дослідження показали, що багато рослинних генів мають високу спорідненість до транспозонів. [154] Були ідентифіковані рослинні гени, які, скоріш за все, мають кодуючі регіони, що були отримані з копій послідовностей ретротранспозонів. Це ж дослідження підтвердило, що більшість генів мають похідні від мобільних генетичних елементів у послідовностях, що їх фланкують. У деяких випадках дані послідовності мають прямий регуляторний ефект на характер експресії генів. [155] Цікавим є приклад гена *FWA*, який, як було показано, є близькоспорідненим з послідовністю ретротранспозонів SINE.

Також були знайдені міРНК, які пов'язані з цією послідовністю. Було показано, що імпринтинг та транскрипція гену *FWA* безпосередньо контролюється ретротранспозонною послідовністю. [156] Кодуючі гени можуть адаптувати інтегровані або сусідні послідовності мобільних генетичних елементів, роблячи їх головною рушійною силою для утворення нових варіантів і різноманітності у геномі. Є думка, усі рослинні гени мають у своєму складі «спадщину» від мобільних генетичних елементів. [155]

Подібно до будь-яких послідовностей що експресуються, транспозони мають різну активність, яка залежить від стадії індивідуального розвитку, тканини, а також від багатьох зовнішніх та внутрішніх факторів. [147] Наприклад, деякі LTR-елементи є найбільш активними під час розвитку чоловічого гаметофіту та при поділі клітин кореня. Активність транспозонів індукується також під час абіотичного і біотичного стресу. [145]

Поновлення активності транспозонів може виникнути внаслідок віддаленого схрещування, коли значне збільшення розміру генома призводить до тимчасової активації транспозонів. [98] Ламкість хромосом також має подібний ефект: збільшення кількості репараційних подій у таких клітинах, можливо, призводить до пригнічення активності метилаз та інших факторів формування гетерохроматину. Активація рослинних ретротранспозонів нерідко відбувається внаслідок проникнення інфекції та пошкодження клітинної стінки. [157]

Мобільні генетичні елементи у рослин зберігають свою активність за звичайних умов і можуть ініціювати роботу як власних транскриптів, так і ділянки господарського геному, що знаходяться поряд з їхніми фланкуючими послідовностями. [148,155] Активність транспозонів впливає на структуру гетерохроматину. Геномний стрес, викликаний зміною геномної структури, призводить до активації мобільних генетичних елементів. [23,147]

Якщо наслідком вбудовування транспозона в геном є перебудова якогось рослинного гена чи геному загалом, то ступінь такої перебудови залежить не тільки від активності транспозонів, а і від тканини в якій така активність

відбувається. Існує, принаймні, два шляхи регуляції активності мобільних елементів, один з яких залежить від транспозона, а інший забезпечується рослинним організмом. Перший полягає у схильності транспозонів до власної інактивації. Другий – у процесі епігенетичного замовчування активності транспозона. Прикладом є той факт, що в геномі кукурудзи, в якому близько 70% ДНК походить від мобільних генетичних елементів, як правило, разом із сотнями неактивних Ds-елементів, активним виявляється лише один Ac-елемент. [21] Абсолютна більшість LTR-ретротранспозонів також є дефектними, а саме: містять внутрішні делеції та мають перебудови, які перешкоджають активності даних елементів. [157]

Відсутність активності транспозонів може спостерігатися і у тих випадках, коли вони входять до складу рослинного генома в структурно інтактному стані. Це пов'язано з C5 метилюванням цитозину, який міститься в транспозонних послідовностях у ділянці 5'-CG-3' та 5'-CNG-3. Метилювання цитозину, будучи загально визнаним механізмом епігенетичних змін, який пригнічує активність генів, призводить до інактивації і мобільних генетичних елементів також. [21] Цей процес добре вивчено на прикладі *Mu* елементів кукурудзи. Те, що причиною інактивації цього транспозона слугує епігенетична модифікація, підтверджується тим, що при втраті метильних міток, елемент знову стає активним. [136]

Дослідження показують, що метилюванню піддаються частіше за інших CCGG-ділянки, які є фланкуючими послідовностями кількох відомих родин транспозонів. Метильовані ділянки транспозонів *Balduin* (належить до *CACTA* підродини), *Apollo* (*MuDR/Foldback* підродина), *Thalos* (родина *Tc1/Mariner*) були проаналізовані у алополіплоїдної пшениці. Сайти CCGG, що фланкують усіх трьох представників зазначених родин транспозонів, піддавалися суттєвому гіперметилюванню у перших чотирьох поколіннях після створення алогексаплоїдів. Разом з тим спостерігали значне гіпометилювання тих самих послідовностей протягом чотирьох поколінь у випадку штучного алотетраплоїда. Гіперметилювання даних елементів у синтетичних

алогексаплоїдах може бути пов'язано з їхньою низькою транскрипційною активністю. [98]

Зміни у рівнях метилювання цитозину у різних ділянках геному, що супроводжує процеси стабілізації новостворених геномів, досліджено на багатьох поліплоїдних видах, в тому числі і пшениці. [105] Показано, що у перших поколіннях гібридів або у синтетичних алополіплоїдах пшениці, зміни у рівнях метилювання цитозину спостерігаються у 13% локусів. Подібна картина є характерною як для будь-яких випадкових локусів, так і для регіонів, що фланкуються послідовностями ретротранспозонів *Viju* та *BARE-1*. Частота змін у метилюванні сягає від 2% до 8,5% залежно від лінії та локусу, з тенденцією до гіперметилювання. Проте, різні показники метилювання спостерігалися у 43% проаналізованих сайтів інсерції *Viju*: низький рівень метилювання був характерним для перших трьох поколінь штучних алогексаплоїдів, а у наступних поколіннях він підвищувався. Загалом, у штучностворених пшеничних амфідиплоїдах епігенетичні зміни на рівні метилювання ДНК є досить розповсюдженими, але більшість з проаналізованих локусів, яких торкаються такі зміни, належать до послідовностей транспозонів, або ділянок, що не пов'язані з відомими білок-кодуєчими генами. [158]

Окрім метилювання послідовності транспозонів зазнають значних перебудов внаслідок негомологічної рекомбінації підчас алополіплоїдизації. Наявність таких перебудов показана у тютюну, родини *Spartina* та у *Triticale*. [23,93] У штучностворених пшеничних алогексаплоїдах та похідних лініях, перебудови у ділянках, які містять послідовності ретротранспозонів, відбуваються раптово і масштабно у перших поколіннях після об'єднання геномів. У наступних поколіннях на фоні зниження рівня метилювання, відбувається видалення зазначених послідовностей. [158] Це вказує на прямий зв'язок між метилюванням та перебудовами, що відбуваються після поліплоїдизації. Механізм даних процесів до кінця не з'ясований. Одним з пояснень може бути те, що деметилювання сприяє утворенню відкритої

хроматинової структури послідовностей транспозонів, що робить їх доступною для видалення.

Окрім змін у рівнях метилювання та транскрипційної активності транспозонів дослідження стосуються їхньої транспозиційної активності. Зміни у рівні метилювання і обмежена транспозиційна активність транспозонів *Sunfish* досліджена на поліплоїдному арабідопсисі. [152] Збільшення копійності *Tnt1* ретроелементів спостерігається у поліплоїдного тютюну. Інформації щодо транспозиційного вибуху у пшениці не повідомлено. З цього можна зробити висновок, що активність тих чи інших мобільних генетичних елементів під час стабілізації геному після алополіплоїдизації зумовлюється належністю їх до специфічної родини. [23]

Окремо слід зазначити роль малих РНК, що належать до р4-siRNA, в регуляції активності транспозонів. Шляхом аналізу послідовностей, що кодують малі РНК у арабідопсису та рису, було показано, що вони скоріш за все виникають із інвертованих повторів транспозонів. Були ідентифіковані малі РНК, які за своєю структурою займали проміжне положення між послідовностями інвертованих повторів ретротранспозонів і послідовностями, що кодують кіРНК. [159]

Основний механізм дії кіРНК полягає у тому, що вони виступають посередником у РНК-спрямованому метилюванні цитозину (кіРНК взаємодіє з білковим комплексом AGO4, ДНК-полімеразою V та метилтрансферазою DRM2), що призводить до хроматинових перебудов і утворенню гістонових модифікацій, та замовчування послідовностей мобільних генетичних елементів. [160] Показано, що активація транспозонів в клітинах пилку призводить до зростання експресії кіРНК для забезпечення інактивації транспозонів в майбутніх поколіннях. [161] Порівняння поширення кіРНК у природному та штучному алотетраплоїді арабідопсиса показало, що різке підвищення кількості та активності даних послідовностей спостерігається в F₁ штучної форми. В наступних генераціях активність кіРНК спадає і відновлюється до рівня, як у природному алотетраплоїді. Така втрата регуляторних послідовностей може

бути пов'язана з геномним шоком та нестабільністю у перших поколіннях гібриду. [144] За іншими даними, порівняльний аналіз кіРНК батьківських форм, міжвидових гібридів та штучних пшеничних алогексаплоїдів показав, що в першому поколінні кількість кіРНК, пов'язаних з послідовностями транспозонів, значно зменшується у випадку саме алополіплоїдизації. [16]

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Рослинний матеріал

У роботі було використано наступний рослинний матеріал:

1) Геномно-заміщені амфідиплоїди Авродес (AABBSS), Аврозис (AABBS^{sh}S^{sh}), Авролата (геном AABB^{UU}), Авротіка (геном AABB^{TT}) (рис. 2.1, схема створення).

2) Геномно-доданий амфідиплоїд Міоза з геномом AABB^{MM}. Був створений при подвоєнні кількості хромосом у гібрида (*T. durum* лінія Mutiko italicum 59h132 x *Ae. comosa*). [9]

3) Геномно-додані амфідиплоїди серії МІТ з геномом AABB^{DD}. Були створені при подвоєнні кількості хромосом у гібрида (*T. durum* лінія Mutiko italicum 59h132 x *Ae. tauschii*). [7]

4) Гексаплоїдні інтрогресивні лінії пшениці м'якої, створені за схемою, наведеною на рисунку 2.2, походять від геномно-заміщених амфідиплоїдів Авродес, Аврозис, Авролата.

5) Рослини F₁ та F₂ від схрещування рослин інтрогресивних ліній з контрастними за ознакою наявності/відсутності воскової осуги фенотипами одна з одною та з сортом Аврора.

6) Рослини F₁ та F₂ від схрещування амфідиплоїдів Міоза з контрастними фенотипами.

7) Рослини F₁, F₂, F₃ та F₄ від схрещування амфідиплоїдів Авротіка з контрастними фенотипами.

8) Сорт гексаплоїдної озимої пшениці м'якої Аврора (*Triticum aestivum* L.).

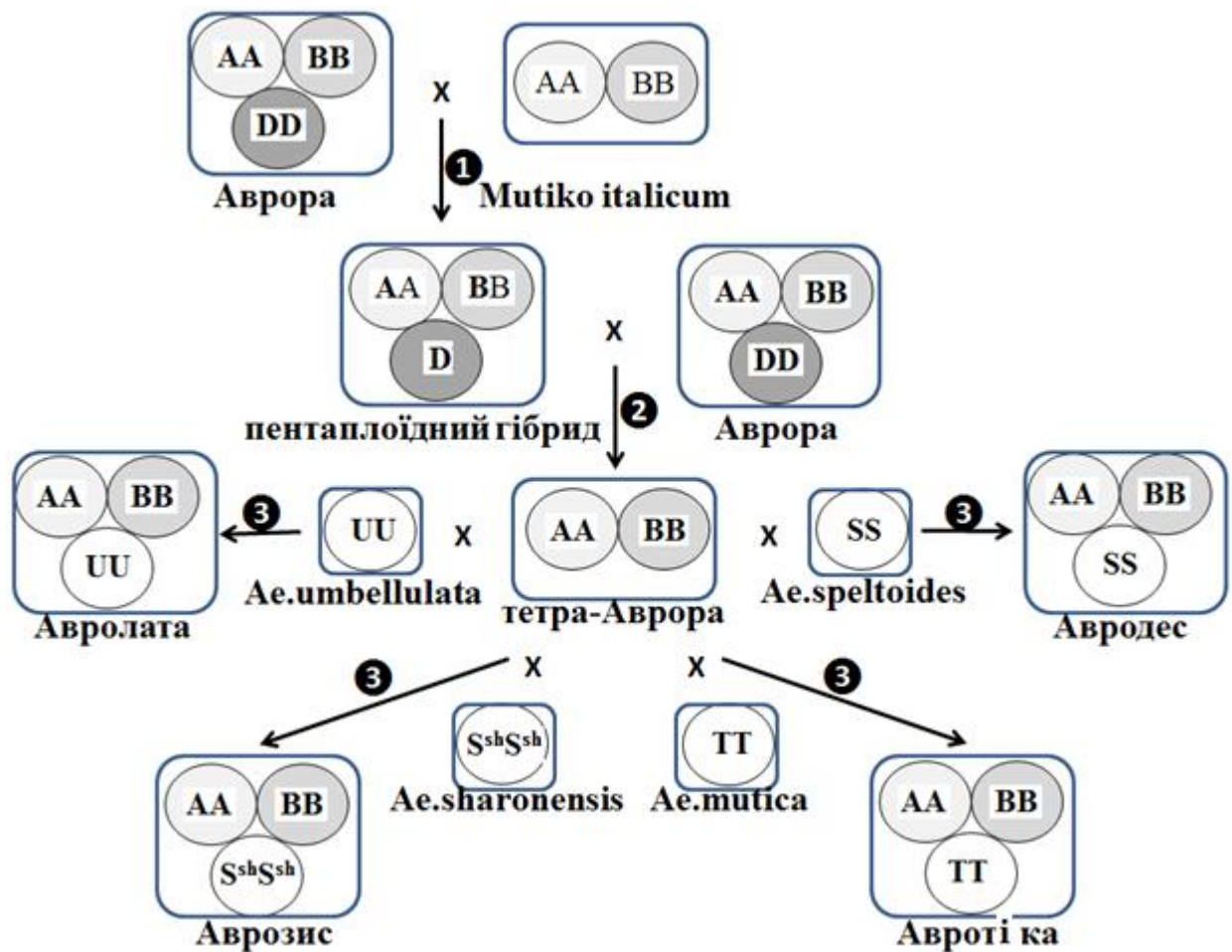


Рис. 2.1. Схема створення геномно-заміщених амфідиплоїдів на основі геному AABBDD сорту Аврора. ❶ Пентаплоїдний гібрид AABBDD отримували від схрещування *T. aestivum* сорту Аврора та *T. durum*, лінія Mutiko italicum 59p132. ❷ Пентаплоїд шість разів бекросували з сортом Аврора, серед нащадків від самозапилення рослин шостого беккросу цитологічно виділяли тетраплоїди AABB. ❸ Тетра-Аврору схрещували з одним з вказаних диплоїдних егілопсів, гібрид F₁ обробляли колхіцином для утворення амфідиплоїду з субгеномами А та В від сорту Аврора та третім субгеномом егілопса. [8]

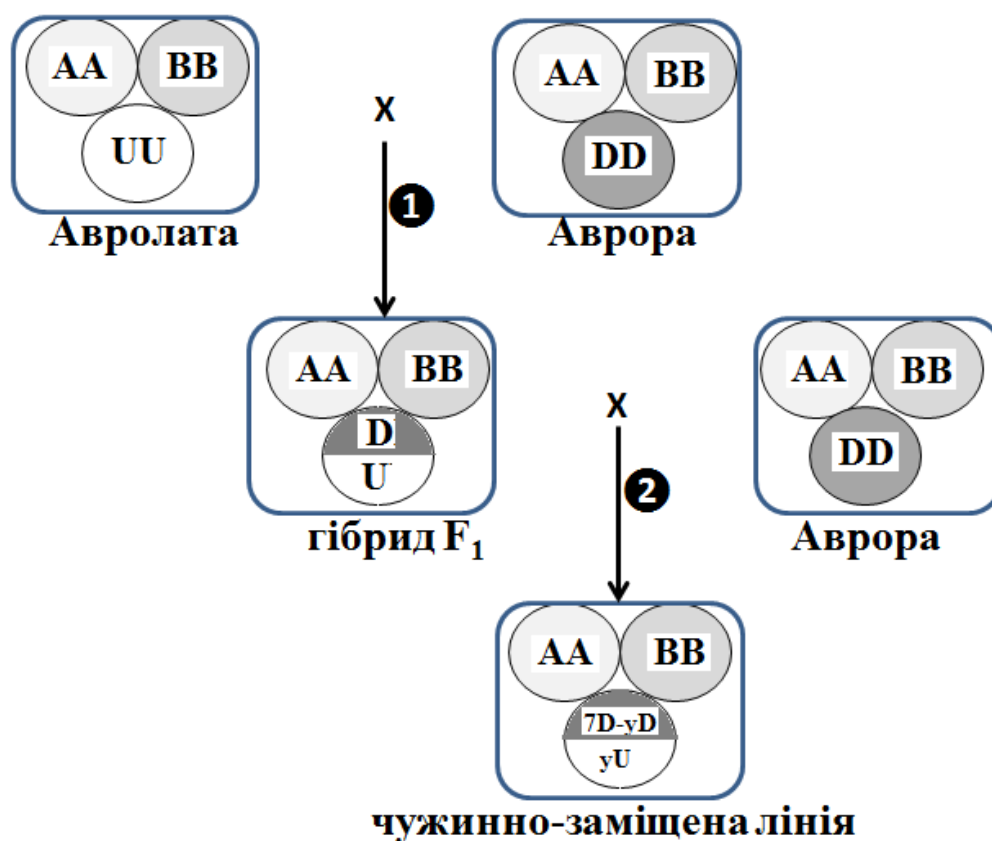


Рис. 2.2. Схема створення чужинно-заміщених і транслокаційних ліній пшениці з використанням геномно-заміщеного амфідиплоїда на прикладі Авролати. ❶ гібрид F₁ від схрещування Авролати і Аврори бекросували з Аворою 1-3 рази до відновлення самофертильності. ❷ Серед нащадків від самозапилення бекросних рослин цитологічно виділяли 42-хромосомні рослини, доводили, що «у» пар хромосом D заміщені на «у» пар хромосом U та перевіряли на наявність транслокацій. [8]

2.2. Реактиви, розчини, обладнання

У роботі були використані наступні прилади: центрифуги “Eppendorf 5418”, “Eppendorf Mini Spin Plus” (Eppendorf, Німеччина), спектрофотометри “СФ-2000” (ОКБ “Спектр”, Росія) та “NanoDrop 1000” (“Thermo Scientific”, США), ампліфікатори “Eppendorf Mastercycler Personal” (“Eppendorf”, США) та “Applied Biosystem 2720 Thermocycler” (“Applied Biosystem”, США), прилади для електрофорезу та аналізу гелів “Pharmacia Biotech ALF Express Genetic

Analyzer” Amersham Pharmacia Biotech”, США), “Horizon 1114” (“Life Technologies”, США), рН-метр “Elwro N5123” (“Elwro”, Польща), електрична плита ЕПЧ 1-1,5/220 (ТЕРМІЯ, Україна), водяна баня БЛ-100 (НХП, Київ), лампа ультрафіолетова “UV/White Light Transilluminator TMW-20” (UVP, США), джерело живлення для електрофорезу (Bio-Rad, США), генератор льоду FM-120 DE-50 “ICEMARKER” (HOSHIZAKI, Японія), цифрова фотокамера (Nikon, Японія) та ваги лабораторні AD-60 (AXIS, Польща).

В роботі були використані хімічні реактиви компаній “Serva” (Німеччина), “Sigma” (США), “Amersham Pharmacia Biotech” (Швеція/Великобританія), “Fermentas”/”Thermo Scientific” (Литва), вітчизняні та китайські реактиви кваліфікації “хч” і “осч”, які були використані для приготування наступних розчинів:

Агарозний гель для електрофорезу: агароза 1,7% на 1X SB-буфері – 70 мл або 270 мл в залежності від розміру геля.

20X SB-буфер: тетраборат натрію – 28,2 г, борна кислота – 10 г, об’єм доводили дистильованою водою до 1 л.

Буфер для нанесення зразків в слоти агарозного гелю: 60% гліцерин, 0,25% бромфенолового синього та 0,25% та ксиленціанолу

Поліакриламідний гель для електрофорезу у денатурованому середовищі: акриламід 30% на 1X ТБЕ-буфері.

5X ТБЕ буфер: гідроксиметил амінометан-НСІ (трис) – 54 г, борна кислота – 27,5 г, ЕДТА(етилендіамін тетраацетат) 0,5М, рН 8,0 – 20 мл, об’єм доводили дистильованою водою до 1 л.

Буфер для нанесення зразків в слоти акриламідного гелю: формамід – 950 мкл, ЕДТА (0,5 М, рН 8.0) – 50 мкл, 0,25% бромфенолового синього та 0,25% ксиленціанолу.

Фіксатор для проявлення продуктів ПЛР, розділених в акриламідному гелі в денатурованих умовах: 96% етиловий спирт – 100 мл, оцтова кислота – 5 мл, об’єм доводили дистильованою водою до 1 л.

Розчин для забарвлення продуктів ПЛР, розділених в акриламідному гелі: нітрат срібла – 1,5 г, формалін – 2,4 мл (додається безпосередньо перед використанням), об'єм доводили дистильованою водою до 1 л.

Розчин для проявлення продуктів ПЛР, розділених в акриламідному гелі: гідроксид натрію 45% – 33 мл, формалін – 2 мл (додається безпосередньо перед використанням), об'єм доводили дистильованою водою до 1 л.

ЦТАБ-буфер для виділення ДНК: ЦТАБ – 2 г; EDTA (0,5 М, рН 8,0) – 4 мл; трис-НСІ (1 М, рН 8,0) – 10 мл; NaCl (5 М) – 8 мл, об'єм доводили дистильованою водою до 100 мл.

Суміш для депротейнізації розчину ДНК: суміш хлороформу і ізоамілового (ізопентилового) спирту у об'ємному співвідношенні 24:1.

ТЕ-буфер для розчинення ДНК: трис-НСІ (1 М, рН 8,0) – 10 мл, EDTA (0,5 М, рН 8,0) – 2 мл.

2.3. Фенотипна оцінка рослинного матеріалу

Методи польового дослідження рослинного матеріалу за ознакою воскова осуга включають в себе польову фенотипну оцінку щодо наявності або відсутності воскової осуги та гібридизацію (рис 2.3).

Оцінювання за наявністю/відсутністю воскової осуги було виконано на популяціях, що розщеплювались за досліджуваною ознакою. Всі рослини етикетувалися. На етикетці позначався порядковий номер рослини (1, 2, 3, 4 і т.д.) та оцінка ознаки за допомогою спеціального шифру. (1 – позначаються блакитні рослини, 2 – зелені, 3 – блакитні рослини, що мають зелений колос). Дані з етикеток переносилися в польовий журнал, а потім у таблицю у Excel.

На основі результатів оцінки визначається характер та співвідношення розщеплення, а також відбирається матеріал, який є контрастним за ознакою інтересу, для проведення гібридизації (рис 2.4).



Рис 2.3. Вигляд пшеничних рослин з контрастними фенотипами за ознакою інтересу на стадії виголошування: рослини з восковою осугою - ліворуч, рослини без воскової осуги – праворуч.



Рис 2.4. Популяція рослин Авротіка 2, що розщеплюється за ознакою воскова осуга.

2.4. Методика гібридизації пшениці

Процес гібридизації пшеничних рослин включає в себе проведення емаскуляції всіх колосків колоса материнської рослини за допомогою пінцета, їхньої ізоляції пергаментними пакетами та подальшого дозрівання приймочок протягом 3-4 днів. Запилення проводили вручну. Якщо між цвітінням материнських і батьківських рослин були значні проміжки в часі, колосся батьківських рослин із дозрілим пилком зберігали при 4°C.

2.5. Методи роботи з ДНК

2.5.1. Виділення геномної ДНК з зелених листків та колеоптиле.

Геномну ДНК виділяли з листя або паростків пшениці. На першому етапі рослинний матеріал заморожували в рідкому нітрогені і розтирали в порцеляновій ступці. Приблизно 0,05-0,1 г отриманого гомогенату переносили в підписані 1,5 мл пробірки типу еппендорф та додавали 500 мкл ЦТАБ буферу. Перед використанням у ЦТАБ буфер додавали попередньо прогрітий розчин РНК-ази до кінцевої концентрації 0,1 мг/мл. Зразки інкубували у водяній бані (за температури 65°C) протягом години. Після цього додавали рівний об'єм суміші хлороформу та ізоамілового спирту (24:1) і перемішували до утворення емульсії. Зразки центрифугували протягом 10 хвилин за швидкості 13000 об/хв, відбирали і переносили верхню водну фазу в іншу пробірку та повторно проводили процедуру депротейнізації сумішшю хлороформ/ізоаміловий спирт з метою отримання прозорого супернатанту. Після центрифугування водну фазу знову відбирали у нові пробірки. Осаджували ДНК, додаючи до супернатанту рівний об'єм охолодженого ізопропанолу та перемішуючи пробірку до випадання білого згустку ДНК в осад. Після цього зразки центрифугували протягом 10 хв при 13000 об/хв. Супернатант зливали, а осаджену ДНК відмивали від домішок в 400 мкл 70% етанолу протягом кількох годин, знов

центрифугували (5 хв при 13000 об/хв) та зливали супернатант. Очищену та висушену ДНК розчиняли в 100 мкл ТЕ буфера.

Для подальшої роботи визначали концентрацію ДНК. Для цього отримані зразки розводили дистильованою водою у 150 разів і вимірювали значення екстинції розведених зразків ДНК за допомогою спектрофотометра «СФ-2000». Вимірювання проводили в ультрафіолетовому світлі при довжині хвилі 260 нм для нуклеїнових кислот. Для знаходження значення концентрації ДНК була застосована формула:

$$C = OD_{260} \times 50 \times 150 \text{ [мкг/мл]},$$

де OD_{260} – значення поглинання нуклеїновими кислотами ультрафіолетового світла на довжині хвилі 260 нм; 50 – коефіцієнт для переведення оптичної густини в концентрацію ДНК; 150 – значення розведення ДНК.

2.5.2. Розробка олігонуклеотидних послідовностей до мікросателітних повторів. Для проведення полімеразної ланцюгової реакції в роботі були використані праймери до мікросателітних (SSR) послідовностей, що знаходяться на 2В та 2D пшеничних хромосомах. Послідовності праймерів були взяті з літературних джерел [162] та із баз даних послідовностей GrainGenes (<http://wheat.pw.usda.gov/>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Характеристики використаних в роботі SSR-праймерів наведені у таблиці 2.1. Послідовності IRAP та REMAP (табл. 2.2) підбирали на основі літературних даних. [163] Температуру плавлення відповідних праймерів було розраховано за допомогою програмного забезпечення Oligo 6.31 (Molecular Biology Insights, Inc.).

В роботі були використані праймери до наступних SSR-локусів 2В та 2D хромосом, чії послідовності не опубліковані їхніми оригінаторами: *Xgwm0322*, *Xgwm0564*, *Xgwm0614*, *Xgwm0661*, *Xgwm0682*, *Xgwm0702*, *Xgwm0721*, *Xgwm0815*, *Xgwm0886*, *Xgwm0972*, *Xgwm0988*, *Xgwm1027*, *Xgwm1099*, *Xgwm1099*, *Xgwm1177*, *Xgwm1186*, *Xgwm1203*, *Xgwm1204*, *Xgwm1235* та

Xgwm1249. Роботу з даними маркерами автор роботи виконував у лабораторії М. Рьодер, Гатерслебен, Німеччина.

Таблиця 2.1

Характеристика праймерів до мікросателітних повторів (SSR),
використаних у дослідженні

№	Локус	Лівий праймер	Правий праймер	T _m , °C
1	<i>Xgdm35</i>	CCTGCTCTGCCCTAGA TACG	ATGTGAATGTGAT GCATGCA	60
2	<i>Xcfd17</i>	AGCACAGAAGGGGT AGGGT	AGCTGCGGTGTGA GCTAAAT	60
3	<i>Xcfd43</i>	AACAAAAGTCGGTGC AGTCC	CCAAAAACATGGTT AAAGGGG	60
4	<i>Xcfd51</i>	GGAGGCTTCTCTATG GGAGG	TGCATCTTATCCTG TGCAGC	60
5	<i>Xcfd56</i>	TTGCATAATTACTTGC CCTCC	CTGGTCCAACCTCC ATCCAT	60
6	<i>Xcfd161</i>	GTAAGGCATCTTCGC GTCTC	CCATGATAGATTTG GACGGG	60
7	<i>Xcfd238</i>	GTTGAGGAGGACAAA GAGGC	GATACGAGCGAGC CCATAAA	60
8	<i>Xbarc7</i>	GCGAAGTACCACAAA TTTGAAGGA	CGCCATCTTACCCT ATTTGATAACTA	50
9	<i>Xbarc13</i>	GCAGGAACAACCACG CCATCTTAC	GCGTCGCAATTTG AAGAAAATCATC	52
10	<i>Xbarc18</i>	CGCTTCCCATAACGC CGATAGTAA	CGCCCGCATCATG AGCAATTCTATCC	50
11	<i>Xbarc35</i>	GCGGTGTGCATGCTT GTCGTGTAGGAGT	GCGTAGTGTAGTA TGTGGCCCGATTA TT	55

Продовження таблиці 2.1				
№	Локус	Лівий праймер	Правий праймер	T _r , °C
12	<i>Xbarc55</i>	GCGGTCAACACACTC CACTCCTCTCTC	CGCTGCTCCCATTG CTCGCCGTTA	55
13	<i>Xbarc91</i>	TTCCCAT AACGCCGA TAGTA	GCGTTTAATATTA GCTTCAAGATCAT	50
14	<i>Xbarc124</i>	TGCACCCCTTCCAAAT CT	TGCGAGTCGTGTG GTTGT	52
15	<i>Xbarc128</i>	GCGGGTAGCATTTAT GTTGA	CAAACCAGGCAAG AGTCTGA	52
16	<i>Xbarc140</i>	CGCCAACACCTACCA TT	TTCTCCGCACTCAC AAAC	52
17	<i>Xbarc142</i>	CCGGTGAGAGGACTA AAA	GGCCTGTCAATTAT GAGC	52
18	<i>Xbarc145</i>	GCAGCCTCGAATCAC A	GGGGTGTTGAAGAT GA	52
19	<i>Xbarc159</i>	TGGTGGTATAGTCGTT GGAGC	CCACACACACACAC CATCAA	50
20	<i>Xbarc160</i>	GGTTGTTCTTAGGAA ATTTCTATAATAACTG	GCGACTTTCATGAT CAAGATGGCATC	50
21	<i>Xbarc167</i>	AAAGGCCCATCAACA TGCAAGTACC	CGCAGTATTCTTAG TCCCTCAT	50
22	<i>Xbarc168</i>	GCGATGCATATGAGA TAAGGAACAAATG	GCGGCTCTAAGGCG GTTTCAAAT	50
23	<i>Xbarc200</i>	GCGATATGATTTGGA GCTGATTG	GCGATGACGTTAG ATGCGGAATTGT	52
24	<i>Xbarc297</i>	GCGTAGGAGAGATGC CCCAAAGGTT	GCGTGCGGACTCG TGAATCATTACA	50

Продовження таблиці 2.1				
№	Локус	Лівий праймер	Правий праймер	T _r , °C
25	<i>Xbarc318</i>	CGACTAACAATTTTTC ATTT	TGATTTTCGCTAAC AAGGAG	50
26	<i>Xgwm0005</i>	GCCAGCTACCTCGAT ACAATC	AGAAAGGGCCAGG CTAGTAGT	50
27	<i>Xgwm0030</i>	TCTTAGCATAGAAGG GAGTGGG	TTCTGCACCCTGG GTGAT	60
28	<i>Xgwm0037</i>	ACTTCATTGTTGATC TTGCATG	CGACGAATTCCCA GCTAAAC	60
29	<i>Xgwm0102</i>	TCTCCCATCCAACGC CTC	TGTTGGTGGCTTG ACTATTG	60
30	<i>Xgwm0120</i>	GATTATACTGGTGCCG C	GATTATACTGGTG C CGAAAC	60
31	<i>Xgwm0128</i>	ACTTCTTGTTGATCTT GC	AGAAAGGCCAGGC TAGAGT	60
32	<i>Xgwm0148</i>	GTGAGGCAGCAAGA GAGAAA	CAAAGCTTGACTC AGACCAA	
33	<i>Xgwm0210</i>	TGCATCAAGAATAGT GTGGAAG	TGAGAGGAAGGCT CACACCT	60
34	<i>Xgwm0228</i>	ACTTCAGTTGACTTG CATG	CCACACACACACC ATCAA	60
35	<i>Xgwm0249</i>	CAAATGGATCGAGA AAGGGA	CTGCCATTTTCTG GATCTACC	55
36	<i>Xgwm0257</i>	AGAGTGCATGGTGG GACG	CCAAGACGATGCT GAAGTCA	60
37	<i>Xgwm0261</i>	CTCCCTGTACGCCTA AGGC	CTCGCGCTACTAG CCATTG	55
Продовження таблиці 2.1				

№	Локус	Лівий праймер	Правий праймер	T _r , °C
38	<i>Xgwm0296</i>	AATTCAACCTACCAA TCTCTG	GCCTAATAAACTG AAAACGAG	55
39	<i>Xgwm0301</i>	GAGGAGTAAGACAC ATGCCC	GTGGCTGGAGATT CAGGTTC	55
40	<i>Xgwm319</i>	GGTTGCTGTACAAGT GTTCACG	CGGGTGCTGTGT GTAATGAC	55
41	<i>Xgwm0320</i>	CGAGATACTATGGA AGGTGAGG	ATCTTTGCAAGGA TTGCCC	55
42	<i>Xgwm0429</i>	TTGTACATTAAGTTC CCATTA	TTTAAGGACCTAC ATGACAC	50
43	<i>Xgwm0455</i>	ATTCGGTTCGCTAGC TACCA	ACGGAGAGCAACC TGCC	55
44	<i>Xgwm0484</i>	ACATCGCTCTTCACA AACCC	AGTTCCGGTCATG GCTAGG	55
45	<i>Xgwm0526</i>	CAATAGTTCTGTGAG AGCTGCG	CCAACCCAAATAC ACATTCTCA	55
46	<i>Xgwm0539</i>	CTGCTCTAAGATTCA TGCAACC	GAGGCTTGTGCCC TCTGTAG	60
47	<i>Xwmc156</i>	GCCTCTAGGGAGAA AACTAACA	TCAAGATCATATC CTCCCCAAC	61
48	<i>Xwmc317</i>	TGCTAGCAATGCTCC GGGTAAC	TCACGAAACCTTTT CCTCCTCC	61
49	<i>Xwmc361</i>	AATGAAGATGCAAA TCGACGGC	ATTCTCGCACTGA AAACAGGGG	61
50	<i>Xwmc419</i>	GTTTCGGATAAAACC GGAGTGC	ACTACTTGTGGGTT ATCACCAGCC	61
Продовження таблиці 2.1				

№	Локус	Лівий праймер	Правий праймер	T _r , °C
51	<i>Xwmc477</i>	CGT CGA AAA CCGTACACTCTCC	GCGAAACAGAATA GCCCTGATG	55
52	<i>Xwmc661</i>	CCACCATGGTGCTAA TAGTGTC	AGCTCGTAACGTA ATGCAACTG	61

T_r – температура гібридизації

Таблиця 2.2

Характеристика олігонуклеотидів (IRAP), використаних у дослідженні

№	Назва	Послідовність	T _r , °C
1	<i>C0699 (Nikita)</i>	CGCTCCAGCGGT ACTGCC	56
2	<i>C0699 (Nikita1)</i>	CGCATTTGTTCAAGCCTAAACC	56
3	<i>C0945 (Sabrina)</i>	CGT CGA AAA CCGTACACTCTCC	55
4	<i>9900 (Sukkula)</i>	GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC	61
5	<i>REMAPGAn</i>	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGG	55
6	<i>REMAPCAn</i>	TTCGCCCTGGGCATATTCCAACA	55
7	<i>1VIT124</i>	CTCTCTCTCTCTCTCTCTC	56
8	<i>2VIT159</i>	TAATAATAATAATAATAATAA	56
9	<i>LTR6149</i>	CTCGCTCGCCCACTACATCAACCGCG TTTATT	61
10	<i>LTR6150</i>	CTGGTTCGGCCCATGTCTATGTATCC ACACATGTA	61
11	<i>5'LTR1</i>	TACTACTACTACTACTACC	61
12	<i>5'LTR2</i>	ATCATTCCTCTAGGGCATAATTC	58
13	<i>3'LTR</i>	TGTTTCCCATGCGACGTTCCCAACA	65
14	<i>COPIAR</i>	TTGAACCCCTTTTGATGTAT	56
15	<i>COPIAF</i>	GATGCTCCTTGCCTATGCTA	56
16	<i>(CT)9G</i>	CTCTCTCTCTCTCTCTCTG	55
17	<i>(CA)9G</i>	CACACACACACACACAG	55

2.5.3. Полімеразна ланцюгова реакція. Методом полімеразної ланцюгової реакції проводили ампліфікацію ДНК пшеничних рослин, що досліджувалися, з праймерами, розробленими до мікросателітних локусів на 1В, 2В та 2D хромосомах, а також з IRAP та REMAP маркерними системами.

Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 25 мкл містить: 250 нмоль/мкл кожного праймеру (табл. 2.1), 50 нг ДНК, 0,2 мМ dATP, dCTP, dTTP, dGTP; 1,5 мМ MgCl₂; 2 од. Taq-полімерази (Fermentas, ThermoScientific) з буфером, рекомендованим виробником. ПЛР проводили з використанням ампліфікаторів “Eppendorf” (США) або “Applied Biosystem” (США). Реакція проходила за наступних умов: прогрівання протягом 3 хвилин при 94° С, надалі кожен з 45 циклів складався з наступних трьох етапів: денатурація ДНК – 94°С – 1 хвилина; гібридизація праймерів – 50°-61°С (залежно від праймеру) – 1 хвилина; елонгація – 72°С – 2 хвилини, після закінчення циклів – 72°С – 10 хвилин (фінальна елонгація).

2.5.4. Електрофоретичне розділення продуктів ПЛР в агарозному гелі. Для аналізу продуктів ампліфікації ДНК з SSR праймерами використовували 1% агарозний гель. Для аналізу продуктів ампліфікації ДНК з IRAP та REMAP праймерами – 1,7% агарозний гель. Відповідну кількість агарози додавали до 1X SB буферу та нагрівали до плавлення, при охолодженні додавали в гель бромистий етидій. Зразки, що досліджувалися, змішували з 6X буфером нанесення (0,25 % бромфеноловий синій, 0,25 % ксиленціанол, 30 % гліцерин) і вносили в слоти гелю. Електрофорез проводили в буфері SB при початковій напрузі струму 50 В протягом 20 хв та 100 В протягом 1,5 год. При розділенні продуктів ампліфікації ДНК з IRAP та REMAP праймерами розділення тривало 3-17 годин. Для визначення розмірів фрагментів ДНК використовували ДНК-маркери (“Thermo Scientific”, Литва). Продукти розділення фарбували бромистим етидієм та виявляли в ультрафіолетовому світлі.

2.5.5. Електрофоретичне розділення продуктів ПЛР в акриламідному гелі. Електрофорез проводили в поліакриламідному гелі (ПААГ), оптимальна концентрація якого для розділення фрагментів ДНК, які одержувались в результаті ПЛР з мікросателітними праймерами, виявилася 6%. Розділення проводилося в поліакриламідному вертикальному гелі в денатуруючих умовах. Скельця, між якими заливається гель, споліскувалися дистильованою водою і витиралися насухо фільтром, знежирювалися етиловим спиртом. Для того, щоб «пришити» гель до скла, обробляли одне зі скельць 50–100 мкл розчину такого складу: оцтова кислота – 1 мл; етиловий спирт – 10 мл; 3-methacryloxypropyltrimetoxysilane – 50 мкл. Після обробки скло витиралося насухо. Розчин ПААГ використовувався наступного складу: 30% акриламід, приготований на 1X TBE – 6.7 мл; 2% метиленбісакриламід, приготований на 1X TBE – 5 мл; сечовина – 10.5 г; 5x TBE – до 25 мл. Для полімеризації гелю розчини персульфату амонію та N, N, N',N'-тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД) додавали безпосередньо перед заливання гелю: 10% розчин персульфату амонію – 200 мкл; ТЕМЕД – 15 мкл. Для денатурації ДНК, зразки (ампліфікат) прогрівали 3 хвилини при температурі 95°C на водяній бані, після чого їх вміщували на лід. Перед нанесенням зразків у слоти, 10 мкл ампліфікату змішували з рівним об'ємом буферу для денатуруючого ПААГ, склад якого наведено вище.

Електрофорез проводили від катода до анода протягом 3,5 годин. Умови: 4 мА – до входження фронту барвника в гель після входження – 10 мА, напруга: 450-500 В. Вказано параметри для однієї пластини гелю.

Фарбування гелю проводили наступним чином: гель промивали під проточною дистильованою водою; фіксували у розчині 10% етанолу та 0,5% оцтової кислоти протягом 8 хвилин. Забарвлення проводилося 0,012 М розчином азотнокислого срібла, додаючи 1,2 мл формаліну, у розрахунку на 500 мл розчину барвника, безпосередньо перед занурюванням гелю у барвник на 10 – 11 хвилин. Після цього гель промивали дистильованою водою,

обробляли проявником (33 мл 45% розчин гідроксиду натрію на 1 л води), додаючи 2 мл формаліну, у розрахунку на 1 л проявника, безпосередньо перед початком проявлення. Повторно проводили фіксацію протягом 2 хвилин з наступним промиванням у дистильованій воді.

2.5.6. Електрофоретичне розділення та візуалізація продуктів ПЛР в системі ALFexpress II. Розділення продуктів ампліфікації ДНК в зазначеній системі проходило в стандартизованому виробником акриламідному гелі ReproGel (“Amersham”, США), полімеризація якого відбувається під дією ультрафіолетового випромінювання. Продукти ампліфікації, попередньо мічені флуоресцентним барвником Cy-5, прогрівали протягом 2 хвилин за 96°C та поміщали на лід. В дві крайні на гелі слоти наносилися стандартні маркери мас: зовнішній та внутрішній (73 п. н. – 304 п. н.), розмір яких підбирався відповідно до розмірів очікуваних продуктів ПЛР. Зчитування результатів розділення проходило за допомогою лазера відповідної довжини хвилі автоматично. Результати були представлені графічно на екрані монітору або роздруковувалися на папері.

2.6. Методи роботи з білками

2.6.1. Екстракція та електрофоретичне розділення гліадинів. Для екстракції гліадинів зернівку подрібнювали ступкою Абіха та заливали 200 мкл 70% розчину етанолу. Через 1,5 години, відбирали 60 мкл верхньої фази і випаровували її у термостаті протягом ночі. Сухий осад розчиняли у 50 мкл 5,5 М сечовини і залишали на 30 хв. Основними компонентами гелів (концентруючий та розділяючий) були: SGB-буфер (гістидин солянокислий – 1,2 г; оцтова кислота (крижана) – 1,6 мл; дистильована вода – до 50 мл) та MSS-буфер (акриламід – 30,4 г; метиленбісакриламід – 1,6 г; розчин FeSO₄ (44 мг/100 мл) – 4,55 мл; аскорбінова кислота – 245 мг; дистильована вода – до 100 мл). Розділяючий гель (100 мл) містив: MSS-буфер – 22 мл; 4,44 М сечовина – 67,5 мл; оцтова кислота – 6 мл; дистильована вода – 4,5 мл. Концентруючий

гель (25 мл) мав такий склад: SGB-буфер – 4,25 мл; MSS-буфер – 3,925 мл; сечовина 4,44 М – 16,8 мл; дистильована вода – до 25 мл.

Для полімеризації гелю використовували 10% розчини персульфату амонію та TEMED, як описано вище.

Електродний буфер (нижній) містив такі компоненти: мурашина кислота – 3,33 мл; дистильована вода – до 1 л. Електродний буфер (верхній) – вдвічі розбавлений нижній.

Тривалість електрофорезу 6 – 6,5 годин. Наносили 20 мкл екстракту в кожен слот. Умови розділення: 300 В, 10мА – 30 хв, 300В, 30 мА – до кінця електрофорезу (розрахунок на дві пластини гелю). Розділення від аноду до катоду. Після закінчення електрофорезу скло з гелем фіксували протягом ночі у фарбі такого складу: кумасі діамантовий блакитний (RR blue) – 200 мг; оцтова кислота (крижана) – 60 мл; ацетон – 170 мл; ТХО (100%) – 60 мл; дистильована вода – до 1 л. Надлишки фарби відмивали проточною водою.

2.6.2. Екстракція та електрофоретичне розділення глютенів.

Зернівки подрібнювали ступкою 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; 0,25% бромфенолового синього; дистильована вода – до 100 мл. Екстракцію проводили протягом 1,5 год. та витримували на киплячій бані протягом 3 хв. Розділення відбувалося у 12,5% поліакриламідному гелі. Розділяючий гель (30 мл) містив: 30% р-н акриламід – 12,5 мл; 1% р-н метиленбісакриламід – 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 акриламід – 1,67 мл; 1% р-н метиленбісакриламід – 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 (рН 8,3): трис – 3,6 г; гліцин – 17,3 г; SDS – 1,2 г; дистильована вода – до 1,2 л.

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: кумасі діамантовий блакитний (RR blue) – 200 мг; 96% етиловий спирт – 170 мл; оцтова кислота – 60 мл; ТХО (100%) – 60 мл; дистильована вода – до 1 л.

Надлишки фарби відмивали проточною водою з додаванням невеликої кількості оцтової кислоти.

2.6.3. Екстракція і електрофоретичне розділення бета-амілази. Екстракцію проводили з сухого зерна. Зернівку подрібнювали за допомогою ступки Абіха і додавали 1 мл екстракційного буферу наступного складу: NaCl – 1,46 г; бета-меркаптоетанол – 0,8 мл, 0,25% – бромфеноловий синій; дистильована вода – до 50 мл;. Розділення проводили в акриламідному гелі, який містив (на 40 мл): 30% р-н акриламід у – 13,2 мл; 1% р-н метиленбісакриламід у – 6,8 мл; трис – 480 мг; гліцин – 100 мг; дистильована вода – до 40 мл; 10% р-н персульфату амонію – 329 мкл; TEMED – 24 мкл.

Перед нанесенням зразки центрифугували 5 хв. за 10 тис. об/хв. Наносили по 5 мкл екстракту в кожному слоту.

Електродний буфер: трис – 1,2 г; гліцин – 5 г; дистильована вода – до 1 л.

В кожному слоту наносили по 5 мкл білкового екстракту. Електрофорез проводили від «-» до «+». Умови розділення: 300 В, 15 мА (протягом 30 хв.), 300 В, 30 мА (до кінця проведення фореузу). Тривалість електрофорезу 3-3,5 години.

Після закінчення фореузу скло витримували у розчині гідролізованого крохмалю протягом однієї години: крохмаль – 30 г; ацетат натрію – 9 г; крижана оцтова кислота – 3 мл; дистильована вода – до 1 л. Після цього скло промивали водою та занурювали у розчин Люголя на 5-10 хв: KI – 5 г; I₂ – 2,6 г;

60% трихлороцтова кислота – 84 мл; дистильована вода – до 1 л. Гелі промивали проточною водою та висушували.

2.6.4. Екстракція і електрофоретичне розділення альфа-амілази.

Альфа-амілазу виділяють з пророслої зернівки (довжина колеоптиле має бути 3-4 см). Подрібнену зернівку та проросток заливали 1 мл екстракційного буферу такого складу: сахароза – 30 г; CaCl_2 – 0,2 г; дистильована вода – до 100 мл; 0,25% бромфеноловий синій. Розділення проводили в акриламідному гелі, який містив (на 40 мл): 30% р-н акриламиду – 10 мл; 1% р-н метиленбісакриламиду – 8 мл; трис – 100 мг; гліцин – 480 мг; сечовина – 12 г; дистильована вода – до 40 мл; 10% р-н персульфату амонію – 329 мкл; TEMED – 24 мкл.

Умови проведення електрофорезу та склад барвників аналогічний до бета-амілази.

2.7. Статистична обробка результатів

Статистична обробка результатів полягала у порівнянні розподілів ознак за фенотипними класами, емпіричних з теоретичними та двох емпіричних один з одним. Використано метод χ^2 Пірсона, кількості ступенів свободи вказані у примітках до таблиць. Розподіли, що включали до себе дуже малі (< 5) обсяги класів порівнювали за допомогою точного критерія Фішера [164].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Встановлення моделі успадкування ознаки наявності/відсутності воскової осуги

У пшениці м'якій (*Triticum aestivum* L.) домінантні алелі серії гомеологічних генів *W1* (2BS) та *W2* (2DS) забезпечують інтенсивний шар осуги. Рецесивні гомозиготи за алелями *w1* та *w2* воскової осуги не мають. Друга серія ортологічних генів, *Iw1* (2BS), *Iw2* (2DS) – інгібітори воскової осуги. Домінантні алелі будь-якого з них епістатичні до генів першої серії, за їхньої наявності воскова осуга відсутня. Рецесивні алелі *iw1*, *iw2* інгібуючої дії не мають. [70,74,165] Деякі з цих генів ідентифіковано на видах тетраплоїдної пшениці з геномом AABB. [1,166] На хромосомі 2A пшениці *T. durum* локалізовано ген, що сприяє сильному розвитку осуги [167] та показано, що хромосома 2A сорту Чайніз Спринг також має відношення до розвитку осуги. [168] Для тетраплоїдної пшениці *T. turgidum* було встановлено наявність ще одного інгібітору воскової осуги, *Iw3* (1BS) [75]. Ген *Iw3* інгібує експресію домінантних промоторів воскової осуги хромосом групи 2 у колосі і не впливає на їхню експресію у листках пшениці. За даними [169], чужинно-заміщені лінії, в яких хромосома 1D сорту Аврора була замінена гомеологом з геному *S Ae. speltoides* або *S^{sh} Ae. sharonensis*, характеризувалися яскраво-зеленим колосом та листками, вкритими восковою осугою. Отже, інгібітор воскової осуги на колосі властивий не лише тетраплоїдній пшениці, а й видам егілопса також. На хромосомі 1BS *T. dicoccoides* локалізовано ген *Ws* [78] і вказано, що це ген-регулятор розвитку воскової осуги на колосі без жодних інших пояснень. Невідомо, чи є алельними гени *Iw3* та *Ws*, адже їхнє розташування на карті плеча хромосоми 1BS приблизно збігається.

3.1.1. Гібридологічний аналіз. Наведені дані про генетичний контроль ознаки показують, що при схрещуванні рослин з осугою (гомозиготи за

алелями *iw1* та *iw2*) з рослинами без осуги (у наявності хоча б одна пара домінантних алелів за тими самими генами) очікуються рослини F_1 без осуги, а у популяції F_2 буде менделівське моно- та дигенне розщеплення. Для перевірки цього припущення виконали серію схрещувань інтрогресивних ліній з контрастним виразом ознаки.

Схему створення досліджуваних інтрогресивних ліній наведено на рисунку 2.2. Виходячи з геномної структури амфідиплоїдів Авродесу (AABBSS), Аврозису (AABBS^{sh}S^{sh}), Авролати (AABBUU) та гібридів F_1 від їхнього схрещування з рекурентним генотипом Аврора, всі заміщення хромосом пшениці на чужинні хромосоми мали відбуватися в процесі формування гамет гібридом AABBDX, де X – геном егілопса, і стосуватися хромосом лише субгеному D. Частина AABB мала залишатися незмінною. [9] Гексаплоїдні лінії добирались через цитологічний контроль [170], їхня цитологічна стабільність перевірялась не один раз протягом наступних поколінь. [171] Отже, гени хромосоми 2В мають бути однаковими у всіх лініях і не братимуть участь у розщепленні.

Сорт Аврора, тетраплоїдний компонент якого AABB увійшов до складу гексаплоїдного геному геномно-заміщених форм, характеризується вираженою восковою осугою, яка вкриває всю рослину, колос та листки. Отже, його геном включає принаймні один із домінантних генів-промоторів воскової осуги на хромосомах 1В чи 2В, і не має домінантних генів-інгібіторів на тих самих хромосомах. Такі рослини мають блакитний колір, тому відповідну градацію ознаки ми називаємо блакитною. Геномно-заміщені амфідиплоїди Авролати, Авродес та Авротіка на момент їхнього створення як амфідиплоїдів (1980 рік) від схрещування тетра-Аврори з видами егілопса, відповідно, *Ae. umbellulata*, *Ae. speltoides*, характеризувались відсутністю воскової осуги. Такі рослини виглядають зеленими, тому в роботі відповідна градація ознаки отримала назву зелена. Геномно-заміщений амфідиплоїд Аврозис (тетра-Аврора х *Ae. sharonensis*) з моменту свого створення був блакитним. [7] Як геномно-заміщені амфідиплоїди, так і лінії, які від них отримані, повинні мати в своєму

геномі хромосому 2В Аврори. Отже, розщеплення може зачіпати лише ген *iw2*, розташований на хромосомі 2D, якщо ця хромосома (ділянка хромосоми) заміщується гомеологічною ділянкою егілопсу з домінантним алелем цього гена. Серед рослинного матеріалу спостерігаються рослини з третьою градацією ознаки: стебла та листя блакитні, колос зелений, її позначено як зелено-блакитна. За останніми даними [75], це може бути наслідком активності гена *Iw3* (1BS).

Серед інтрогресивних ліній, створених за участі згаданих геномно-заміщених амфідиплоїдів, зустрічались як зелені так і блакитні. Серед більшості зелених ліній за час спостереження за ними після їхнього створення постійно відбувається вищеплення блакитних рослин геть до втрати носіїв зеленої градації. Схоже, що у геномі ліній інтрогресивного походження відбувається якийсь процес, наслідком якого є мутування домінантного алелю до рецесивного з частотою, яка набагато перевищує відомі нам середні частоти спонтанного виникнення мутацій на ген на покоління. Частота появи блакитних нащадків від зелених рослин інтрогресивної лінії сягає 30%, зрідка збільшується понад 50%. Одночасно існує низка зелених ліній, серед яких не відбувається вищеплення блакитних рослин. Такі зелені лінії, що не вищеплюють блакитного морфотипу, є серед ліній-похідних Аврозиса, єдиної зі всіх геномно-заміщених амфідиплоїдів, що має блакитний колір. Процес створення лінії починався одразу після отримання амфідиплоїдів через їхнє схрещування з генотипом Аврора. [7] Можна припустити, що на момент отримання, геномно-заміщений амфідиплоїд Аврозис, як всі інші, був зелений, і саме у такому стані був схрещений з Аворою для ініціації створення інтрогресивних ліній. В той же час відбулося вищеплення з амфідиплоїда блакитного морфотипа, а зелений був втрачений.

Лінії-похідні Авролати *res* 158, *res* 160 та *res* 252 були зеленими, *res* 193 розщеплювалась на морфотипи зелений та блакитно-зелений, кожен з яких був залучений до схрещувань.

Лінії-похідни Авродесу res 5, res 60 були зеленими, res 3, res 12, res 19, res 25, res 32-2 – блакитними, res 13, res 21-1, res 22, res 31– зелено-блакитними, а лінію res 33 було залучено до схрещувань двома морфотипами, зеленим та блакитним.

Лінії-похідні Аврозису res 105 та res 130 були блакитними.

У останніх двох рядках таблиці 3.1 наведено результати від схрещування двох гібридів F_1 в реціпроках, в тому числі реципрокним було схрещування для отримання F_1 .

Кожна комбінація схрещування виконувалась на одному колосі і всі рослини F_2 були нащадками F_1 з цього колоса, навіть якщо зерен після запилення було зовсім мало. Емаскуляція пінцетом, дуже ретельна, запилення також пінцетом, колос – колосом. Мінімумальна кількість гібридних насінин, що висівались в поле восени для проходження яровизації, була 5, у деяких комбінаціях до збирання зберіглось лише по три рослини.

Результати оцінки гібридів F_1 від схрещування ліній-похідних геномно-заміщених амфідиплоїдів з генотипом Аврора та одна з однією за наявності контрастних градацій ознаки, що досліджується, дали неочікувані результати (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Характеристика компонентів схрещування, гібридів F_1 та F_2 від схрещування ліній – похідних геномно-заміщених амфідиплоїдів за ознакою воскова осуга

Комбінація схрещування	Компоненти схрещування		Гібриди	
	♀	♂	F_1	F_2
res 158 x Аврора	Зелений	блакитний	Блакитні	85 блакитних
res 160 x res 130	Зелений	блакитний	Блакитні	198 блакитних
res 193 x res 33	Зелений	блакитний	Блакитні	103 блакитних
res 60 x Аврора	Зелений	блакитний	Блакитні	101 блакитних
res 33 x Аврора	Зелений	блакитний	Блакитні	41 бл., 45 зел-бл.

Продовження таблиці 3.1				
Комбінація схрещування	Компоненти схрещування		Гібриди	
	♀	♂	F ₁	F ₂
res 193 x res 33	Блакитний	Зелений	зелено-блак.	57 зел-бл.
res 5 x res 105	Зелений	блакитний	Блакитні	82 блакитних
res 105 x res 60	блакитний	зелений	Блакитні	61 блакитних
res 13 x res 19	зелено-блак.	блакитний	Блакитні	117 блакитних
res 31 x res 32-2	зелено-блак.	блакитний	зелено-блак.	94 блакитних
res 32-2 x res 22	блакитний	зелено-блак.	Блакитні	56 зел-бл.
res 12 x res 31	блакитний	зелено-блак.	зелено-блак.	34 бл., 52 зел-бл.
res 21-1 x res 32-2	зелено-блак.	блакитний	Блакитні	68 бл., 10 зел-бл.
res 12 x res 13	блакитний	зелено-блак.	Блакитні	13 бл., 21 зел-бл.
res 12 x res 13	блакитний	зелено-блак.	Блакитні	82 блакитних
res 25 x res 22	блакитний	зелено-блак.	Блакитні	49 бл., 14 зел-бл.
(res 3 x res 252)x (res 3 x res 252)	зелений	блакитний	Зелені	72 блак., 41 зел.
(res 3 x res 252) x (res 3 x res 252)	блакитний	зелений	Зелені	41 блак., 28 зел.

Не зважаючи на те, що зелений колір рослин відомий як домінантна ознака [172], всі рослини F₁ від схрещування контрастних за ознакою батьківських форм були або блакитними, або рослинами з зеленим колосом на блакитному стеблі (табл. 3.1). Домінантна ознака (зелена) не виявляється у гібридах першого покоління всупереч очікуваному. Очікувані фенотипи F₁ спостерігали як виключення лише для реципрокних схрещувань гібридних рослин, наведених в останніх рядках таблиці. Це примусило нас припустити, що якась зміна у геномі зелених компонентів схрещування відбувається до моменту утворення гібридів, тобто під час споро- та гаметогенезу. Рослини, які

за фенотипом є зеленими, продукують гамети, в яких або домінантний алель якимось чином змінився на рецесивний (мутація) або зміна експресії гена відбулась на епігенетичному рівні. Зразки, з якими ми працювали, називаються лініями, оскільки їхнє походження пов'язане з багатократним самозапиленням гібрида від ініціального схрещування між геномно-заміщеним амфідиплоїдом та Авророю [7], їхня гексаплоїдна природа неодноразово підтверджувалась підрахунком кількості хромосом у первинних корінцях, в мейозі утворюється 21 бивалент. [10,171] За нашими спостереженнями, якщо лінія нестабільна за ознакою наявності/відсутності воскової осуги, морфотип з осугою з'являється поміж рослин з домінантним фенотипом перманентно геть до повної втрати зелених рослин. Чи є ці зразки лініями? На нашу думку є, однак їхньою генетичною властивістю, серед інших, є нестабільність за геном (генами), що впливає на формування воскового шару чи його відсутність. Механізм, який перетворює домінантний алель на рецесивний, отже, діє постійно, тому, скоріше за все рослини з домінантним фенотипом є гетерозиготами, а не гомозиготами за домінантним алелем, якими ми їх вважаємо, залучаючи до схрещування та очікуючи певних фенотипів від гібридів. Те, що більшість утворених гібридів F_1 мали рецесивний фенотип, по-перше, підтверджує це припущення, по-друге показує, що зміна домінантного алеля на рецесивний дійсно відбувається під час споро(гамето)генезу, адже рослина, що брала участь в утворенні гібрида була зеленою – домінантний фенотип.

Ще менш зрозумілі результати, отримані від схрещування блакитно-зелених рослин з блакитними. В двох комбінаціях F_1 демонструють домінантний фенотип, хоча в одній з них в F_2 цей фенотип зникає. На нашу думку, такі дивні та суперечливі результати не в останню чергу отримано саме через те, що гібриди F_1 отримано за схемою «колос колосом». І гібриди, та їхні нащадки відбивають особливості двох рослин, які брали участь у схрещуванні, і немає матеріалу для ймовірнісної оцінки подій. Єдиний висновок, що ми могли зробити: серед нащадків від схрещування ліній з контрастними фенотипами з'являються переважно F_1 з рецесивною ознакою, а якщо F_1 має домінантну

ознаку, серед рослин F_1 або зовсім немає розщеплення через наявність рослин лише рецесивного фенотипу, або розщеплення є, але у порівнянні з очікуваним 3 домінантних : 1 рецесивна розщеплення викривлено у бік зростання кількості рослин з рецесивним фенотипом. Очікувані результати щодо фенотипу F_1 отримали лише при схрещуванні гібридів F_1 один з одним. Серед F_2 також спостерігали надлишок блакитних рослин, причому результат не залежав від напрямку схрещування (табл. 3.1).

3.1.2. Мікросателітний аналіз. Мікросателітні локуси вважаються одними з найефективніших молекулярних маркерів саме через високий рівень їхнього поліморфізму, чинником якого є молекулярна структура сукупності повторів. [173] Щоб перевірити, чи дійсно ген, зміну експресії за яким спостерігаємо серед досліджуваних ліній, є геном *Iw2*, розташованим на хромосомі 2D, скористалися мікросателітним аналізом – порівнянням електрофоретичних спектрів продуктів ампліфікації, отриманих з застосуванням праймерів мікросателітних локусів, специфічних до хромосоми 2D за даними оригінаторів. [162] Ідентифікувати продукти ампліфікації у денатуруючих умовах вдалося лише для трьох локусів з перевірених п'яти, *Xcfd51*, *Xcfd56* та *Xbarc159*. Продукт утворювався з ДНК геномно-заміщених амфідиплоїдів, а не лише Аврори, отже геномної специфічності для генів 2-ї гомологічної групи вказані праймери не мають. Оскільки лінії походять від різних геномно-заміщених амфідиплоїдів (Авродеса, Аврозиса та Авролати), то їхні спектри аналізувалися окремо, у порівнянні зі спектром Аврори та відповідного геномно-заміщеного амфідиплоїда. Логіка аналізу така: якщо за обраними мікросателітними локусами, специфічними для хромосом 2-ої гомологічної групи, алелі, властиві генотипу Аврора будуть притаманні лініям з восковою осугою (фенотип Аврори), а алелі, властиві відповідному амфідиплоїду (Авродес та Авролата зелені, без осуги) будуть характеризувати генотипи зелених інтрогресивних ліній, можна стверджувати, що за фенотипну мінливість за восковою осугою, яку спостерігаємо, дійсно відповідає ген,

розташований на хромосомах 2-ої гомеологічної групи, інгібітор воскової осуги *Iw2*.

Спектр ампліфікації ДНК двох блакитних ліній-похіді Аврозису співпадає зі спектром Аврори за всіма трьома мікросателітними локусами (табл. 3.2). Похідних Аврозису з іншим фенотипом не було. Всі чотири досліджені лінії, похідні Авролати, воскової осуги не мали. Електрофоретичні спектри, отримані після ампліфікації їхньої ДНК з праймерами всіх трьох локусів, співпадали зі спектрами відповідних амфідиплоїдів. Отже, можна стверджувати, що ген, за фенотипним виразом якого ми слідкуємо, дійсно розташований у хромосомах групи 2. Для ліній-похідних Авродесу, результати не такі однозначні. Лінії *res 3* *res 25*, блакитні, та *res 5*, *res 33* і *res 60*, зелені, мали очікувані спектри, які співпадали у першому випадку зі спектром ДНК Аврори, в другому – Авродесу. Блакитно-зелені лінії, як ми і припускали, не виявили подібності до спектрів Аврори чи Авродеса одночасно за всіма трьома локусами. Проте ми цього і не очікували, адже, у контролі фенотипу «зелений колос, листя з осугою, бере, за даними [75], участь ген *Iw3*, локалізований на хромосомі 1В, а використані локуси специфічні до хромосом 2-ої групи. Блакитні лінії *res 12*, *res 19* за одним локусом мали спектр, як у Аврори, за двома – як у Авродесу, локуси не співпадали. Тобто, хромосома лінії показує, судячи з такого спектра, рекомбінантну структуру. Оскільки у створенні Авродеса брав участь *Ae. speltoides*, відомий своєю властивістю дозволяти кон'югацію гомеологічних хромосом у *Triticinae* [174], а за даними [9] у гібриді між Аврдесом і Авророю утворюються мультиваленти, припущення про наявність у геномі ліній рекомбінантних хромосом є цілком виправданим. Лінія *res 32-2* зелена, а спектр ампліфікації за всіма локусами співпадає зі спектром Аврори. На наш погляд, причина невідповідності та сама, через яку при схрещуванні зелених та блакитних ліній рослини F_1 мають рецесивний фенотип: зелені рослини є гетерозиготами і продукують гамети, що містять критичний ген зі зміненою експресією. А ДНК було виділено нами не з самої рослини певного фенотипа, а з паростків, отриманих з її насінин.

Таблиця 3.2

**Поліморфізм досліджуваних ліній за мікросателітними локусами,
розташованими на хромосомі 2D**

Лінія res*	Локус <i>Xcfd5</i>		Локус <i>Xcfd56</i>		Локус <i>Xbarc159</i>	
	алель Аврори	алель амфідиплоїд а	алель Аврори	алель амфідиплоїда	Алель Аврори	алель амфідиплоїд а
3	+		+		+	
5		+		+		+
12		+	+			+
13		+	+		+	
19		+			+	+
21-1	+		+			+
22	+		+			+
25	+		+		+	
31	+			+	+	
32-2		+		+		+
33		+		+		+
60		+		+		+
105	+		+		+	
130	+		+		+	
158		+		+		+
160		+		+		+
193		+		+		+
252		+		+		+

* Лінії res 3–res 60 є похідними Авродесу, res 105, res 130 – похідними Аврозису, res 158–res 252 – похідними Авролати.

За результатами гібридологічного аналізу, успадкування ознаки наявності/відсутності воскової осуги на рослинах інтрогресивних ліній пшениці м'якої відбувається з порушенням законів успадкування дискретних сталих одиниць інформації у геномі (алелів генів). Можна припустити, що спотворення розщеплення проти очікуваного у бік збільшення рослин з рецесивною ознакою спричинюється (епі)генетичною нестабільністю алеля гена *Iw2* інтрогресивного походження за умов його функціонування у геномі гібридного походження. Те, що досліджувана ознака контролюється саме цим геном, доведено мікросателітним аналізом з використання локусів, специфічних для хромосом

2-ої гомеоогічної групи, в яких розташований ген *Iw2*. Наявність воскової осуги (блакитна рослина) є рецесивною та стабільною. В жодному випадку проміж рослин блакитної лінії не з'являлись рослини зелені. Отже, генетична нестабільність виявляється лише для домінантних алелів, експресія яких пов'язана з інгібуванням процесу утворення воску, і може бути наслідком будь-яких з нині відомих механізмів промоції змін як генетичних (рух транспозонів), так і епігенетичних (зміна експресії гена внаслідок метилювання чи участі міРНК у регуляції).

Antonyuk M.Z., Shpylchyn V.V., Ternovska T.K. Permanent genetic variability in introgressive lines and amphidiploids of Triticinae. Cytology and Genetics. 2013; 47(4):58-68. *(Особистий внесок здобувача: польова оцінка, електрофоретичне розділення білків, участь в обговоренні результатів та написанні статті).*

Шпильчин В.В. М.З. Антонюк, Т.К. Терновська. Фенотипний поліморфізм за ознакою воскова осуга серед представників підтриби Triticinae. Наукові записки НаУКМА. 2010; Т.106. Біологія та екологія: 3–8. *(Особистий внесок здобувача: польова оцінка, ПЛР аналіз, взято участь в обговоренні результатів та написанні статті).*

3.2. Зміна прояву ознаки воскова осуга у генераціях амфідиплоїдів підтриби Triticinae

Вивчали геномно-заміщений амфідиплоїд Авротіка та геномно-додані амфідиплоїди Міоза та МІТ.

Гексаплоїд Авротіка має геном AABBTT та за суттю є геномно-заміщеною формою пшениці [8], в якій субгеном D заміщений геномом T диплоїдного виду *Aegilops mutica*. Гексаплоїд створено як амфідиплоїд від схрещування тетраплоїдного компонента AABB озимої м'якої пшениці сорту Аврора с диплоїдним егілопсом та подвоєнням кількості хромосом в 21-

хромосомного гібрида АВТ. [175] Сорт Аврора також як його тетракомпонент ААВВ вкриті восковою осугою, *Aegilops mutica* не має воскової осуги. Щойно створений амфідиплоїд був зеленим, тобто не мав осуги. Отже, геном егілопсу несе домінантний інгібітор воскової осуги *Iw*. Залишаючись 42-хромосомним, амфідиплоїд незабаром розщепився на три морфологічно різні морфотипи: Авротика 1, яка нічим не відрізнялася від ініціального амфідиплоїда, Авротика 3 з більш рихлим колосом та Авротика 2, яка мала на колосі невеликі остеподібні відростки. Саме в Авротіці 2 за кілька генерацій серед зелених рослин з'явилися блакитні, тобто і колос, і листя були вкриті восковою осугою. [7] Пізніше, за 8-10 генерацій, серед зелених рослин Авротіки 1 стали з'являтися блакитні рослини та рослини, колос яких зелений, а листя блакитне (зелено-блакитний зразок). [7] Тобто незрозумілим чином у згаданому матеріалі відбувається зміна стану гена-інгібітора воскової осуги з домінантного до рецесивного, та, відповідно, втрачається його інгібіторна дія. Процес появи блакитних або зелено-блакитних рослин серед нащадків зелених набув перманентного характеру та спостерігається не лише в Авротіці, а й в інших геномно-заміщених формах, а також у чужинно-заіщених ліній, від них отриманих, результати генетичного аналізу яких викладено у попередньому підрозділу дисертації. [176,177]

Амфідиплоїд Міоза (ААВВММ) походить від схрещування лінії твердої пшениці *Mutiko italicum* (*T. durum*, ААВВ), що має воскову осугу, з диплоїдом *Ae. comosa* (ММ), без осуги. Ініціальний амфідиплоїд осуги не мав. Отже, геном М має інгібітор воскової осуги *Iw2* у хромосомі 2-ї групи, який у складі генома амфідиплоїда пригнічував дію промотора осуги, притаманного 2В або 1В хромосомі лінії твердої пшениці. Цей амфідиплоїд був першим серед інших штучних амфідиплоїдів, які досліджуються нами, який розщепився на два морфотипи, зелений та блакитний. Це відбулось незабаром після його створення. [9] Геномно-додані амфідиплоїди серії МІТ були створені у 1988 році через схрещування тієї самої лінії пшениці твердою з різними зразками егілопса Тауша, за номерами яких вони отримали свою назву, з наступним

колхіцинуванням триплоїдних гібридів: MIT^3 , MIT^{28} , MIT^{316} , MIT^{334} , MIT^{346} , MIT^{900} та MIT^{901} . Всі амфідиплоїди були зеленими, тобто воскової осуги не мали. Проміж рослин MIT^{28} , MIT^{316} , MIT^{334} блакитні рослини з восковою осугою стали з'являтися набагато пізніше, за 10-15 років після створення. Кількісна оцінка частоти появи блакитних рослин серед зелених не дає можливості побачити будь-яку закономірність. Рослини з восковою осугою константні, тобто зелених серед них не з'являється ніколи. [7]

Авротіка, як і пшениця м'яка, є самозапалювачем. Вона не утворює природних гібридів з пшеницею м'якою при сумісному вирощуванні. Штучне запилення Авротіки пилом м'якої пшениці дає невисокий відсоток гібридів F_1 , які добре відрізняються за морфологією та фертильністю від Авротіки. Тому пояснити появу рецесивних гомозигот через самозапилення можливих гібридів між Авротікою та м'якою пшеницею неможна. Питання про можливе перезапилення амфідиплоїда Міози з пшеничними генотипами, серед яких наявність воскової осуги є звичайною ознакою, навіть не розглядалось, тому що наші кількарізкові спроби отримати фертильний гібрид F_1 від схрещування Міози з пшеницею м'якою виявилися марними. Крім того, порівняння електрофоретичних спектрів деяких білків зеленої та блакитної Міози не виявило відмінностей між ними (рис. 3.1, 3.2) і це неухильно спростовує припущення про гібридне походження нової градації ознаки (наявність воскової осуги).

Порівняння електрофоретичних спектрів зеленої та блакитної Авротіки за деякими білками дало такі саме результати, за виключенням гліадинових спектрів (рис. 3.2). Різниця в гліадиновому спектрі контрастних за восковою осугою рослин Авротіки 2 добре помітна в ω -зоні; продукти даної зони контролюються генами, розташованими у хромосомах 1-ої гомеологічної групи. [178] Спектри форм Авротіки 2 з осугою та без осуги відрізняються між собою та від спектрів Авротіки 1 та Аврори. Так, компоненти 3 та 6 наявні в Авротіці 1 та Авротіці 2 (зелені рослини), компонент 5 характерний виключно для останньої, а компонент 8, навпаки, у цієї рослин відсутній. Спектри обох

форм Авротики 2 характеризуються наявністю компонента 9, який відсутній в спектрах двох інших рослин. Компоненти 10, 11, 14, 15 наявні виключно у Авротиці 1, а компоненти зі слабкою активністю, 12 та 13, – у Авротиці 2 (блакитна рослина). За 17 та 21 компонентом контрастні форми Авротики 2 також відрізняються. Виявлена різниця в гліадинових спектрах рослин Авротики 2 та Авротики 1 може бути наслідком внутрішньохромосомної перебудови і можна думати, що вона якось вплинула на систему генів (у хромосомі 1В це ген *Iw3*), що відповідають за ознаку воскова осуга. Проте не можна не вказати на відмінність всіх трьох морфотипів Авротики у цій частині спектра, яка контролюється хромосомою 1В, від спектру Аврори, з якою Авротіка, за своїм походженням, має мати одну і ту саму хромосому 1В. Отже, ця внутрішньохромосомна перебудова відбулась під час формування геному ААВВТТ Авротіки і може і не мати відношення до подальшого її розщеплення за ознакою наявності/відсутності воскової осуги.

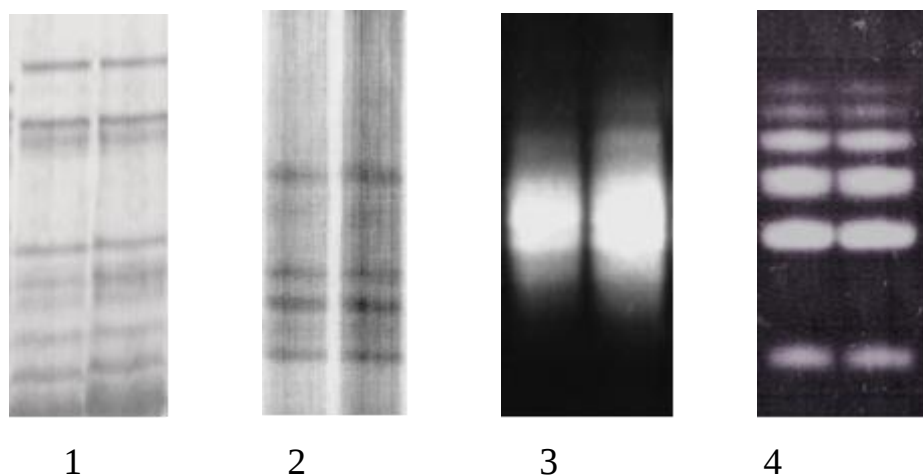


Рис. 3.1. Електрофоретичні спектри глютенінів (1), гліадинів (2), бета-амілази (3) та альфа-амілази (4) зеленої (лівий спектр у кожній парі) та блакитної (правий спектр) рослини AD (MI x *Ae.comosa*).

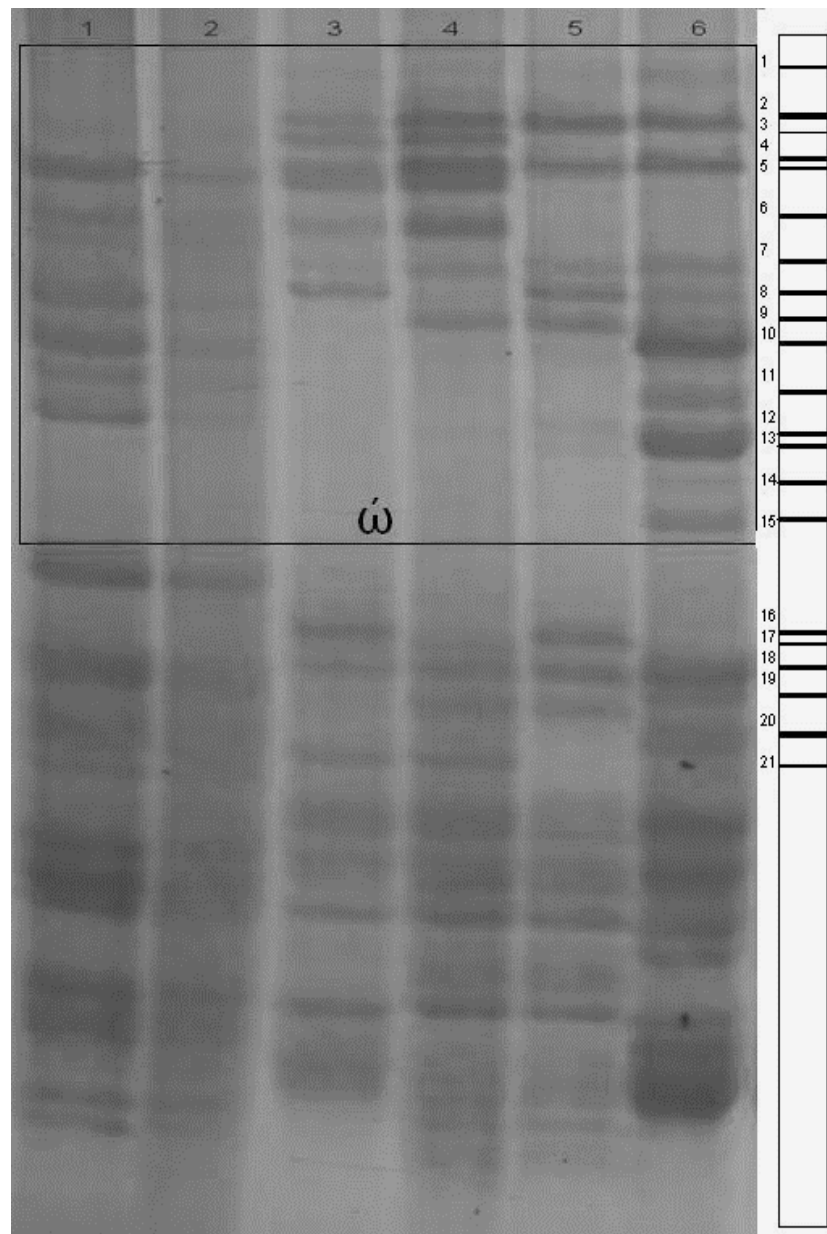


Рис. 3.2. Електрофоретичний спектр гліадинів окремих рослин: 1) Міоза (зел), 2) Міоза (бл), 3) Авротика 1, 4) Авротика 2 (зел), 5) Авротика 2 (бл), 6) Аврора.

Результати гібридологічного аналізу свідчать, що гібриди F_1 Авротика (зел) x Авротика (бл) та Міоза (зел) x Міоза (бл) у реципроках були, як правило, зеленими, хоча були й виключення (табл. 3.3, 3.4). У цілому результати оцінки гібридів від схрещування контрастних за ознакою морфотипів геномно-заміщеного амідиплоїда Авротіка та геномно-доданого амідиплоїда Міоза (табл. 3.3, 3.4) не додали розуміння того, що відбувається у

порівнянні з результатами, отриманими при схрещування інтрогресивних ліній, контрастних за ознакою інтересу (підрозділ 3.1). Справді, гібриди F_1 для деяких комбінацій з трьох були очікуваного фенотипу, але у F_2 також спостерігали надлишок рецесивних фенотипів. Зате комбінація з неочікуваним фенотипом F_1 мала розщеплення у F_2 , яке не відрізняється від 3 : 1 ($\chi^2=0,38$, $\chi^2_{\text{табл.0,05}}=3,84$) і пояснити яке ми не можемо взагалі.

Таблиця 3.3

**Характеристика компонентів схрещування, гібридів F_1 та F_2 від
схрещування рослин Авротіки з різними градаціями ознаки
наявності/відсутності воскової осуги**

Комбінація схрещування	Компоненти схрещування		Гібриди	
	♀	♂	F_1	F_2
Авротіка 1 х Авротіка 2)	зелений	блакитний	зелені	36 зелених, 28 блакитних
Авротіка 1 х Авротіка 1	зелено-блак.	зелений	зелені	16 зелених
Авротіка 1 х Авротіка 1	Зелений	блакитний	блакитні	32 блакитних
Авротіка 2 х Авротіка 1	блакитн.	зелений	зелені	36 блакитних, 23 зелених
Авротіка 2 х Авротіка 1	блакитний	зелений	зелені	41 зелених
(Авротіка 2 х Авротіка 2) F_1 х (Авротіка 1 х Авротіка 1) F_1	блакитний	зелено- блакитний	блакитний	19 блакитних
(Авротіка 2 х Авротіка 2) F_1	зелено- блакитний	блакитний	зелено- блакитний	47 зелено-блак., 38 блакитних

Спробу ідентифікувати хромосому, критичну за зміни у фенотипі, було здійснено через мікросателітний аналіз. Застосування SSR-праймерів, специфічних до хромосоми 2D, для різних морфотипів амфідиплоїдів у всіх випадках дало продукти ампліфікації, хоча цей ген не входить до складу генома жодного амфідиплоїда. Це свідчить про геномну неспецифічність застосованих мікросателітних локусів. Серед семи SSR-локусів хромосоми 2D (шість для короткого та один для довгого плечей) тільки один (*Xbarc124-2DS*) (рис. 3.3) дав різні продукти ампліфікації ДНК у зеленого та блакитного морфотипів Міози.

Таблиця 3.4

Характеристика компонентів схрещування, гібридів F₁ та F₂ від схрещування рослин Міози з різними градаціями ознаки

Комбінація схрещування	Компоненти схрещування		Гібриди	
	♀	♂	F ₁	F ₂
Міоза зел. X Міоза блак.	Зелений	блакитн.	Блакитні	12 блак. 44 зел.
Міоза зел. X Міоза блак.	блакитн.	зелений	Зелені	34 блак. 31 зел.

ДНК всіх морфотипів Авротіки з праймерами цього локусу, як і зі всіма іншими, специфічними для 2D хромосоми, мали однакові продукти ампліфікації, які проте відрізнялися від продукту Аврори.

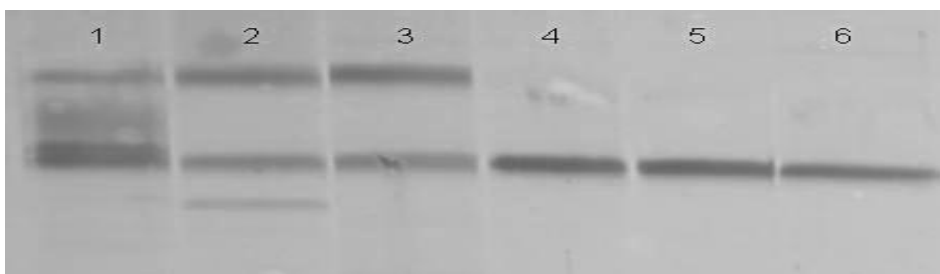


Рис. 3.3. Спектри продуктів ампліфікації ДНК рослин з праймерами мікросателітного локусу *Xbarc124-2DS*: 1) Міоза зелена, 2) Міоза блакитна, 3) Аврора, 4) Авротіка 2 зелена, 5) Авротіка 2 блакитна, 6) Авротика 1.

За літературними даними, локус *Xbarc124* знаходиться на короткому плечі хромосоми 2D на відстані 0,9 сМ від гена *Iw2*. [174] Спектри усіх зразків мають добре виражений середній компонент. Верхні компоненти характерні для обох морфотипів Міози та Аврори. Окрім цього, ДНК Міози з восковою осугою дає у спектрі ампліфікації нижній компонент, що відрізняє її як від Міози без осуги, так і від інших зразків. Оскільки ДНК Міози дає продукт ампліфікації з праймерами, специфічними до локуса хромосоми 2D пшениці, такий локус є і на гомеологічній хромосомі геному М. Поліморфізм за спектрами ДНК Міози зеленої і блакитної дає змогу припустити, що він спричинюється якоюсь зміною у хромосомі 2М, яка заचाпає ген ортологічної серії *Iw2*.

Серед шести SSR-локусів хромосоми 2В (чотири для короткого та два для довгого плечей) три (*Xcfd238*-2BS, *Xbarc318*-2BS, *Xwmc361*-2BL) (рис. 3.4–3.6) дали різні продукти ампліфікації з ДНК зеленого та блакитного морфотипів Міози. Спектри ДНК різних морфотипів Авротіки в жодному випадку відмінностей не мали.

На електрофоретичному спектрі усіх зразків з праймерами локусу *Xcfd238* наявний чіткий подвійний продукт. Проте у Міози з восковою осугою також наявний верхній компонент, який робить його відмінним від інших зразків.

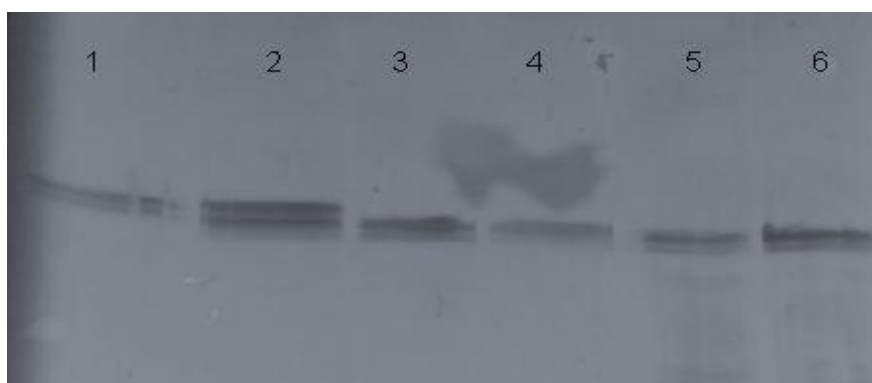


Рис. 3.4. Спектри продуктів ампліфікації ДНК рослин з праймерами мікосателітного локуса *Xcfd238*-2BS: 1) Міоза зелена, 2) Міоза блакитна, 3) Аврора, 4) Авротіка 2 зелена, 5) Авротіка 2 блакитна, 6) Авротіка 1.

У спектрах Міози з восковою осугою та Міози без воскової осуги з праймерами міросателітного локуса *Xbarc318* наявний верхній компонент. За нижнім компонентом зразки не відрізняються.

У спектрі ампліфікації ДНК Міози з воскової осуги з праймерами локусу *Xwmc361* у наявності зайвий компонент, якого не дають ДНК інших морфотипів. Взагалі, при використанні для ампліфікації праймерів всіх трьох локусів ДНК Міози з восковою осугою мала якийсь зайвий компонент у спектрі у порівнянні зі спектром ДНК зеленого аналогу.

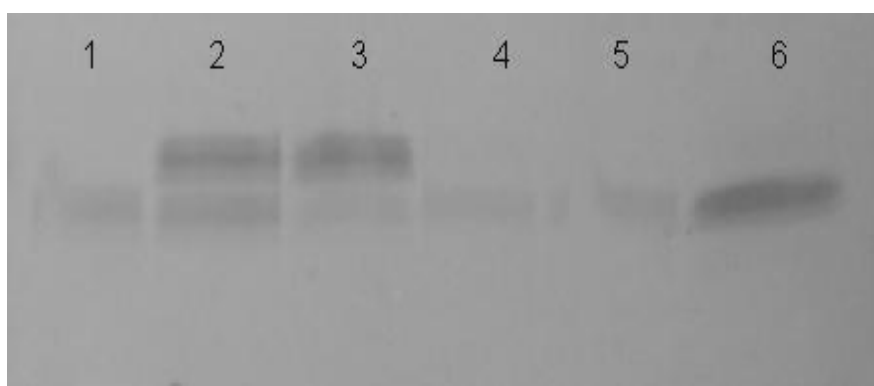


Рис. 3.5. Спектри продуктів ампліфікації ДНК рослин з праймерами міросателітного локуса *Xbarc318*-2BS: 1) Міоза зелена, 2) Міоза блакитна, 3) Аврора, 4) Авротіка 2 зелена, 5) Авротіка 2 блакитна, 6) Авротіка 1.

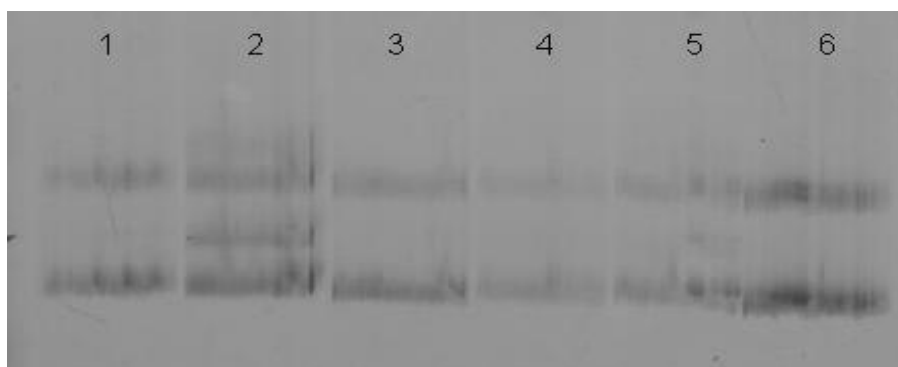


Рис. 3.6. Спектри продуктів ампліфікації ДНК рослин з праймерами до міросателітного локуса *Xwmc361*-2BL: 1) Міоза зелена, 2) Міоза блакитна, 3) Аврора, 4) Авротіка 2 зелена, 5) Авротіка 2 блакитна, 6) Авротіка 1.

Таким чином, застосування мікросателітного аналізу показало різницю для маркерів, локалізованих на короткому плечі 2D хромосоми та обох плечах хромосоми 2В контрастних зразків Міози, хоча гени-промотори воскової осуги розташовані на короткому плечі. Виходячи з фенотипу вихідних компонентів схрещування, ген-інгібітор воскової осуги знаходиться у геномі М, який Міоза отримала від *Ae. comosa*. Спектри ампліфікації ДНК, виділеної з контрастних морфотипів, відрізняються при застосування праймерів, специфічних для хромосом 2В та 2D пшениці, отже, за принципом transferability [179], продукти ампліфікації дає хромосома 2М егілопса. Здається, що ген-інгібітор розвитку осуги, який мутує від домінантного алеля до рецесивного, знаходиться на хромосомі 2М Міози.

Шпильчин В.В. М.З. Антонюк, Т.К. Терновська. Фенотипний поліморфізм за ознакою воскова осуга серед представників підтриби Triticinae. Наукові записки НаУКМА. 2010; Т.106. Біологія та екологія: 3–8. *(Особистий внесок здобувача: польова оцінка, ПЛР аналіз, взято участь в обговоренні результатів та написанні статті).*

Шпильчин В.В., Терновська Т.К. Зміна прояву ознаки воскова осуга у генераціях амфідиплоїдів підтриби Triticinae. Наукові записки НаУКМА. 2011; Т.119. Біологія та екологія: 3–7. *(Особистий внесок здобувача: польова оцінка, ПЛР аналіз, взято участь в обговоренні і аналізі результатів, та написанні статті).*

3.3. Генетичний аналіз амфідиплоїда Авротіка за ознакою наявності/відсутності воскової осуги

3.3.1. Гібридологічний аналіз. До гібридологічного аналізу було залучено п'ять контрастних за проявом ознаки наявності/відсутності воскової осуги зразки геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка: Авротіка 1 (зелена), Авротіка 1 (зелено-блакитна), Авротіка 2 (зелена), Авротіка 2 (зелено-блакитна)

та Авротіка 2 (блакитна). Беручи до уваги походження геномно-заміщеного амфідиплоїда, який об'єднує тетракомпонент AABV сорту Аврора та геном Т *Ae. mutica*, фенотипи всіх зразків, залучених до дослідження, а також відомості про генетичний контроль ознаки наявності/відсутності воскової осуги у пшениці, наведені у підрозділі 3.1, зразкам, що досліджуються, були запропоновані певні гаплотипи за генами інтересу (табл. 3.5). Пропозицію гаплотипу створювали, спираючись на наступні міркування.

1. Гени *W1* та *iw1* мають бути у складі хромосоми 2В Авротіки адже вона має компонент AABV від генотипу Аврора. Якщо б перший з двох генів, промоторів розвитку осуги, був представлений у Аврори рецесивним алелем, Авротіка б ніколи не утворювали морфотип з воскової осуги, адже вона не має хромосоми 2D, у якій розташований другий промотор розвитку воскового шара у пшениці.

2. У Авротіці субгеному D немає, отже немає генів *W2* та *iw2*, локалізованих у хромосомі 2D.

3. Ген *Iw3* на хромосомі 1В Авротіки (хромосома отримана від Аврори у складі компоненту AABV) представлений рецесивним алелем *iw3*. В іншому випадку сорт Аврора мав би яскраво-зелений колос та листки, покриті осугою (зелено-блакитний фенотип), а це не так.

4. Оскільки об'єднання блакитного тетракомпонента AABV Аврори та генома TT виду *Ae. mutica* без воскової осуги (зелений) продукувало зелений амфідиплоїд, геном Т у хромосомі гомологічної групи 2 містить домінантний ген *Iw2(T)*, член однойменної серії ортологів пшениці м'якої. Його епістатична дія інгібує вираз гена *W1*, локалізованого на хромосомі 2В.

5. У хромосомі 1Т має бути наявним домінантний інгібітор *Iw3(T)*, хоча його прояв у рослинах *Ae. mutica* та зелених рослинах амфідиплоїда Авротіка маскується епістатичною дією гена *Iw2(T)*: гібриди F₁ від схрещування зелених та зелено-блакитних рослин, як правило, зелені. [177] Для Авротіки це припущення підтверджується вищепленням з зеленої Авротіки 1 рослин зелено-блакитних. Тому вихідний амфідиплоїд Авротіка мав мати гаплотип

Таблиця 3.5

Характеристика морфотипів Авротіки, контрастних за ознакою наявності/відсутності воскової осуги, та гібридів між ними

Комбінація схрещування	Фенотип рослин			Гаплотип рослин*	
	♀	♂	F ₁	♀	♂
Авротіка 1 х Авротіка 1	зелено-блакитна	Зелена	Зелена	<i>iw3 W1 iw1 iw2(T) Iw3(T)</i>	<i>iw3 W1 iw1 Iw2(T) Iw3(T)</i>
Авротіка 2 х Авротіка 1	Блакитна	Зелена	Зелена	<i>iw3 W1 iw1 iw2(T) iw3(T)</i>	<i>iw3 W1 iw1 Iw2(T) Iw3(T)</i>
Авротіка 1 х Авротіка 2	Зелена	Блакитна	Зелена	<i>iw3 W1 iw1 Iw2(T) Iw3(T)</i>	<i>iw3 W1 iw1 iw2(T) iw3(T)</i>
Авротіка 2 х Авротіка 2	Блакитна	зелено-блакитна	зелено-блакитна	<i>iw3 W1 iw1 iw2(T) iw3(T)</i>	<i>iw3 W1 iw1 iw2(T) Iw3(T)</i>
Авротіка 2 х Авротіка 2	зелено-блакитна	блакитна	зелено-блакитна	<i>iw3 W1 iw1 iw2(T) Iw3(T)</i>	<i>iw3 W1 iw1 iw2(T) iw3(T)</i>

* Наводиться гаплотип замість генотипа для скорочення запису; оскільки амфідиплоїди самозапильються, вони мають бути гомозиготними.

$iw3\ W1\ iw1\ Iw2(T)\ Iw3(T)$, а зелено-блакитний морфотип – $iw3\ W1\ iw1\ iw2(T)\ Iw3(T)$, розрізняючись лише за одним геном. Між зеленою Авротікою 1 та блакитною Авротікою 2 припущено різницю у два гени, гаплотип блакитного морфотипу $iw3\ W1\ iw1\ iw2(T)\ iw3(T)$. Запропоновані гаплотипи були підтверджені результатами сегрегаційного аналізу (табл. 3.6).

За результатами гібридологічного аналізу, зелено-блакитний фенотип, гіпостатичний до дії гена $Iw2(T)$, має утворюватися від самозапилення моногетерозигот $W1W1\ Iw2(T)iw2(T)\ Iw3(T)Iw3(T)$ або дигетерозигот $W1W1\ Iw2(T)iw2(T)\ Iw3(T)iw3(T)$. Він характеризується генотипом $W1W1\ iw2(T)iw2(T)\ Iw3(T)$. Тобто для появи зелено-блакитних рослин достатньо одної мутації, $Iw2(T) \rightarrow iw2(T)$ з наступним самозапиленням. Ген $Iw3(T)$ може залишатися інтактним. Блакитні рослини Авротика 2 з'являються в популяції зеленої Авротики 2 в результаті самозапилення дигетерозиготної зеленої рослини Авротика 2 $W1W1\ Iw2(T)iw2(T)\ Iw3(T)iw3(T)$. Появу блакитних рослин серед нащадків зеленої Авротики 2 ми спостерігаємо регулярно, хоча для цього потрібно одночасне мутування в двох генах. Блакитні рослини можуть з'являтися також серед нащадків гетерозиготної зелено-блакитної рослини $W1W1\ iw2(T)iw\ Iw3(T)iw3(T)$. Висока частота (до 30%) появи блакитних рослин Авротика 2 серед нащадків зеленої Авротика 2 показує, що серед останніх багато дигетерозигот. Факт одночасного мутування в двох різних генах не може бути пояснений, якщо стояти на позиції випадковості мутагенезу, який відбувається зі середньою частотою 10^{-5} на ген на покоління. За останні 10–15 років у літературі накопичений достатній матеріал, який свідчить, що у рослинних геномах, походження яких пов'язане з алополіплоїдизацією або з віддаленою гібридизацією, відбуваються процеси, які можна розуміти як дестабілізацію такого генома. На фенотипному рівні це поява нових ознак, яких не було у батьківських форм [99], нові алелі генів запасних білків [180,181], суттєві зміни у експресії генів [88,182] аж до їхнього мовчання. [183] Для геному Авротіки, геномно-заміщеного амфідиплоїда, в якого частина геному пшениці м'якої, а саме, субгеноми А та В, сполучається з геномом Т

диплоїдного егілопсу, також можуть бути притаманні певні молекулярні події, які призводять до його генетичної нестабільності.

Як видно з підрозділу 3.1, результати гібридологічного аналізу, наведені у табл. 3.6, не є першою спробою зрозуміти генетичну природу появи рослин з восковою осугою серед таких без осуги. Схрещування між контрастними генотипами та спостереження за розщепленням у F_2 ми здійснювали і раніше (табл. 3.1, 3.2). Отримані результати не можна було пояснити моно- чи дигенною моделлю успадкування через суттєве збільшення проти теоретично очікуваного обсягу фенотипного класу «блакитні рослини». Більш того, в кількох випадках від схрещування зелених (домінантна ознака) з блакитними чи зелено-блакитних (домінантна ознака) з блакитними рослини F_1 мали рецесивний фенотип. За результатами, наведеними у підрозділі 3.1, було зроблено припущення, що ексцес блакитних рослин у F_2 , також як рецесивний фенотип рослин F_1 можуть бути спричинені залученням до гібридизації рослин, які не є гомозиготними за домінантними алелями.

В комбінаціях, наведених у табл. 3.5, для всіх рослин з домінантним фенотипом, які були задіяні в отриманні гібридів F_1 у якості материнських чи батьківських форм, доводили їхню гомозиготну природу через спостереження за нащадками, отриманими від самозапилення рослини, що брала участь у схрещуванні. Так було зроблено саме через те, що за нашими спостереженнями вищеплення блакитних рослин серед нащадків домінантного фенотипу спостерігалось постійно, і виникла думка, що надлишку рецесивних гомозигот у F_2 може і не спостерігатися, якщо виключити від подальшого використання насіння, отримані від рослин, які, за нащадками від самозапилення, виявили себе гетерозиготами. Результати розщеплення в F_2 (табл. 3.6, 3.7) це припущення підтвердили повністю. Коли у схрещуванні брали участь тільки гомозиготні рослини з домінантним фенотипом, співвідношення розщеплення не відрізнялось від моногібридного для пар Авротіка 2 зелена – Авротіка 2 зелено-блакитна, Авротіка 2 зелено-блакитна – Авротіка 2 блакитна, Авротіка 1 зелена – Авротіка 1 зелено-блакитна. Співвідношення розщеплення 12 : 3 : 1,

характерне для дигібридного розщеплення з домінантним епістазом, спостерігали при схрещуванні Авротіка 1 зелена х Авротіка 2 блакитна.

Результати гібридологічного аналізу довели, що різниця між контрастними за фенотипом формами Авротіки забезпечується одним геном для зеленої та зелено-блакитної Авротіки 1, одним геном для зеленої та блакитно-зеленої Авротіки 2, одним геном (іншим) для зелено-блакитної та блакитної Авотіки 2 та двома генами для зеленої та блакитної Авротіки 2. Статистично доведено (табл 3.8), що немає розбіжностей між емпіричними та теоретично очікуваним на підставі запропонованих генотипів співвідношеннями обсягів фенотипних класів. Проте у всіх комбінаціях схрещування на всіх етапах оцінки розщеплення кількість блакитних рослин завжди більше очікуваної, а кількість рослин з домінантним фенотипом – менше (табл. 3.8).

Такий самий надлишок блакитних рослин серед F_2 від схрещування зелених та блакитних зразків пшениці спостерігались раніше у гібридологічному аналізі так званих геномно-доданих гексаплоїдів пшениці, геноми яких також мали гібридне походження. [7,184] З одного боку, це були звичайні амфідиплоїди гібридів F_1 від схрещування пшениці *T. durum* Desf. з диплоїдним видом *Ae. tauschii*, результуючий геном AABBDD. Ці амфідиплоїди не мали воскової осуги, тобто були зеленими. З іншого боку, гексаплоїди, які об'єднували той самий геном твердої пшениці та субгеном D одного з сортів м'якої пшениці. Їхнє походження було складним і включало кілька подій гібридизації. Спочатку отримали 35-хромосомний гібрид між м'якою та твердою пшеницею з геномом AABBDD. Його схрестили з твердою пшеницею. Кількість хромосом серед нащадків коливалась від 28 (AABB) до 35 (AABBDD). Через цитологічний контроль добирали 35-хромосомні рослини та беккроссували їх з пшеницею твердою п'ять разів. В результаті вийшли форми, в яких субгеном AABB м'якої пшениці був заміщений геномом AABB пшениці твердої, а геном DD залишився без змін. [184] Всі вони були з восковою осугою. Зелені та блакитні геномно-додані форми були піддані

Таблиця 3.6

Обсяги фенотипних класів у F₂ від схрещування контрастних за восковою осугою зразків *Triticinae*, оцінених на різних етапах вивчення популяцій

Комбінація схрещування та фенотипи	Посіяно восени	Обсяги фенотипних класів серед рослин, які:		
		Оцінено на стадії колосіння	Зібрано зрілих	Дали початок родинам F ₃ та були джерелом ДНК
Авротика 1(зел- блак) х Авротика 1(зел)	160	70 50(зел) : 20(зел-блак)	49 31(зел) : 18(зел-блак)	27 17(зел) : 10(зел-блак)
Значення χ^2 для 3(зел) : 1(зел-блак)*	—	0,48	3,59	2,09
Авротика 1(зел) х Авротика 2(блак)	160	54 45(зел) : 5(зел- блак) : 4(блак)	50 43(зел) : 4(зел- блак) : 3(блак)	33 26(зел) : 4(зел- блак) : 3(блак)
Значення χ^2 для 12(зел) : 3 (зел- блак) : 1(блак)**	—	3,21	3,89	1,26

* $\chi^2_{\text{табл } 0.05} = 3,84$ та $\chi^2_{\text{табл } 0.01} = 6,64$ для df = 1

** $\chi^2_{\text{табл } 0.05} = 5,99$ та $\chi^2_{\text{табл } 0.01} = 9,21$ для df = 2.

Таблиця 3.7

Обсяги фенотипних класів у F₂ від схрещування контрастних за восковою осугою зразків *Triticinae*, оцінених на різних етапах вивчення популяцій (комбінації, з рослин яких не брали ДНК)

Комбінація схрещування та фенотипи	Посіяно восени	Оцінено на стадії колосіння	Значення χ^2 та df
Авротика 1(зел) х Авротика 2(блак)	120	48(зел) : 5(зел-блак) : 4(блак)	3,73, $df = 2^{**}$
Авротика 2(зел-блак) х Авротика 2(блак)	100	15(зел-блак) : 7(блак)	0,55, $df = 1^*$
Авротика 2(блак) х Авротика 2(зел-блак)	200	29(зел-блак) : 13(блак)	0,79, $df = 1^*$

* $\chi^2_{\text{табл } 0.05} = 3,84$ та $\chi^2_{\text{табл } 0.01} = 6,64$ для $df = 1$

** $\chi^2_{\text{табл } 0.05} = 5,99$ та $\chi^2_{\text{табл } 0.01} = 9,21$ для $df = 2$.

Таблиця 3.8

**Емпіричні та теоретичні обсяги фенотипних класів у F₂ від схрещування морфотипів Авротики,
контрастних за восковою осугою**

Комбінація схрещування та фенотипи	Співвідношення між фенотипними класами серед рослин, які:		
	Оцінено на стадії колосіння	Убрано зрілих	Дали початок родинам F ₃ та були джерелом ДНК
Авротика 1(зел-блак) х Авротика 1(зел)	Т: 53(зел)+17(зел-блак) Е: 50(зел)+20(зел-блак)	Т: 37(зел)+12(зел-блак) Е: 31(зел)+18(зел-блак)	Т: 20(зел)+7(зел-блак) Е: 17(зел)+10(зел-блак)
Авротика 1(зел) х Авротика 2(блак)	Т: 48(зел)+12(зел-блак)+4(блак) Е: 53(зел)+6(зел-блак)+5(блак)	Т: 46(зел)+11(зел- блак)+4(блак) Е: 50(зел)+6(зел- блак)+5(блак)	Т: 33(зел)+8(зел- блак)+3(блак) Е: 35(зел)+5(зел- блак)+4(блак)
Авротика 1(зел) х Авротика 2(блак)	Т: 50(зел)+13(зел-блак)+4(блак) Е: 56(зел)+6(зел-блак)+5(блак)		
Авротика 2(зел-блак) х Авротика 2(блак)	Т: 17(зел-блак)+5(блак) Е: 15(зел-блак)+7(блак)		
Авротика 2(блак) х Авротика 2(зел-блак)	Т: 32(зел-блак)+10(блак) Е: 29(зел-блак)+13(блак)		

гібридологічному аналізу і встановлено моногенне успадкування ознаки. Проте автори констатували [185] для всіх комбінацій схрещування надлишок блакитних рослин у F_2 та аналізуючому схрещуванні, який статистично не спотворював співвідношень розщеплення, яке має бути при моногенній різниці між контрастними генотипами, проте привертав до себе увагу, тому що був односпрямований у всіх комбінаціях схрещувань. [7] Крім того, за декілька генерацій після створення зелених амфідиплоїдів серед них стали з'являтися їхні блакитні аналоги. Амфідиплоїди є самозапилювачами та добре відрізняються за морфологією колосу від сортів м'якої пшениці, а також блакитних геномно-додатних гексаплоїдів з субгеномом D м'якої пшениці. Як було аргументовано у підрозділі 3.2, перезапилення амфідиплоїдів з пшеницею м'якою с утворенням нових морфотипів виключалось. Із семі створених амфідиплоїдів *T. durum-Ae. tauschii* [7] на сьогоднішній день лише в одному з них, МІТ³⁴⁶, досі не з'явилося блакитних форм. Серед нащадків МІТ²⁸ вони з'явилися уперше лише чотири роки тому. А почали спостерігати цей феномен на початку 90-х років за кілька генерацій після створення амфідиплоїдів. [7] Так, для амфідиплоїда МІТ³³⁴ зелений аналог на сьогодні втрачений, є лише блакитні рослини. За результатами гібридологічного аналізу, зелений колір рослин МІТ забезпечується домінантним алелем *Iw2*, розташованим у хромосомі 2D егілопса Тауші. [185] Як і у випадку з геномно-заміщеним амфідиплоїдом Авротіка, появу блакитних аналогів серед зелених амфідиплоїдів МІТ можна пояснити лише мутуванням алеля *Iw2* до алеля *iw2*. Чому мутування відбувається з високою частотою та є характерним для геномів гібридного походження, поки не зрозуміло.

Для двох комбінацій схрещування ми маємо дані їхньої оцінки за ознакою інтересу на різних етапах онтогенезу: під час колосіння, на зрілих рослинах, на тих рослинах, що виявилися достатньо фертильними для формування родин F_3 . Для комбінації схрещування Авротіка 1 зелена х Авротіка 2 блакитна видно, що зменшення кількості оцінених рослин від першої до третьої оцінки відбувається майже виключно за рахунок зелених рослин (табл. 3.6). Здавалосьь

би, можна надлишок блакитних рослин пояснити більш високою їхньою життєздатністю у порівнянні з зеленими рослинами. Тоді надлишок блакитних рослин у поколіннях F_2 та BC_a легко визнати результатом негативного добору проти менш пристосованих зелених рослин, який відбувається протягом онтогенезу від паростків до стадії зрілості. У всіх попередніх дослідженнях [12,185] оцінку ознаки виконували лише на стадії зрілих рослин, в момент максимальної реалізації пристосованості блакитних рослин, якщо вона дійсно має місце. У літературі взагалі широко розповсюдженим поглядом на ознаку наявності воскової осуги є її адаптивне значення. Вважається, що воскова осуга захищає рослину від опромінення, зменшує температуру листків, збільшує ефективність використання води та підвищує, за певних умов, врожайність у ячменя та пшениці [186,187], хоча за інших умов відмічався негативний вплив воскової осуги на показники продуктивності [1,188] та на стійкість до борошнистої роси. [189] За нашими даними, у другій комбінації, Авротіка 1 зелено-блакитна х Авротіка 1 зелена скорочення кількості зелених та блакитних рослин відбувалось пропорційно їхнім вихідним кількостям, що не підтримує припущення про більш високу адаптивну цінність блакитних рослин. Серйозним аргументом проти того, що збільшення обсягу класу блакитних рослин у популяціях, що розщеплюються, відбувається через їхню більш високу пристосованість у порівнянні з зеленими рослинами, слугує встановлений нами факт появи блакитних рослин серед гібридів F_1 від схрещування зелених та блакитних інтрогресивних ліній м'якої пшениці, коли таких рослин взагалі не мало бути. [176] Тому збільшення кількості блакитних рослин проти теоретично очікуваної слід вважати перш за все наслідком якоїсь молекулярної події, яка позбавляє ефективності домінантні алелі ортологічної серії I_w .

3.3.2. Мікросателітний аналіз. Вивчення поліморфізму контрастних форм за мікросателітними локусами, однією з найбільш розповсюджених маркерних систем [188], та його можливого зв'язку з ознакою наявності/відсутності осуги було здійснено для коротких плечей хромосом 2В

та 2D. Вибір саме цих хромосом пояснюється, що на них локалізовані інгібітори воскової осуги *Iw*, епістатичні як до генів *W1* та *W2*, так і до гена *Iw3(T)*. Отже, мікросателітному аналізу було піддано популяцію [Авротіка 1(зелена) х Авротіка 2(блакитна)] F_2 , яка розщеплюється за генами *Iw2(T)* та *Iw3(T)* (хромосома 1B). SSR-локусів, специфічних для геному Т, поки не ідентифіковано, а, судячи з припущених нами гаплотипів, розщеплення відбувається за генами саме цього геному. Із 9 перевірених локусів, специфічних для хромосоми 2B, продукту не дав один (приблизно 10%), а поліморфними для контрастних батьківських форм були лише два, *Xgwm429* та *Xbarc167* (рис. 3.7). Із 18 локусів, специфічних до хромосоми 2D, продуктів не було отримано з 7 парами праймерів (приблизно 40%), а поліморфними виявилися 3 локуси, *Xbarc142*, *Xgwm102* та *Xgwm702*. Цей останній результат узгоджується з відсутністю геному D в рослинах Авротіки та підтверджує гомеологію між геномами Т та D, про яку свідчить також регулярне утворення бівалентів між хромосомами цих двох геномів. [190]

Перевірка кожного з п'яти поліморфних локусів на відповідність моногенному розщепленню серед рослин F_2 гібриду Авротіка 1 зелена х Авротіка 2 блакитна показала, що всі п'ять SSR-локусів є селективно нейтральними та можуть бути використані для перевірки їхнього зв'язку з ознакою інтересу (табл. 3.9).

Розподіл нащадків F_2 за сполученням алелів двох мікросателітних локусів, специфічних для хромосоми 2B, свідчить, що батьківські сполучення алелів переважають над рекомбінантними: 3 рослин із гаплотипом *Xgwm429* 208 *Xbarc* 167 254 та 9 рослин з гаплотипом *Xgwm429* 206 *Xbarc167* 260 проти теоретично очікуваних двох рослин ($0,25 \times 0,25 \times 33 = 2,06$) для кожного з вказаних гаплотипів (за точним двобічним критерієм Фішера, $P=0,04$). Це відповідає факту розташування цих локусів на хромосомі 2B (рис. 3.8).

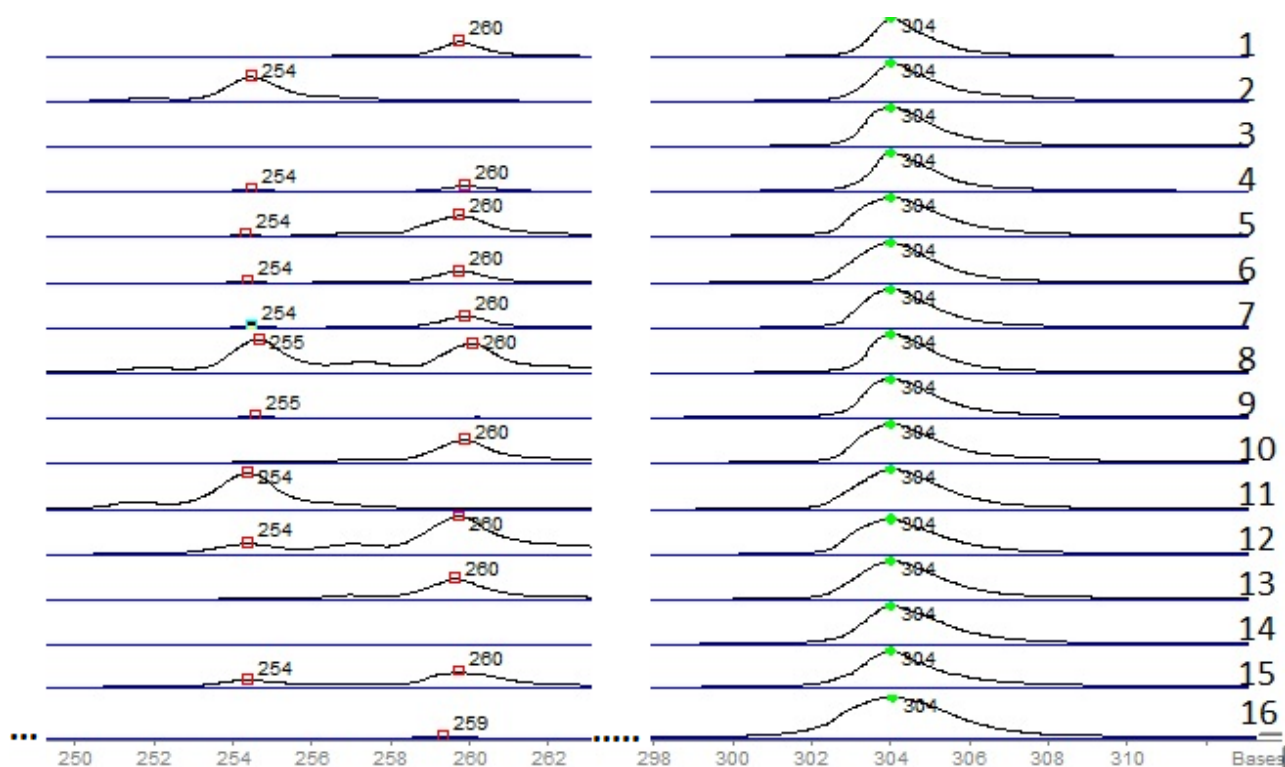


Рис 3.7 Продукти ампліфікації (фрагмент зображення) ДНК з праймером *Xbarc167*, проаналізовані за допомогою програми Fragment Analyzer 1.00.36 (Amersham Biosciences). У вигляді піків представлені фрагменти ДНК різних алелів. Внизу – шкала в п.н., розрахована з внутрішніх стандартів відомих розмірів. 304 п.н. – внутрішній стандарт; 1-16 зразки ДНК рослин з популяції [Авротіка 1(зелена) x Авротіка 2(блакитна)]F₂.

На невеликій відстані від локусів *Xgwm429* та *Xbarc167* локалізовані два гени, що беруть участь у контролі воскової осуги, *W1* та *Iw1*. Проте запропоновані нами гаплотипи батьківських форм не завбачують розщеплення за цими генами, адже є однаковими за ними. Гаплотип *Xgwm429* 206 *Xbarc167* 260 за локусами хромосоми 2В притаманний Авротиці 2 з восковою осугою. Якщо розщеплення за ознакою наявності/відсутності воскової осуги дійсно не має відношення до локусів *Xgwm429* та *Xbarc167*, серед рослин F₂ з таким гаплотипом теоретично очікується 6 зелених та 2 блакитні (або зелено-блакитна), насправді було 5 зелених та 3 блакитних та зелено-блакитних (табл. 3.10), що не відрізняється від очікуваних кількостей (за точним двобічним критерієм Фішера, $P = 1,0$). Отже, за генами *W1* та *Iw1* розщеплення

дійсно не відбувається, що підтверджує запропоновані нами гаплотипи батьківських рослин.

Таблиця 3.9

**Розщеплення за алелями мікросателітних локусів у популяції (Авротика 1
зелена х Авротика 2 блакитна) F₂**

Локус та його алелі*	Кількість рослин з генотипом			Значення χ^2 та P для співвідношення 1:2:1**
	<i>aa</i>	<i>ab</i>	<i>bb</i>	
<i>Xgwm429</i> 208(<i>a</i>), 206(<i>b</i>)	5	18	10	1,79 P>0,05
<i>Xbarc167</i> 254(<i>a</i>), 260(<i>b</i>)	7	15	11	1,24 P>0,05
<i>Xbarc142</i> 272(<i>a</i>), 268(<i>b</i>)	7	15	11	1,24 P>0,05
<i>Xbarc102</i> 203(<i>a</i>), 195(<i>b</i>)	9	15	8	0,27 P>0,05
<i>Xgwm702</i> 147(<i>a</i>), 144(<i>b</i>)	9	13	11	1,73 P>0,05

* Алель «а» властивий компоненту схрещування Авротіка 1(зелена), алель «b» –Авротіка 2(блакитна);

** для $df=2$. $\chi^2_{\text{табл. } 0,05} = 5,99$.

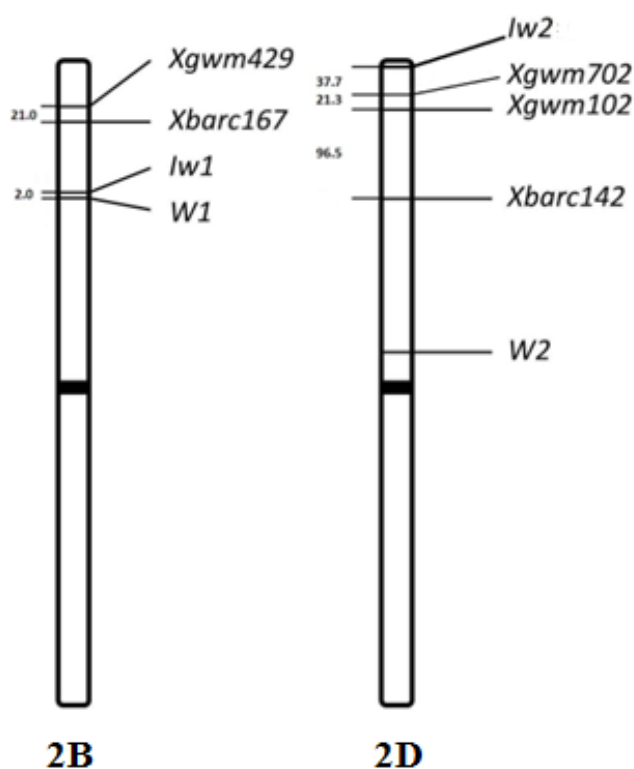


Рис. 3.8. Хромосомна локалізація мікросателітних локусів, що вивчалися, та генів воскової осуги. Відстань дано у сМ. [70,191]

Таблиця 3.10

**Результати генотипування рослин [Авротіка 1 (зел) х Авротіка 2 (блак)] F₂
за алелями мікросателітних локусів, специфічних для хромосом 2В та 2D
пшениці**

Номер рослини	Характеристика рослин F ₂					
	за фенотипом	за алелями мікросателітних локусів*				
		Xgwm429	Xbarc167	Xgwm102	Xbarc142	Xgwm702
1	зелена	206 206	260 260	203 203	272 268	147 147
2	зелена	208 208	254 260	203 203	272 272	147 147
5	зелена	208 208	254 254	203 195	272 268	147 147
6	зелена	208 206	254 260	195 195	272 268	147 144
8	зелена	208 206	254 260	195 195	272 268	147 144
9	зелена	206 206	260 260	203 195	272 272	144 144
10	зелена	208 206	254 260	203 195	272 268	147 144
13	зелена	208 206	254 254	203 195	272 268	147 144
14	блакитна	208 206	254 260	203 195	268 268	144 144
15	зелена	208 206	254 260	203 203	272 268	147 147
16	зелена	206 206	260 260	203 203	272 268	147 147
17	зелена	206 206	254 260	203 203	268 268	144 144
18	зелена	206 206	260 260	203 203	268 268	147 144
19	зелена	206 206	260 260	203 203	272 272	147 147
20	зелено- блакитна	208 206	254 254	203 195	272 268	144 144
21	блакитна	206 206	260 260	203 203	268 268	144 144
22	зелена	206 206	260 260	203 195	272 272	147 144
23	зелена	208 206	254 260	203 195	272 272	147 144
25	зелено- блакитна	208 208	254 254	203 195	272 272	144 144

Продовження таблиці 3.10						
Номер рослини	Характеристика рослин F ₂					
	за фенотипом	за алелями мікросателітних локусів*				
		<i>Xgwm429</i>	<i>Xbarc167</i>	<i>Xgwm102</i>	<i>Xbarc142</i>	<i>Xgwm702</i>
29	блакитна	208 206	254 260	195 195	268 268	147 147
30	блакитна	208 206	254 260	195 195	268 268	144 144
31	зелено- блакитна	206 206	260 260	203 195	272 272	144 144
32	зелена	208 206	254 260	203 195	272 268	147 144
33	зелена	208 206	254 254	195 195	268 268	147 144
34	зелена	208 206	254 260	195 195	272 268	147 144
35	зелена	208 206	254 260	203 195	268 268	147 147
36	зелена	208 206	254 260	203 195	272 268	147 144
37	зелена	208 208	260 260	203 195	268 268	147 144
38	зелена	208 206	254 260	203 195	268 268	147 144
39	зелена	208 206	254 254	203 195	268 268	144 144
42	зелена	208 206	260 260	195 195	272 268	147 147
43	зелено- блакитна	208 208	260 260	195 195	272 268	144 144
44	зелено- блакитна	206 206	260 260	203 203	272 268	144 144

* Алелі Авротіки 1 (зел) *Xgwm429* 208, *Xbarc167* 254, *Xbarc142* 272, *Xgwm102* 203, *Xgwm702* 147; алелі Авротіки 2 (блак) *Xgwm429* 206, *Xbarc167* 260, *Xbarc142* 268, *Xgwm102* 195, *Xgwm702* 144.

З праймерами до локусів, специфічних до хромосоми 2D, відбувається ампліфікація ДНК Авротіки з геномом AABBTT, де геному D немає. Зважаючи на добре задокументоване явище transferability для різних геномів Triticinae [179,192–194], цілком легітимним є припущення, що локуси *Xbarc142*, *Xgwm102* та *Xgwm702* є специфічними не лише для хромосоми 2D, а й для

хромосоми 2Т. При цьому не можна виключити також можливість ампліфікації ДНК хромосоми 2В з праймерами локусів, специфічних для хромосоми 2D. В такому випадку, зважаючи на хромосомну локалізацію п'яті мікросателітних локусів, що розглядаються (рис. 3.7), слід очікувати асоційованого успадкування алелів мікросателітних локусів, специфічних для хромосом 2В та 2D. Вивчення рослин F_2 за сумісним розщепленням за алелями мікросателітних локусів, специфічних для хромосом 2В та 2D, показало, що вони успадковуються незалежно один від одного. Це прямо вказує на те, що ампліфікація з праймерами до локусів хромосоми 2D відбувається з ДНК хромосоми 2Т, а не 2В.

Перевірка незалежності успадкування трьох мікросателітних локусів, розташованих на хромосомі 2Т, не виявила зв'язку між локусами *Xbarc142* та *Xgwm102*, *Xbarc142* та *Xgwm702*. Успадкування алелів локусів *Xgwm102* та *Xgwm702* у батьківських сполученнях начебто переважало над успадкованими рекомбінантними сполученнями: рослин F_2 з гаплотипом *Xgwm102* 203 *Xgwm702* 147, властивим Авротиці 1 (зелена) було 5, а з гаплотипом *Xgwm102* 195 *Xgwm702* 144, властивим Авротиці 2 (блакитна) — 3 замість теоретично очікуваних двох в обох випадках (табл. 3.10). Однак статистично це не доводиться, за точним критерієм Фішера $P=0,17$. Хоча на карті пшеничної хромосоми ці локуси розташовані поруч (рис. 3.7), однак у нашому рослинному матеріалі рекомбінували хромосома 2Т, можливо, для неї ця карта не адекватна.

3.3.3. Пошук асоціації між SSR-локусами та генами інтересу. З двох генів, *Iw2(T)* *Iw3(T)*, за якими, виходячи з запропонованих гаплотипів батьківських форм, відбувається розщеплення, ми можемо дослідити зв'язок з мікросателітними алелями лише для гена *Iw2(T)*, оскільки ген *Iw3(T)* має бути розташований у хромосомі 1Т, яку ми не досліджували за допомогою мікросателітів. За локусом *Xgwm102* блакитній Авротиці 2 властивий алель 195. Серед 8 рослин F_2 , гомозиготних за цим алелем, було 5 зелених та 3 блакитних та зелено-блакитних, які формуються генотипом *iw2(T) iw2(T)*, як це має бути при незалежному успадкуванні локусів *Xgwm102* та *Iw2(T)* (теоретично 6

зелених, 2 блакитних, за точним критерієм Фішера, $P = 0,5$). Серед 11 рослин F_2 , гомозиготних за властивим тій самій формі алелем 268 локусу *Xbarc142*, було 7 зелених та 4 блакитних та зелено-блакитних, що не відрізнялось від теоретично очікуваних величин 8 та 3, відповідно (за точним критерієм Фішера, $P = 0,5$). Серед 11 рослин F_2 , гомозиготних за алелем 144 локусу *Xgwm702*, властивого блакитній формі Авротика 2, було 3 зелених та 8 блакитних і зелено-блакитних рослин проти 8 та 3 теоретично очікуваних, відповідно (за точним критерієм Фішера, $P = 0,043$, різниця статистично достовірна при $p=0,05$). Отже, ген *Iw2(T)* та локус *Xgwm702* не характеризуються незалежним успадкуванням і можуть бути зчепленими у хромосомі 2T.

У геномі пшениці м'якої ідентифіковано два домінантних гени-інгібітори розвитку воскової осуги на всій рослині з якісною експресією, *Iw1* у хромосомі 2B та *Iw2* у хромосомі 2D. [70] Гени, які забезпечують кількісний вплив на цю ознаку, локалізовано і на інших хромосомах м'якої пшениці: 3A [195], 5A, 1A, 1D, 2DL, 4A, 5B, 6A, 7A, 7D. [196,197] Унікальність нашого рослинного матеріалу, на якому виконано дослідження, полягала в тому, що до схрещування залучали генотипи, які розрізнялися лише за алелями гена інтересу через щойно виниклу (епі)мутацію цього гена, причому зміна експресії гена призводить до зміни фенотипу, яка носить якісний, альтернативний характер. З двох генів якісного виразу ознаки ген *Iw1* наявний у геномі Авротиці у рецесивному стані, оскільки тетра-Аврора (AABB) має воскову осугу. [175] Ген *Iw2* відсутній у геномі Авротіки, адже вона не має геном D. Беручи до уваги походження та структуру геному різних форм Авротіки, а також їхні гаплотипи щодо генів ортологічних серій *W* та *Iw*, слід вважати, що розщеплення відбувається за геном, розташованим у геномі T, і ми його позначили *Iw2(T)*, оскільки геном T замістив собою геном D пшениці м'якої. Наявність членів ортологічної серії *Iw* характерна і для інших представників *Triticinae*. Розташування гена *Iw2* на дистальній частині короткого плеча хромосоми 2D було показано для *Ae. tauschii*. [4] Його ортолог було локалізовано на хромосомі 2 алотетраплоїдного виду леймуса (*Leymus wildryes*).

[198] Було доведено інтрогресію гена, гомологічного гену *Iw1* та, можливо, гена *Iw3* від *Ae. speltoides* до геному м'якої пшениці. [199] На житі у хромосомі 7RL локалізовано ген воскової осуги *wa1*, для ячменя було показано наявність ортологічних генів *gs1*, *gs6*, *gs8* на хромосомі 2HS, а для кукурудзи – гена *gl2*. (цит. за [12])

Таким чином, результати виконаного дослідження свідчать, що чинником перманентної зміни генотипного прояву ознаки наявність/відсутність воскової осуги на рослинах геномно-заміщених форм Авротика є мутація домінантного гена ортологічної серії *Iw2* до рецесивного алеля. Частота мутування набагато вище загальноприйнятої оцінки для частоти спонтанного мутагенеза. Залишається нез'ясованим механізм, який спричинює підвищення частоти мутування. У світі сучасних досліджень з питань онтогенетичної нестабільності геномів у якості можливого механізму можна запропонувати до вивчення дію ретротранспозонів [18,93], внутрішньохромосомні перебудови через нелегітимний чи нерівний кросинговер [181,200], а також зміни у експресії гена, в тому числі епігенетичні. [135,183]

Shpylchyn V.V., Antonyuk M.Z., Ternovska T.K. Genetic analysis of artificial Triticinae amphidiploid Aurotica based on the glaucousness trait. Cytology and Genetics. 2014; 48(5): 43-53. (*Особистий внесок здобувача: польова оцінка, гібридизація, ПЛР аналіз, взято участь в аналізі результатів, написання статті*).

Шпильчин В. В., Мартиненко В. С., Терновська Т. К. Генетичний аналіз Авротіки (ААВВТТ) за ознакою наявність воскової осуги. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. 2014;14: 82-86. (*Особистий внесок здобувача: польова оцінка, гібридизація, ПЛР аналіз, написання статті*).

3.4. Дослідження поліморфізму ДНК контрастних морфотипів методами IRAP та REMAP

Результати досліджень, викладені у попередніх підрозділах, дають змогу вважати, що зміна прояву у виразі ознаки наявності/відсутності воскової осуги пов'язана з генетичною зміною (мутацією). Схоже, що у геномах Авротіки та Міози, які мають гібридне походження, відбувається якийсь процес, наслідком чого є зміна домінантного алелю одного з кількох ідентифікованих на сьогодні [18,93] генів, які спричиняють відсутність осуги на рослинах, на рецесивний з частотою, яка набагато перевищує відомі нам середні частоти спонтанного виникнення мутації на ген на покоління. Цей процес може відбуватися у межах так званого «геномного стресу». [201] Одним із факторів такого процесу є активність мобільних генетичних елементів. Показано, що ретротранспозони наявні у більшості рослинних геномах і займають до 90% його розміру. [147] Дослідити їхню роль можливо за допомогою технології, що у якості праймерів для ампліфікації застосовує фрагменти з довгих термінальних повторів ретроелементів. Для нашої роботи ми обрали дві системи: IRAP та REMAP. [163] Метод IRAP (Inter-Retrotransposon Amplification Polymorphism) виявляє поліморфізм, спричинений вставкою мобільного елемента, завдяки ампліфікації фрагменту ДНК між двома сусідніми ретротранспозонами. В даному випадку використовується один або два праймери до одного або двох типів довгих термінальних повторів або SINE-подібних послідовностей ретроелемента. Метод REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplification Polymorphism) є подібним до IRAP з тією різницею, що у ролі одного з праймерів використовується такий, що є специфічним до певного SSR локусу. Зазначені методи дають можливість виявляти зміни у структурі геному штучно створених амфідиплоїдів, мінливих за ознакою інтересу.

3.4.1. Дослідження поліморфізму за ретротранспозонними системами між гексаплоїдами Авротіки та Міози з восковою осугою та без неї. Гексаплоїди Авротіка та Міоза є самозапилювачами, тому мають

характеризуватися гомозиготністю за всіма генетичними системами, що цікаві для вивчення. Блакитні варіанти Авротики та Міози є стабільними, реверсії до зелених аналогів не спостерігали жодного разу, тому цілком можливим є припущення про наявність різниці між різними зразками на генетичному рівні, в тому числі на рівні внутрішньохромосомних змін, які спричинюються рухом ретротранспозонів. Щоб перевірити таке припущення, ми скринували геноми амфідиплоїдів з різним виразом ознаки, використовуючи системи IRAP та REMAP. Гіпотеза була така: якщо варіювання ознаки є наслідком перебудов у хромосомі, які змінюють відстань між ретротранспозонами (або ретротранспозоном та мікросателітом), розташованими біля гена, зміна експресії якого призводить до зміни у прояві ознаки, у електрофоретичному спектрі компонентів буде реєструватися різниця між контрастними фенотипами, і ця пара ретротранспозонів (або ретротранспозон-мікросателіт) може використовуватися для подальшого дослідження генома у зв'язку з варіюванням ознаки. Отже, якщо ампліфікація відбувається і її продукти відрізняються в межах контрастних за ознакою інтересу зразків, це означає, що поряд з геном може знаходитися послідовність – наслідок активності мобільних генетичних елементів і впливати на прояв ознаки.

Для скринування геномної ДНК штучних амфідиплоїдів, контрастних за ознакою воскова осуга було використано багато варіантів сполучення праймерів чотирьох ретротранспозонів з праймерами до різних мікросателітних локусів, проте продукти було отримано лише для трьох з них та одного мікросателіта $(CT)_9G$, широко розповсюдженого у геномі. Зате продукти ампліфікації було отримано для всіх однойменних пар з чотирьох транспозонів та для однієї пари різних транспозонів (табл. 3.11).

З IRAP-праймерами пари *Nikita/Nikita* були отримані поліморфні продукти ампліфікації для контрастних зразків Авротіка 1 зелена та Авротіка 2 блакитна. Спектр Аврори відрізнявся від обох зразків (табл. 3.12). Найбільшу кількість компонентів у спектрі має амфідиплоїд Авротіка 1, зелена, яка має унікальний компонент 2 (близько 1300 п.о), який і відрізняє цей спектр від

спектру Аврори. Авротіка 2, блакитна, має найменшу кількість компонентів і відрізняється від зеленого аналога відсутністю компонентів 2, 8, 9 та наявністю нового компоненту, 10 (850 п.о.), який не представлений ані у Аврори ані у Авротіки 1. Спектри геномно-доданих форм Міоза є ідентичними (рис. 3.9).

Таблиця 3.11

Варіанти комбінування праймерів у системах IRAP (1–5) і REMAP (6–8) та продукти ампліфікації

Комбінація праймера	T _(a)	Максимальна кількість розділених продуктів	Розмір продуктів
1. <i>Nikita/Nikita</i>	60	9	340-2840
2. <i>REMAPGAn/REMAPGAn</i>	58	4	380-1500
3. <i>Sukkula/Sukkula</i>	55	20	600-4500
4. <i>Sabrina/Sabrina</i>	60	5	1200-2480
5. <i>Nikita/Sukkula</i>	60	6	360-1700
6. <i>Nikita/(CT)9G</i>	60	9	300-1160
7. <i>Sukkula/(CT)9G</i>	53	9	260-800
8. <i>Sabrina/(CT)9G</i>	61	12	780-2480

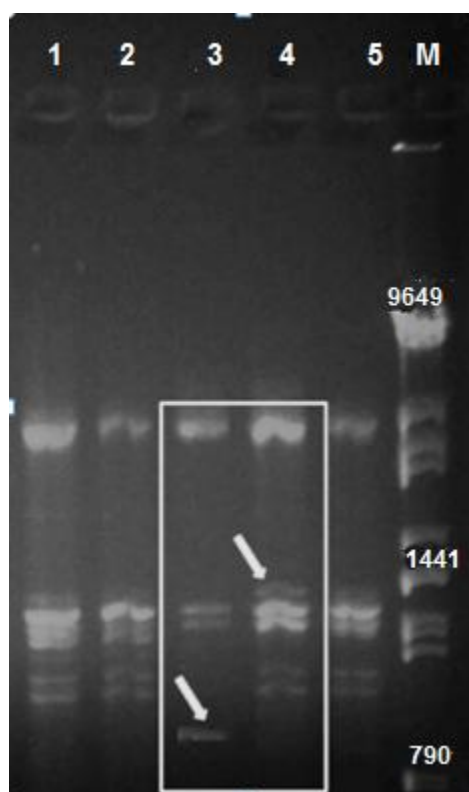


Рис. 3.9. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації з IRAP-праймерами *Nikita/Nikita*. М – маркер мас, 1 – Міоза блакитна, 2 – Міоза зелена, 3 – Авротіка 2 блакитна, 4 – Авротіка 1 зелена, 5 – Аврора.

Ампліфікація з праймерами до пари *Sukkula/Sukkula* продукувала спектри компонентів, які значно розрізняються для ДНК Аврори та геномно-заміщених амфідиплоїдів. У спектрі Авротіки 2 блакитної відсутні десять компонентів, які є характерними для зеленої Авротики 1 та Аврори. Авротіка 1, в свою чергу, відрізняється від Аврори наявністю компонентів 1, 2, 3 та відсутністю компонента 17. Спектр компонентів ДНК Міози зеленої відрізняється від такого Міози блакитної відсутністю компонентів 14, 15, 16 та наявністю компонента 10. При застосування праймерів до LTR ретротранспозонів *Sabrina/Sabrina* спектри компонентів контрастних форм Міози є однаковими. З даними праймерами найбільшу кількість компонентів продукує геном Аврори. Спектр Авротіки 1 зеленої, відрізняється від спектра Аврори наявністю

компонента 3, та відсутністю компонента 5. ДНК Авротіки 2 блакитної взагалі не давала продуктів з даною парою праймерів (табл. 3.12).

Спектри компонентів, отримані з парою праймерів REMAP *Sabrina/(CT)9G*, для ДНК контрастних зразків Міози не відрізнялися, хоча і продукували по 11 компонентів. Спектри ДНК Авротіки зеленої та блакитної також один від одного не відрізнялися, хоча дуже відрізняються від спектру компонентів ДНК Аврори скороченням кількості компонентів: у Аврори 11, у обох Авротік по чотири. Ампліфікація з праймерами пари *REMAPGAn/REMAPCAn* продукували лише чотири компоненти, за якими поліморфізму між вивченими зразками встановлено не було.

Таблиця 3.12

Продукти ампліфікації геномної ДНК рослинних зразків з IRAP та REMAP праймерами

Рослинний матеріал	Продукти ампліфікації, наявні у спектрі зразка			
	<i>Nikita/Nikita</i>	<i>Sukkula/Sukkula</i>	<i>Sabrina/Sabrina</i>	<i>Sabrina/(CT)9G</i>
Аврора	1,3,4,8,9	2,4,5,6,7,8,9,11,1 2,13,14,16,17,18	1,2,4,5	1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10, 12
Авротіка 1, зелена	1,2,3,4,8,9	1,2,3,4,5,6,7,8,9,1 1,12,13,14,16,18	1,2,3	2,8,9,10
Авротіка 2, блакитна	1,3,4,10	1,2,4,7,8,11,12	продуктів не було	2,8,9,10
Міоза зелена	1,5,6,7,8,9	2,4,5,6,7,8,9,10,1 1,12,13,17,18,19, 20	1,3,5	2,3,4,5,6,7,8,9,1 0,11,12
Міоза блакитна	1,5,6,7,8,9	2,4,5,6,7,8,9,11,1 2,13,14,15,16,17, 18,19,20	1,3,5	2,3,4,5,6,7,8,9,1 0,11,12

Ампліфікація ДНК геномно-заміщених та геномно-доданих амфідиплоїдів пшениці, контрастних за ознакою наявності/відсутності воскової осуги, з праймерами систем IRAP та REMAP продукувала спектри компонентів, які були поліморфними для різних зразків та пар праймерів. На даному рослинному матеріалі та єдина пара праймерів системи REMAP, яка дала продукти ампліфікації, *Sabrina/(CT)9G*, виявилася неефективною для розрізнення ДНК зразків амфідиплоїдів з контрастними генотипами. Неефективними були пари праймерів *Nikita/Nikita*, *Sabrinai/Sabrina* для контрастних зразків Міози та пара *REMAPCAn/REMAPGAn* для всіх вивчених зразків. Поліморфізм за компонентами спектру було виявлено для пар *Nikita/Nikita*, *Sukkula/Sukkula*, *Sabrina/Sabrina* при ампліфікації ДНК контрастних рослин Авротіки. У всіх випадках спектр Авротіки 1, зеленої, відрізнялася від спектру Аврори новим компонентом, а спектр Авротіки 2, блакитної, відрізнявся від спектру зеленого аналога втратою компонентів спектру. Пара *Sukkula/Sukkula* давала поліморфні продукти з ДНК контрастних морфотипів Міози. Можна припустити, що зміна домінантного алеля критичного гена на рецесивний може спричинюватися внутрішньохромосомними локальними перебудовами, пов'язана з рухом ретротранспозонів, чия активність провокується нестабільним станом генома, характерним для амфідиплоїдів. [89]

3.4.2. Дослідження поліморфізму ампліконів, отриманих методом REMAP, з використанням SSR-локусів, локалізованих поряд з генами *lw2*. Рослинні зразки, обрані для дослідження, характеризуються розбіжністю щодо двох ознак: формування шару воскової осуги на рослинах, що досягли певної онтогенетичної стадії розвитку (Авротіка 2 та деякі лінії F₄) чи відсутність такого шару (Авротіка 1 та деякі лінії F₄) та алелі мікросателітних локусів *Xgwm702*, *Xgwm102*, *Xbarc124*, специфічних для хромосоми 2D пшениці. [70] Цими зразками були зелена Авротіка 1, блакитна Авротіка 2 та контрастні лінії F₄, отримані від їхнього схрещування. Для аналізу було підібрано низку комбінацій REMAP праймерів. Комбінації склалися з пари: праймер до

мікросателітної послідовності та праймер до довгих термінальних повторів (LTR) або SINE-подібних послідовностей ретротранспозонів. Серед трьох використаних мікросателітних локусів *Xgwm702*, за нашими даними, успадковується зчеплено з геном *Iw2(T)* (ген інтересу), *Xgwm102* розташовується поблизу гена інтересу, але у наших популяціях успадковується незалежно від нього [202], *Xbarc124*, за літературними даними [4], є зчепленим з геном *Iw2(D)*, який розташований на пшеничній хромосомі 2D. [70] Використовуючи саме ці SSR-локуси, ми прив'язуємо потенціальний рух досліджуваних транспозонів до гену інтересу. З пари праймерів, фланкуючих мікросателіт, у всіх випадках було обрано лівий, *Xgwm702 Forward*, *Xbarc124 Forward* та *Xgwm102 Forward*, оскільки саме в цьому випадку забезпечується добра ампліфікація в парі з відповідними праймерами до послідовностей ретротранспозонів *Sukkulla*, *Nikita*, *Sabrina*, *REMAPCAn*, *REMAPGAn*, *IVit124* та *LTR6150*. Було перевірено 21 пару REMAP праймерів. Їхні 15 комбінацій, що давали продукт ампліфікації, та результати ампліфікації щодо кількості та розмірів продуктів у спектрах наведені в таблиці 3.13.

Інформативним є порівняння спектрів ампліконів, отриманих з REMAP-праймерами в даному дослідженні (рис. 3.10) та наведених у попередньому пункті табл. 3.12). Тоді застосовували IRAP технологію, коли ампліфікація відбувалася лише між послідовностями до довгих термінальних повторів або SINE-подібних послідовностей ретротранспозонів, та REMAP-технологію, проте мікросателітні локуси не були прив'язані до гена інтересу. Тоді кількість компонентів спектру була настільки велика, що це ускладнювало процес ідентифікації окремих ампліконів та зменшувало у цілому роздільну здатність задіяних технологій для пошуку відмінностей за спектрами між морфологічно контрастними формами. При застосуванні для REMAP специфічних мікросателітних локусів, що не передбачено в оригінальній методиці [163], кількість розділених компонентів продуктів ампліфікації зменшилося значною мірою. Це можна пояснити більшою специфічністю такої REMAP системи,

порівняно з IRAP, саме за рахунок наявності одного праймера, специфічного до конкретних міросателітних послідовностей.

Спектри, отримані за участю різних REMAP-праймерів, були переважно мономорфними. Єдиним виключенням стала пара праймерів *Xgwm702F/REMAPCAn*, що її застосування для ампліфікації ДНК давало зайвий компонент спектру на ДНК ліній з воскової осугою у порівнянні зі спектром ДНК з рослин, позбавлених воскового шару (рис. 3.10).

Таблиця 3.13

Комбінації REMAP праймерів і продукти ампліфікації

Комбінація праймера	T(a)	Максимальна кількість продуктів ампліфікації	Розмір продуктів
<i>Xbarc124F/Sukkula</i>	56	16	600-4500
<i>Xbarc124F/Nikita</i>	56	9	300-1200
<i>Xbarc124F/REMAPGAn</i>	56	6	380-1500
<i>Xbarc124F/Sabrina</i>	56	8	1200-2480
<i>Xbarc124F/REMAPCAn</i>	56	6	360-1700
<i>Xbarc124F/LTR6150</i>	56	4-6	350-2000
<i>Xgwm102F/Sukkula</i>	56	10	300-1160
<i>Xgwm102F/Nikita</i>	56	5-6	260-800
<i>Xgwm102F/Sabrina</i>	56	7	780-2480
<i>Xgwm102F/REMAPCAn</i>	56	9-11	650-1800
<i>Xgwm702F/Sukkula</i>	56	10	600-2200
<i>Xgwm702F/Nikita</i>	56	5	650-3500
<i>Xgwm702F/Subrina</i>	56	4	1200-1500
<i>Xgwm702F/LTR6150</i>	56	6	750-1700

<i>Xgwm702F/REMAPCAn</i>	56	6-7	400-2000
--------------------------	----	-----	----------

Зареєстровано зменшення компонентів спектру у Аврори, Авротики 1 та Авротики 2 (батьківські форми) у порівнянні зі спектрами, отриманими на ДНК гібридних ліній. В той же час, деякі компоненти, що були у наявності у спектрах батьківських форм, в спектрах ДНК від гібридів були відсутні. Цю особливість можна розглядати як приклад неадитивності елементів прояву геномної структури, коли аналізу піддаються геноми гібридного походження, на що неодноразова вказували дослідники при використанні різних молекулярних маркерних систем та різних гібридних геномів. [93,107] В нашому випадку геном сорту Аврора порівнюється з амфідиплоїдами Авротіка з контрастним виразом ознаки інтересу та з гібридами F₄ від схрещування цих амфідиплоїдів. Відмінність в кількості компонентів батьківських форм та їхніх похідних можна пояснити більшою кількістю внутрішньогеномних перебудов, що могли відбутися у нащадків внаслідок активності мобільних генетичних елементів.

З деякими праймерами, а саме з *Xbarc124F/LTR6150*, *Xgwm102F/Nikita* та *Xgwm102F/REMAPCAn* окремі одиничні зразки мали відмінну кількість компонентів у спектрах, порівняно з іншими зразками. Так, зразок 6, що ампліфікувався з *Xbarc124F/LTR6150*, мав 4 компонента замість 6; зразок 11, що ампліфікувався з *Xgwm102F/Nikita*, мав додатковий важкий компонент, зразок 14 мав два додаткових компоненти, порівняно з рештою зразків. Оскільки з іншими праймерами дані зразки не проявляють відмінностей у спектрах продуктів ампліфікації, можна припустити, що такі відмінності мають випадковий характер і пов'язані з особливостями будови окремих геномів.

Серед 15 пар REMAP праймерів, що ампліфікувалися з зі зразками ДНК, лише з комбінацією *Xgwm702F/REMAPCAn* ми отримали відмінні спектри серед ДНК рослин, що розщеплюються за ознакою інтересу. Як продемонстровано на рисунку 3.10, у спектрах продуктів ампліфікації зразків 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, а також 20, 21, 22, 23, які є нащадками рослин F₃, що мають

блакитний фенотип (наявність воскової осуги), у наявності чіткий компонент розміром приблизно 2000 п.н. Даний компонент відсутній у спектрах зразків без воскової осуги. З іншими комбінаціями праймерів до мікросателітних локусів - *Xbarc124F* та *Xgwm102F*, RemapCAn поліморфних продуктів не з'явилося. Локус *Xgwm702* є зчепленим з геном *Iw2(T)*, тому можна припустити, що ампліфікація поліморфних продуктів в комбінації з праймером до довгих термінальних повторів ретротранспозонів RemapCAn прямо вказує на наявність перебудов, пов'язаних з активністю транспозонів поблизу даного гена, що, в свою чергу, може бути причиною втрати домінантного стану гена *Iw2(T)*, зміни експресії гена та появи блакитного фенотипу.

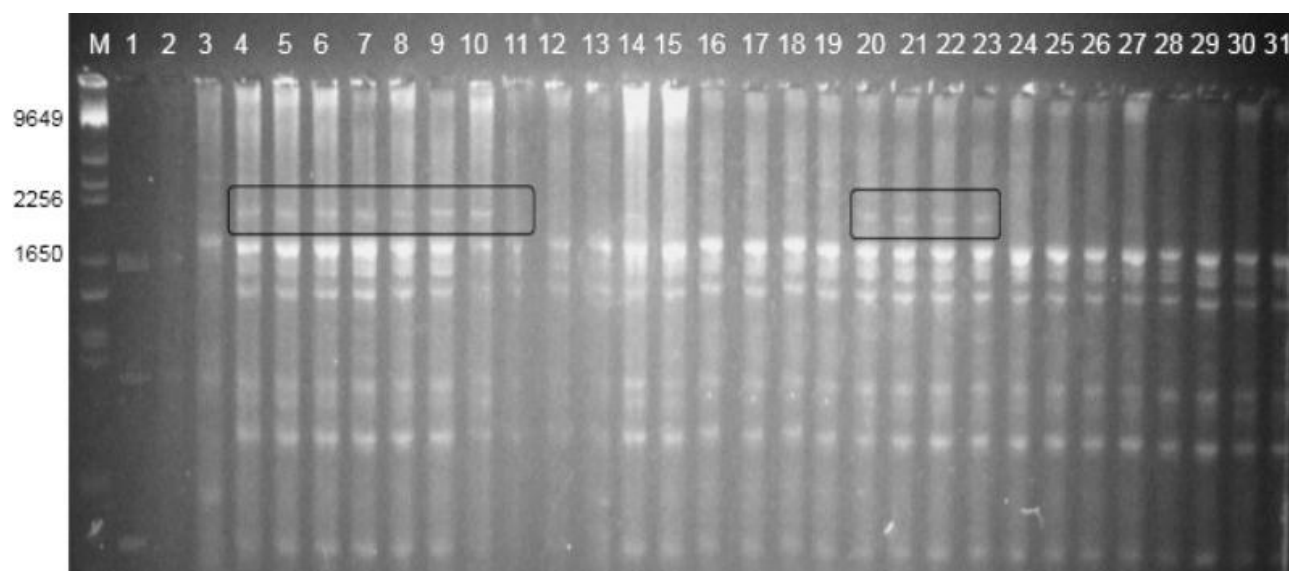


Рис. 3.10. Поліморфні спектри продуктів ампліфікації з REMAP праймером *Xgwm702F/REMAPCAn*. М – маркер мас, 1 – Авротіка 2 блакитна; 2 – Авротіка 1 зелена; 3 – Аврора; 4, 5, 6, 7 – F₄ (блакитні); 8, 9, 10, 11, – F₄ (блакитні); 12, 13, 14, 15 – F₄ (зелені); 16, 17, 18, 19 – F₄ (зелені); 20, 21, 22, 23 – F₄ (блакитні); 24, 25, 26, 27 – F₄ (зелені); 28, 29, 30, 31 – F₄ (зелені).

Враховуючи отримані результати та зважаючи на численні дослідження поведінки транспозонів у геномах [20–24,97,101,144,145,148–150,154,156,157], можна припустити, що однією з причин зміни прояву ознаки

наявність/відсутність воскової осуги у штучних амфідиплоїдах є геномні перебудови, викликані активністю мобільних генетичних елементів. На це вказує наявність поліморфних продуктів у електрофоретичних спектрах в результаті ампліфікації з праймером REMAP *Xgwm702F/REMAPCA_n* ДНК рослин, контрастних за ознакою інтересу. Наявність в складі REMAP системи лівого праймеру до мікросателітного локусу *Xgwm702F* дає можливість припустити, що генетичні перебудови відбулися саме поблизу гена *Iw2(T)*, в результаті чого в послідовних генераціях ми спостерігаємо зміну його експресії, що виявляється як втрата інгібуючої функції гена та поява рослин, поверхня листків і колосу яких вкрита восковою осугою.

Шпильчин В.В., Терновська Т.К. Застосування технології IRAP та REMAP для пошуку поліморфізму серед амфідиплоїдів, нестабільних за ознакою воскова осуга. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. 2013; 12: 181-185. *(Особистий внесок здобувача: підбір праймерів, ПЛР аналіз, обговорення результатів, участь в написання статті).*

Шпильчин В.В., Михайлик С.Ю., Терновська Т.К. Активність транспозона як чинник втрати функції гена *Iw2 (T)* у нащадків штучних амфідиплоїдів *Triticinae*. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016;19: 51-54. *(Особистий внесок здобувача: ПЛР аналіз, взято участь в обговоренні і аналізі результатів, написання статті).*

Шпильчин В.В., Терновська Т.К. Мобільні генетичні елементи рослин. Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. 2010;8(1):154-164. *(Особистий внесок здобувача: пошук, аналіз літературних джерел, взято участь в написання статті).*

РОЗДІЛ 4

УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

У ході дисертаційного дослідження було встановлено модель успадкування ознаки воскова осуга серед інтрогресивних ліній, створених за участю геномно-заміщених амфідиплоїдів Авролата, Авродес, Аврозис та Авротіка. Особливістю даних рослин є те, що серед більшості ліній, які не мають воскової осуги (зелені) з моменту їхнього створення перманентно відбувається вищеплення рослин з восковою осугою (блакитних) геть до втрати носіїв зеленої градації. Спочатку, виходячи з даних про генетичний контроль ознаки інтересу, очікували, що при схрещуванні рослин з восковою осугою (гомозиготи за алелями $iw1$ та $iw2$) з рослинами без воскової осуги (хоча б одна пара домінантних алелів за $w1$ та $w2$) рослини F_1 не матимуть осуги, а у популяції F_2 буде спостерігатися менделівське моногенне та дигенне розщеплення. Проте результати схрещувань цього не демонстрували. Результати оцінки в F_1 від схрещування контрастних за ознакою ліній між собою та з генотипом Аврора давали неочікувані результати. Переважно всі рослини F_1 були або блакитними, або рослинами з зеленим колосом та блакитним стеблом. Домінантна ознака (зелена) не виявлялася у гібридах першого покоління всупереч очікуваному. Було зроблено припущення, що зелені рослини, є, по-перше, гетерозиготами та, по-друге, продукують гамети, в яких домінантний алель якимось чином змінився на рецесивний. Саме тому серед нащадків від схрещування ліній з контрастними фенотипами з'являються переважно F_1 з рецесивною ознакою. Якщо F_1 має домінантну ознаку, проміж рослин F_2 або зовсім немає розщеплення, або розщеплення є, але у порівнянні з очікуваним 3 домінантних : 1 рецесивна воно спотворено у бік зростання кількості рослин з рецесивним фенотипом.

Для перевірки, чи насправді у ліній, що досліджуються, відбувається зміна експресії гена *Iw2*, був проведений мікросателітний аналіз, за допомогою якого були ідентифіковані продукти ампліфікації для трьох локусів (*Xcfd51*, *Xcfd56* та *Xbarc159*) та зроблений висновок, що ген інтересу дійсно розташований на хромосомах групи 2. В той же час спектри ліній з третім фенотипом (листя та стебла з восковою осугою, колос зелений) не виявили подібності до спектрів Аврори чи Авродеса, оскільки у контролі такого фенотипу бере участь ген *Iw3* (1B). Було висунуто припущення, що спотворення результатів розщеплення (збільшення кількості рослин з рецесивною ознакою) спричиняється нестабільністю алеля гена *Iw2*, який має інтрогресивне походження.

Був проведений аналіз геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка та геномно-доданих амфідиплоїдів Міоза та МІТ, в яких також незрозумілим чином відбувалася зміна стану гена-інгібітора воскової осуги з домінантного до рецесивного та втрачалася інгібіторна дія цього гена. Порівняння електрофоретичних спектрів контрастних за ознакою інтересу морфотипів Авротіки та Міози за деякими білками різниці не виявило, окрім гліадинових спектрів для зеленої та блакитної Авротіки 2. Була наявна різниця в компонентах ω -зоні. Відомо, що компоненти цієї зони контролюються генами, розташованими у хромосомах 1-ої гомологічної групи.

Результати гібридологічного аналізу контрастних морфотипів Авротіки та Міози, як і в випадку з інтрогресивними лініями не додали розуміння, що відбувається з ознакою інтересу: F_1 для деяких комбінацій були очікуваного фенотипу, але у F_2 також спостерігали надлишок рецесивних фенотипів.

Застосування праймерів SSR локусів, специфічних до хромосоми 2D, у всіх випадках дало продукти ампліфікації, хоча геном D не входить складу жодного амфідиплоїда. Серед семи SSR-локусів хромосоми 2D *Xbarc124-2DS* (знаходиться на короткому плечі хромосоми 2D на відстані 0,9 cM від гена *Iw2*) дав різні продукти ампліфікації при аналізі зеленої та блакитної форм Міози, тому припускається, що причиною цього є зміна у хромосомі 2M, яка заचाпає

ген ортологічної серії *Iw2*. Загалом поліморфний продукт спостерігався від ампліфікації праймерів до трьох локусів, розташованих на 2В (*Xcfd238-2BS*, *Xbarc318-2BS*, *Xwmc361-2BL*) з ДНК Міози з восковою осугою у порівнянні зі спектрами Міози без воскової осуги. Спектри Авротіки у всіх випадках були мономорфними.

Для проведення генетичного аналізу амфідиплоїда Авротіка були запропоновані наступні гаплотипи: Авротіка 1 (зелено-блакитна) - *iw3(1B) W1(2B) iw1(2B) iw2(2T) Iw3(1T)*, Авротіка 1 (зелена) - *iw3(1B) W1(2B) iw1(2B) Iw2(2T) Iw3(1T)*, Авротіка 2 (блакитна) - *iw3(1B) W1(2B) iw1(2B) iw2(2T) iw3(1T)*, Авротіка 2 (зелено-блакитна) - *iw3(1B) W1(2B) iw1(2B) iw2(2T) Iw3(1T)*, Авротіка 2 (зелена) - *iw3(1B) W1(2B) iw1(2B) iw2(2T) iw3(1T)*.

Результати гібридологічного аналізу показали, що зелено-блакитний фенотип, гіпостатичний до дії гена *Iw2(T)*, має утворюватися шляхом самозапилення моногетерозигот *W1W1 Iw2(T)iw2(T) Iw3(T)Iw3(T)* чи дигетерозигот *W1W1 Iw2(T)iw2(T) Iw3(T)iw3(T)*. Такий фенотип характеризується генотипом *W1W1 iw2(T)iw2(T) Iw3(T)*. Це значить, що для появи зелено-блакитних рослин достатньо одної мутації (*Iw2(T)→iw2(T)*) з наступним самозапиленням. У популяції зеленої Авротіки 2 можуть з'являтися Авротіка 2 (блакитна) в результаті самозапилення дигетерозиготної зеленої рослини Авротіка 2. Рослини з блакитним фенотипом можуть з'являтися і серед нащадків гетерозиготних зелено-блакитних рослин з генотипом *W1W1 iw2(T)iw Iw3(T)iw3(T)*. Отже, різниця між контрастними за ознакою інтересу формами Авротіки забезпечується одним геном для Авротіки 1 (зелена) та Авротіки 1 (зелено-блакитна), одним геном для Авротіки 2 (зелена) та Авротіки 2 (зелено-блакитна), одним геном для Авротіки (зелено-блакитна) та Авротіки (блакитна) та двома генами для Авротіка (зелена) та Авротіка (блакитна). У всіх комбінаціях схрещування у F₂ кількості рослин з восковою осугою завжди були більше теоретично очікуваних величин, що можна вважати наслідком певної молекулярної події, яка позбавляє ефективності домінантні алелі ортологічної серії *Iw*, тобто викликає зміну експресії гена.

Був проведений мікросателітний аналіз популяції [Авротіка 1(зелена) х Авротіка 2(блакитна)]F₂, яка розщеплюється за генами *Iw2(2T)* та *Iw3(1T)*. Із 9 перевірених локусів, специфічних для хромосоми 2В, продукт був отриманий з 8, а поліморфними для контрастних батьківських форм виявилися локуси *Xgwm429* та *Xbarc167*. Із 18 локусів, специфічних до хромосоми 2D(T) поліморфними виявилися три локуси, *Xbarc142*, *Xgwm102* та *Xgwm702*. Було показано, що ген *Iw2(T)* та локус *Xgwm702* не характеризуються незалежним успадкуванням і можуть бути зчепленими у хромосомі 2Т. Результати гібридологічного та мікросателітного аналізу свідчать, що причиною зміни прояву ознаки інтересу у амфідиплоїдів Авротіка є мутація домінантного гена *Iw2* до рецесивного алеля.

Було зроблено припущення, що такий феномен, зміна експресії гена внаслідок (епі)мутації, відбувається через геномний стресу, одним з чинників якого може виступати активність мобільних генетичних елементів. Для дослідження цієї гіпотези була застосована технологія IRAP та REMAP з використанням різних комбінацій праймерів до довгих термінальних повторів ретротранспозонів та мікросателітних локусів для скринування ДНК штучних амфідиплоїдів Авротіка та Міоза, контрастних за ознакою воскова осуга. Поліморфними за компонентами спектрів ампліфікації ДНК виявилися зразки блакитних та зелених рослин Авротіки з парами IRAP праймерів - Nikita/Nikita, Sukkula/Sukkula та Sabrinai/Sabrina: спектр Авротіки 1 (зелена) відрізнявся від спектру Аврори наявністю нового компонента, а спектр Авротіки 2 (блакитна) відрізнявся від спектру контрастної форми втратою деяких компонентів спектру. При застосуванні пари Sukkula/Sukkula виявлялися поліморфні продукти з ДНК Міоза (зелена) та Міоза (блакитна). Це дає можливість припустити, що зміна домінантного алеля гена інтересу на рецесивний може спричинятися внутрішньохромосомними локальними перебудовами гібридного геному, пов'язаними з активністю ретротранспозонів.

З метою виявлення наявних перебудов, спричинених мобільними генетичними елементами у контрастних за ознакою воскова осуга рослин

(Авротіка 1, Авротіка 2 та ліній F₄) був застосований модифікований метод REMAP з використанням мікросателітних локусів, які за нашими даними успадковуються зчеплено з геном інтересу (*Xgwm702 Forward*) або розташовані поблизу гена *Iw2(T)* (*Xbarc124 Forward* та *Xgwm102 Forward*) в якості одного з праймерів та послідовностей до довгих термінальних повторів ретротранспозонів в якості іншого. Серед перевіреної 21 комбінації праймерів, 15 ампліфікувалися з ДНК рослин інтересу. Було показано розбіжності у кількості компонентів спектру у батьківських форм Аврори, Авротики 1 та Авротіки 2 (менше компонентів), порівняно зі спектрами гібридних ліній, що можна пояснити більшою кількістю внутрішньогеномних перебудов, які могли відбутися у нащадків внаслідок активності транспозонів. Також застосування специфічних мікросателітних локусів для методу RAMAP сприяло зменшенню кількості розділених компонентів ампліфікації. Спектри, отримані за участю різних RAMAP-праймерів, були переважно мономорфними, окрім пари *Xgwm702F/REMAPCAp*, яка ампліфікувала додатковий компонент спектру з ДНК гібридних ліній Авротіки з воскової осугою у порівнянні зі спектром продуктів ампліфікації рослин без воскового шару. Оскільки за нашими даними локус *Xgwm702* є зчепленим з геном *Iw2(T)*, можна припустити, що ампліфікація поліморфних продуктів, яка є результатом застосування даної комбінації праймерів, вказує на наявність перебудов, пов'язаних з активністю транспозонів поблизу даного гена. Це може бути причиною втрати домінантного стану гена *Iw2(T)* і причиною появи у рослин фенотипу, який характеризується наявністю воскової осуги.

ВИСНОВКИ

Вивчення нестабільності геномів гібридного походження складає наразі найактуальнішу галузь досліджень з генетики рослин хоча б через те, що від правильного розуміння процесів, які відбуваються у гібридних геномах, та результатів їхнього завершення залежать прогнози щодо можливостей інтрогресивної гібридизації, яка має величезне практичне значення. Чинне дослідження є внеском в розрішення згаданої проблеми, тому що в ньому запропоновано та апробовано зручну модель вивчення внутрішньогеномної зміни у гібридному геномі, яка назовні виявляється як зміна прояву ознаки наявності/відсутності воскової осуги на пшеничних рослинах.

1. Рослини зі зміною фенотипу за восковою осугою з домінантного (осуга відсутня) на рецесивну (осуга наявна) з'являються перманентно серед гомозиготних (за походженням) генотипів геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка, геномно-доданих амфідиплоїдів Міоза, МІТ^D, а також інтрогресивних ліній-похідних геномно-заміщених амфідиплоїдів Авродес, Аврозис, Авролата, з частотою, що на кілька порядків перевищує середню частоту спонтанного мутування на ген на покоління.

2. За даними мікросателітного аналізу геномів інтрогресивних ліній, нестабільних за ознакою інтересу, виконаного з використанням локусів, специфічних до хромосом 2В та 2D пшениці м'якої, розщеплення відбувається за геном, розташованим на хромосомі 2D, яким є ген ортологічної серії *Iw2*.

3. За результатами генетичного аналізу контрастних морфотипів Авротіки, поява рослин з осугою серед рослин без осуги пов'язана з мутаціями у двох генах-інгібіторах воскової осуги з домінантного до рецесивного стану: *Iw3* → *iw3* (хромосома 1-ої гомеологічної групи) та *Iw2* → *iw2* (хромосома 2-ої гомеологічної групи). Джерелом домінантних алелів генів-інгібіторів у Авротіки є геном Т виду *Ae. mutica*.

4. Різниця у кількості морфотипів за ознакою інтересу у амфідиплоїдів Міоза (два) та Авротіка (три) вказує на те, що види егілопсів *Ae. mutica* та

Ae. comosa мають у складі своїх хромосом 2-ої гомеологічної групи домінантні алелі ортологічної серії *Iw2*, а домінантний алель другого епістатичного інгібітора серії *Iw3* має лише вид *Ae. mutica*.

5. З геном-інгібітором воскової осуги *Iw2(T)*, ідентифікованому в хромосомі 2T *Ae. mutica*, зчеплений мікросателітний локус *Xgwm702*, специфічний для хромосоми 2D пшениці м'якої.

6. Встановлене у гібридологічному аналізі відхилення успадкування рецесивної ознаки наявності воскової осуги у F_2 від менделівського типу, заснованому на розкритті біному (3 домінантних : 1 рецесивний)ⁿ, у бік постійного та безваріантного збільшення обсягу рецесивного фенотипного класу може бути наслідком мутацій домінантних алелів-інгібіторів до рецесивних. Надмірно висока частота таких мутацій спричинена гібридною природою геномів усіх досліджених рослин.

7. У геномах амфідиплоїдів Авротіка та Міюза зареєстровано рух транспозонів, який на рівні молекулярного фенотипу виявляється як поліморфізм за рухливістю компонентів спектрів, що утворюються при ампліфікації з праймерами або лише до ретротранспозонних послідовностей (IRAP) або коли один з праймерів є частиною мікросателітного повтору (REMAP).

8. Використання послідовності фланкуючої ділянки SSR-локусу замість самого послідовності повтору принципово змінює роздільну здатність метода REMAP, надаючи наявному поліморфізму у спектрах хромосомної специфічності.

9. Використання модифікованого методу REMAP, спрямованого на виявлення хромосомно-специфічного поліморфізму у електрофоретичних спектрах, викликаного рухом ретротранспозонів, виявило асоціацію поліморфізму з хромосомною ділянкою, де розташований SSR-локус *Xgwm702*, зчеплений у геномі Авротіки з локусом *Iw2(T)*. Це доводить, що мутування *Iw2* $\rightarrow$ *iw2*, яке є причиною перманентної зміни ознаки з домінантної на рецесивну, дійсно відбувається як наслідок руху ретротранспозонів в геномі.

ЛІТЕРАТУРНІ ДЖЕРЕЛА

1. Simmonds JR, Fish LJ, Leverington-Waite M a., Wang Y, Howell P, Snape JW. Mapping of a gene (Vir) for a non-glaucous, viridescent phenotype in bread wheat derived from *Triticum dicoccoides*, and its association with yield variation. *Euphytica*. 2007 Aug 4;159(3):333–41.
2. Monneveux P, Reynolds MP, Gonzalez-Santoyo H, Pena RJ, Mayr L, Zapata F. Relationships between Grain Yield, Flag Leaf Morphology, Carbon Isotope Discrimination and Ash Content in Irrigated Wheat. *J Agron Crop Sci*. 2004 Dec;190(6):395–401.
3. Johnson D a., Richards R a., Turner NC. Yield, Water Relations, Gas Exchange, and Surface Reflectances of Near-Isogenic Wheat Lines Differing in Glaucousness1. *Crop Sci*. 1983;23(2):318.
4. Watanabe N, Takesada N, Shibata Y, Ban T. Genetic mapping of the genes for glaucous leaf and tough rachis in *Aegilops tauschii*, the D-genome progenitor of wheat. *Euphytica*. 2005 Jul;144(1-2):119–23.
5. Kunst L, Samuels L. Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. *Curr Opin Plant Biol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2013 Nov 11];12(6):721–7.
6. McIntosh RA, Devos KM, Dubcovsky J, Rogers WJ, Morris CF, Appels R, et al. CATALOGUE OF GENE SYMBOLS FOR WHEAT. *Cat GENE Symb WHEAT* 2008 Suppl. 2008;
7. Терновская Т.К. Перестройка генома мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) для ее генетического анализа и интрогрессии генов. Дис. на соискание ученой степени доктора биологических наук: 03.00.15, Киев. 1999.
8. Жиров ЕГ, Терновская ТК. Геномная инженерия у пшеницы. *Вестник с-х науки*. 1984;(10):58–66.
9. Жиров Е.Г. Геномы пшеницы: исследование и перестройка. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук: 03.00.15 – Краснодар. 1989.

10. 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. 2001;2:368–75.
11. Єфіменко ТС, Антонюк МЗ, Мартиненко ВС, Наваліхіна АГ, Терновська ТК. Залучення інтрогресій від *Aegilops mutica* до геному м'якої пшениці. Цитология и генетика. 2018;52(1).
12. Терновская ТК. Геном D мягкой пшеницы. Наследование некоторых признаков морфологии колоса. Цитология и генетика. 1997;31(4):11–8.
13. Johnson DA, Richards RA, Turner NC. Yield, Water Relations, Gas Exchange, and Surface Reflectances of Near-Isogenic Wheat Lines Differing in Glaucousness1. Crop Sci. Crop Science Society of America; 1983;23(2):318.
14. Richards RA, Rawson HM, Johnson DA. Glaucousness in wheat: its development and effect on water-use efficiency, gas exchange and photosynthetic tissue temperature. Aust J Plant Physiol. 1986;13(4) p.
15. Kashkush K, Feldman M, Levy AA. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. Genetics. 2002;160(4):1651–9.
16. 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(2):263–72.
17. Lewsey MG, Hardcastle TJ, Melnyk CW, Molnar A, Valli A, Urich MA, et al. Mobile small RNAs regulate genome-wide DNA methylation. Proc Natl Acad Sci. 2016;113(6):E801–10.
18. Fu S, Sun C, Yang M, Fei Y, Tan F, Yan B, et al. Genetic and epigenetic variations induced by wheat-rye 2R and 5R monosomic addition lines. PLoS One. 2013 Jan;8(1):e54057.
19. Yu M, Guan LL, Chen GY, Pu ZE, Hou D Bin. Allopolyploidy-induced rapid genomic changes in newly generated synthetic hexaploid wheat. Biotechnol Biotechnol Equip. 2017;31(2):236–42.
20. McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge. Science (80-). 1984;16(226):792–801.

21. Bennetzen JL. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Mol Biol.* 2000 Jan;42(1):251–69.
22. Tomita M, Shinohara K, Morimoto M. Revolver is a new class of transposon-like gene composing the triticeae genome. *DNA Res.* 2008;15(1):49–62.
23. Parisod C, Salmon A, Zerjal T, Tenailon M, Grandbastien M-A, Ainouche M. Rapid structural and epigenetic reorganization near transposable elements in hybrid and allopolyploid genomes in *Spartina*. *New Phytol.* 2009 Dec;184(4):1003–15.
24. Zhang P, Li W, Fellers J, Friebe B, Gill BS. BAC-FISH in wheat identifies chromosome landmarks consisting of different types of transposable elements. *Chromosoma.* 2004 Mar;112(6):288–99.
25. Fedoroff N. Transposons and genome evolution in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 20;97(13):7002–7.
26. von Wettstein-Knowles P. *Plant waxes.* eLS John Wiley Sons Ltd, Chichester. 2012;3:1–11.
27. Zhang Z, Wang W, Li W. Genetic interactions underlying the biosynthesis and inhibition of β -diketones in wheat and their impact on glaucousness and cuticle permeability. Zhang T, editor. *PLoS One.* Public Library of Science; 2013 Jan;8(1):e54129.
28. Martin J, Juniper B. *The cuticles of plants.* Edward Arnold; 1970. 347 p.
29. Kunst L, Samuels AL. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog Lipid Res.* 2003;42(1):51–80.
30. Post-Beittenmiller D. Biochemistry and Molecular Biology of Wax Production in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1996 Jun;47:405–30.
31. Barthlott W, Neinhuis C. Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta.* 1997;202(1):1–8.
32. Wang J, Li W, Wang W. Fine mapping and metabolic and physiological characterization of the glume glaucousness inhibitor locus *Iw3* derived from wild wheat. *Theor Appl Genet.* 2014;127(4):831–41.

33. Sturaro M, Hartings H, Schmelzer E, Velasco R, Salamini F, Motto M. Cloning and characterization of GLOSSY1, a maize gene involved in cuticle membrane and wax production. *Plant Physiol.* 2005;138(1):478–89.
34. Lemieux B. Molecular genetics of epicuticular wax biosynthesis. *Trends Plant Sci.* 1996;1(9):312–8.
35. Jenks M a, Eigenbrode SD, Lemieux B. Cuticular waxes of Arabidopsis. *Arabidopsis Book* [Internet]. 2002 Jan [cited 2013 Nov 11];1:e0016.
36. Dietrich CR. Molecular and genetic characterization of genes involved in maize cuticular wax biosynthesis. 2002;
37. Faust A. Characterisation of cuticular mutants in Arabid. thaliana. 2006.
38. Aarts MG, Keijzer CJ, Stiekema WJ, Pereira A. Molecular characterization of the CER1 gene of arabidopsis involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *Plant Cell.* 1995;7(12):2115–27.
39. Haslam TM, Manas-Fernandez a., Zhao L, Kunst L. Arabidopsis ECERIFERUM2 Is a Component of the Fatty Acid Elongation Machinery Required for Fatty Acid Extension to Exceptional Lengths. *Plant Physiol.* 2012;160(3):1164–74.
40. Pighin JA, Zheng H, Balakshin LJ, Goodman IP, Western TL, Jetter R, et al. Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science.* 2004;306(5696):702–4.
41. Lee SB, Suh MC. Recent advances in cuticular wax biosynthesis and its regulation in arabidopsis. *Mol Plant.* 2013;6(2):246–9.
42. Sturaro M, Hartings H, Schmelzer E, Velasco R, Salamini F, Motto M, et al. Cloning and Characterization of GLOSSY1 , a Maize Gene Involved in Cuticle Membrane and Wax Productionl [wI. 2012;138(May):478–89.
43. Mao B, Cheng Z, Lei C, Xu F, Gao S, Ren Y, et al. Wax crystal-sparse leaf2, a rice homologue of WAX2/GL1, is involved in synthesis of leaf cuticular wax. *Planta.* 2012;235(1):39–52.
44. Li L, Li D, Liu S, Ma X, Dietrich CR, Hu HC, et al. The Maize glossy13 gene, cloned via BSR-Seq and Seq-Walking encodes a putative ABC transporter

- required for the normal accumulation of epicuticular waxes. *PLoS One*. 2013;8(12).
45. Liu S, Dietrich CR, Schnable PS. DLA-based strategies for cloning insertion mutants: Cloning the *gl4* locus of maize using Mu transposon tagged alleles. *Genetics*. 2009;183(4):1215–25.
 46. Xu X, Dietrich CR, Delledonne M, Xia Y, Wen TJ, Robertson DS, et al. Sequence analysis of the cloned *glossy8* gene of maize suggests that it may code for a beta-ketoacyl reductase required for the biosynthesis of cuticular waxes. *Plant Physiol*. 1997;115(2):501–10.
 47. Yu D, Ranathunge K, Huang H, Pei Z, Franke R, Schreiber L, et al. Wax Crystal-Sparse *Leaf1* encodes a β -ketoacyl CoA synthase involved in biosynthesis of cuticular waxes on rice leaf. *Planta*. 2008;228(4):675–85.
 48. Qin BX, Tang D, Huang J, Li M, Wu XR, Lu LL, et al. Rice *OsGL1-1* is involved in leaf cuticular wax and cuticle membrane. *Mol Plant*. 2011;4(6):985–95.
 49. Zhou L, Ni E, Yang J, Zhou H, Liang H, Li J, et al. Rice *OsGL1-6* Is Involved in Leaf Cuticular Wax Accumulation and Drought Resistance. *PLoS One*. 2013;8(5).
 50. Islam MA, Du H, Ning J, Ye H, Xiong L. Characterization of *Glossy1*-homologous genes in rice involved in leaf wax accumulation and drought resistance. *Plant Mol Biol*. 2009;70(4):443–56.
 51. Zhang Z, Wei W, Zhu H, Challa GS, Bi C, Trick HN, et al. *W3* Is a new wax locus that is essential for biosynthesis of B-diketone, development of glaucousness, and reduction of cuticle permeability in common wheat. *PLoS One*. 2015;10(10):1–21.
 52. Bonaventure G, Salas JJ, Pollard MR, Ohlrogge JB. Disruption of the *FATB* gene in *Arabidopsis* demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. *Plant Cell*. 2003;15(4):1020–33.

53. King R, Wettstein-Knowles P von. Epicuticular waxes and regulation of ear wetting and pre-harvest sprouting in barley and wheat. *Euphytica*. 2000;112:157–66.
54. Kim J, Jung JH, Lee SB, Go YS, Kim HJ, Cahoon R, et al. Arabidopsis 3-ketoacyl-coenzyme a synthase9 is involved in the synthesis of tetracosanoic acids as precursors of cuticular waxes, suberins, sphingolipids, and phospholipids. *Plant Physiol*. 2013;162(2):567–80.
55. Greer S, Wen M, Bird D, Wu X, Samuels L, Kunst L, et al. The cytochrome P450 enzyme CYP96A15 is the midchain alkane hydroxylase responsible for formation of secondary alcohols and ketones in stem cuticular wax of Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2007;145(3):653–67.
56. Bernard a., Domergue F, Pascal S, Jetter R, Renne C, Faure J-D, et al. Reconstitution of Plant Alkane Biosynthesis in Yeast Demonstrates That Arabidopsis ECERIFERUM1 and ECERIFERUM3 Are Core Components of a Very-Long-Chain Alkane Synthesis Complex. *Plant Cell*. 2012;24(7):3106–18.
57. Pighin JA, Zheng H, Balakshin LJ, Goodman IP, Western TL, Jetter R, et al. Plant Cuticular Lipid Export Requires an ABC Transporter. 2014;702(2004).
58. Bird D, Beisson F, Brigham A, Shin J, Greer S, Jetter R, et al. Characterization of Arabidopsis ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *Plant J*. 2007;52(3):485–98.
59. Broun P, Poindexter P, Osborne E, Jiang C-Z, Riechmann JL. WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(13):4706–11.
60. Liso J, Schröder F, Schippers JHM, Müssig C. NFXL2 modifies cuticle properties in Arabidopsis. *Plant Signal Behav*. 2012;7(5):551–5.
61. Wang Y, Wan L, Zhang L, Zhang Z, Zhang H, Quan R, et al. An ethylene response factor OsWR1 responsive to drought stress transcriptionally activates wax synthesis related genes and increases wax production in rice. *Plant Mol Biol*. 2012;78(3):275–88.

62. Lauter N, Kampani A, Carlson S, Goebel M, Moose SP. microRNA172 down-regulates glossy15 to promote vegetative phase change in maize. *Pnas*. 2005;2005.
63. Moose SP, Sisco PH. Glossy15, an APETALA2-like gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity. *Genes Dev*. 1996;10(23):3018–27.
64. Zhang JY, Broeckling CD, Blancaflor EB, Sledge MK, Sumner LW, Wang ZY. Overexpression of WXP1, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant J*. 2005;42(5):689–707.
65. Cominelli E, Sala T, Calvi D, Gusmaroli G, Tonelli C. Over-expression of the *Arabidopsis AtMYB41* gene alters cell expansion and leaf surface permeability. *Plant J*. 2008;53(1):53–64.
66. Seo PJ, Xiang F, Qiao M, Park J-Y, Lee YN, Kim S-G, et al. The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2009;151(1):275–89.
67. Wu R, Li S, He S, Wassmann F, Yu C, Qin G, et al. CFL1, a WW domain protein, regulates cuticle development by modulating the function of HDG1, a class IV homeodomain transcription factor, in rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2011;23(9):3392–411.
68. Lam P, Zhao L, McFarlane HE, Aiga M, Lam V, Hooker TS, et al. RDR1 and SGS3, Components of RNA-Mediated Gene Silencing, Are Required for the Regulation of Cuticular Wax Biosynthesis in Developing Inflorescence Stems of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2012;159(4):1385–95.
69. Lu P, Qin J, Wang G, Wang L, Wang Z, Wu Q, et al. Comparative fine mapping of the Wax 1 (W1) locus in hexaploid wheat. *Theor Appl Genet*. Springer Berlin Heidelberg; 2015;128(8):1595–603.
70. Tsunewaki K, Ebana K. Production of near-isogenic lines of common wheat for glaucousness and genetic basis of this trait. *Genes Genet Syst*. 1999;74:33–41.

71. Adamski NM, Bush MS, Simmonds J, Turner AS, Mugford SG, Jones A, et al. The Inhibitor of wax 1 locus (*Iw1*) prevents formation beta- And OH-beta-diketones in wheat cuticular waxes and maps to a sub-cM interval on chromosome arm 2BS. *Plant J.* 2013;74(6):989–1002.
72. Zhou Q, Li C, Mishina K, Zhao J, Zhang J, Duan R, et al. Characterization and genetic mapping of the β -diketone deficient *eceriferum-b* barley mutant. Vol. 130, *Theoretical and Applied Genetics*. 2017. p. 1169–78.
73. Liu Q, Ni Z, Peng H, Song W, Liu Z, Sun Q. Molecular mapping of a dominant non-glaucousness gene from synthetic hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.): Molecular mapping of non-glaucousness gene in wheat. *Euphytica*. 2007;155(1-2):71–8.
74. Nelson JC, Deynze AE, Sorrells ME, Autrique E, Lu YH, Merlino M, et al. Molecular mapping of wheat. Homoeologous group 2. *Genome*. 1995;38(3):516–24.
75. Dubcovsky J, Echaide M, Giancola S, Rousset M, Luo MC, Joppa LR, et al. Seed-storage-protein loci in RFLP maps of diploid, tetraploid, and hexaploid wheat. *TAG Theor Appl Genet*. 1997 Nov 26;95(7):1169–80.
76. Gadaleta a, Giancaspro a, Giove SL, Zacheo S, Mangini G, Simeone R, et al. Genetic and physical mapping of new EST-derived SSRs on the A and B genome chromosomes of wheat. *Theor Appl Genet*. 2009 Mar;118(5):1015–25.
77. Антонюк МЗ. Створення та генетичне маркування ліній пшениці з хромосомами трьох видів егілопсу. 1995.
78. Peng J, Korol AB, Fahima T, Röder MS, Ronin YI, Li YC, et al. Molecular genetic maps in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*: genome-wide coverage, massive negative interference, and putative quasi-linkage. *Genome Res*. 2000 Oct;10(10):1509–31.
79. Chen ZJ. Molecular mechaisms of polyploidy vigor. *Trends plant Sci*. 2010;15(2):1–28.
80. Leitch AR, Leitch2 IJ. Genomic Plasticity and the Diversity of Polyploid Plants. *Science* (80-). 2008;320:481–3.

81. Feldman M, Levy A a. Genome evolution in allopolyploid wheat--a revolutionary reprogramming followed by gradual changes. *J Genet Genomics*; 2009 Sep;36(9):511–8.
82. Ozkan H, Levy AA, Feldman M. Allopolyploidy-Induced Rapid Genome Evolution in the Wheat (*Aegilops* – *Triticum*) Group. *Plant Cell*. 2001;13(August):1735–47.
83. Jackson S, Chen ZJ. Genomic and expression plasticity of polyploidy. *Curr Opin Plant Biol*. Elsevier Ltd; 2010 Apr;13(2):153–9.
84. Liu B, Wendel J. Non-Mendelian Phenomena in Allopolyploid Genome Evolution. *Curr Genomics*. 2002 Dec 1;3(6):489–505.
85. Soltis P., Soltis DE. The role of hybridization in plant speciation. *Annu Rev Plant Biol*. 2009;60:561–88.
86. Buggs RJ a, Zhang L, Miles N, Tate J a, Gao L, Wei W, et al. Transcriptomic shock generates evolutionary novelty in a newly formed, natural allopolyploid plant. *Curr Biol*. Elsevier Ltd; 2011 Apr 12;21(7):551–6.
87. Lee HS, Chen ZJ. Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(12):6753–8.
88. Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee H-S, et al. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends Genet*. 2003 Mar;19(3):141–7.
89. Zhao N, Xu L, Zhu B, Li M, Zhang H, Qi B, et al. Chromosomal and genome-wide molecular changes associated with initial stages of allohexaploidization in wheat can be transit and incidental. *Genome*. 2011 Aug;54(8):692–9.
90. Liu B, Xu C, Zhao N, Qi B, Kimatu JN, Pang J, et al. Rapid genomic changes in polyploid wheat and related species: implications for genome evolution and genetic improvement. *J Genet Genomics*; 2009;36(9):519–28.
91. Wang Y, Jha AK, Chen R, Doonan JH, Yang M. Polyploidy-associated genomic instability in *Arabidopsis thaliana*. *Genesis* [Internet]. 2010 Apr;48(4):254–63.

92. Adams KL, Wendel JF. Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2005 Apr;8(2):135–41.
93. 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 Aug;121(3):489–97.
94. Chen ZJ, Ni Z. Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *Bioessays.* 2006 Mar;28(3):240–52.
95. Alix K, Gérard PR, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JSP. Polyploidy and interspecific hybridization: Partners for adaptation, speciation and evolution in plants. *Ann Bot.* 2017;120(2):183–94.
96. Vdovychenko ZV, Antonyuk MZ, Ternovskaya TK. Genetic analysis of the *T. aestivum*/*Ae. sharonensis* introgressive lines of common wheat for resistance to powdery mildew. Vol. 39, *Cytology and Genetics.* 1992. p. 67–74.
97. Antonyuk MZ, Bodylyova M V., Ternovskaya TK. Genome structure of introgressive lines *Triticum Aes-Tivum*/*Aegilops Sharonensis*. *Cytol Genet.* 2009 Dec 15;43(6):411–8.
98. Yaakov B, Kashkush K. Methylation, transcription, and rearrangements of transposable elements in synthetic allopolyploids. *Int J Plant Genomics.* 2011 Jan;569826.
99. Gaeta RT, Pires JC, Iniguez-Luy F, Leon E, Osborn TC. Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype. *Plant Cell.* 2007 Nov;19(11):3403–17.
100. Ichikawa S. Responses to Ionizing Radiation In: *Physiological Plant Ecology I. Encyclopedia of Plant Physiology (New Series)*, vol 12 / A. Springer, Berlin, Heidelberg. O.L. L, P.S. N, C.B. O, H. Z, editors. Springer Berlin Heidelberg; 1981. 199-228 p.
101. Matzke M, Mittelsten O, Matzke, J. Rapid structural and epigenetic changes in polyploid and aneuploid genomes. *Bioessays* 1999 Sep;21(9):761–7.
102. Semin B V, Il'in I V. [Diversity of LTR retrotransposons and their role in genome reorganization]. *Genetika.* 2005 Apr;41(4):542–8.

103. McCue AD, Slotkin RK. Transposable element small RNAs as regulators of gene expression. *Trends Genet.* Elsevier Ltd; 2012 Dec;28(12):616–23.
104. Simon S, Zhai J, Zeng J, Meyers B. The cornucopia of small RNAs in plant genomes. *Rice.* 2008 Aug 15;1(1):52–62.
105. Shaked H, Kashkush K, Ozkan H, Feldman M, Levy a a. 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.
106. Gustafson P, 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;51(8):616–27.
107. Schwarzacher T, Bento M, Gustafson JP, Viegas W, Silva M. Size matters in Triticeae polyploids: larger genomes have higher remodeling. *Genome.* 2011;54(3):175–83.
108. Ma XF, Gustafson JP. Allopolyploidization-accommodated genomic sequence changes in triticales. *Ann Bot.* 2008;101(6):825–32.
109. 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.
110. Belyayev a, Raskina O, Korol a, Nevo E. Coevolution of A and B genomes in allotetraploid *Triticum dicoccoides*. *Genome.* 2000;43(6):1021–6.
111. Lynch M, Force A. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics.* 2000;154(1):459–73.
112. Tchurikov N a. Molecular mechanisms of epigenetics. *Biochem Biokhimiia.* 2005 Apr;70(4):406–23.
113. Richards EJ, Elgin SCR. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: Rounding up the usual suspects. *Cell.* 2002;108(4):489–500.
114. Boyko A, Kovalchuk I. Epigenetic control of plant stress response. *Env Mol Mutagen.* 2008;49(1):61–71.

115. Henderson IR, Jacobsen SE. Epigenetic inheritance in plants. *Nature*. 2007;447(7143):418–24.
116. Mette M. Plant DNA methylation analysis by “ bisulfite genomic sequencing ” Procedure Preparation of Plant Genomic DNA Bisulfite treatment. 2005;3–8.
117. Lukens LN, Pires JC, Leon E, Vogelzang R, Oslach L, Osborn T. Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids. *Pl. Physiol*. 2006;140(1):336–48.
118. Tian L, Li X, Ha M, Zhang C, Chen ZJ. Genetic and epigenetic changes in a genomic region containing MIR172 in *Arabidopsis* allopolyploids and their progenitors. *Heredity (Edinb)*. 2014;112(2):207–14.
119. Wierzbicki AT, Haag JR, Pikaard CS. Noncoding Transcription by RNA Polymerase Pol IVb/Pol V Mediates Transcriptional Silencing of Overlapping and Adjacent Genes. *Cell*. 2008;135(4):635–48.
120. Chapman EJ, Carrington JC. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet*. 2007;8(11):884–96.
121. Akpinar BA, Budak H. Dissecting miRNAs in Wheat D Genome Progenitor, *Aegilops tauschii*. *Front Plant Sci*. 2016;7(May):606.
122. Hilbricht T, Varotto S, Sgaramella V, Bartels D, Salamini F, Furini A. Retrotransposons and siRNA have a role in the evolution of desiccation tolerance leading to resurrection of the plant *Craterostigma plantagineum*. *New Phytol*. 2008;179(3):877–87.
123. 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 Nat Acad Sci*. 1997;94(7):3442–7.
124. Preuss S, Pikaard C. rRNA gene silencing and nucleolar dominance: insights into a chromosome-scale epigenetic on/off switch. *Biochim Biophys Acta*. 2013;31(9):1713–23.
125. Raissig MT, Bemer M, Baroux C, Grossniklaus U. Genomic Imprinting in the *Arabidopsis* Embryo Is Partly Regulated by PRC2. *PLoS Genet*. 2013;9(12):21–3.

126. Zhang H yu, Luo M, Johnson SD, Zhu X wei, Liu L, Huang F, et al. Parental Genome Imbalance Causes Post-Zygotic Seed Lethality and Deregulates Imprinting in Rice. *Rice*. 2016;9(1).
127. Meng D, Zhao J, Zhao C, Luo H, Xie M, Liu R, et al. Sequential gene activation and gene imprinting during early embryo development in maize. *Plant J*. 2017;445–59.
128. Chandler VL, Stam M. Chromatin conversations: Mechanisms and implications of paramutation. *Nat Rev Genet*. 2004;5(7):532–44.
129. Della Vedova CB. Paramutation: The Chromatin Connection. *Plant Cell Online*. 2004;16(6):1358–64.
130. Arteaga-vazquez MA, Chandler VL. Paramutation: The Chromatin Connection. *Curr Perspect ESSAY*. 2011;20(2):156–63.
131. Stam M, Belele C, Dorweiler JE, Chandler VL. Differential chromatin structure within a tandem array 100 kb upstream of the maize b1 locus is associated with paramutation. *Genes Dev*. 2002;16(15):1906–18.
132. Dorweiler JE. mediator of paramutation1 Is Required for Establishment and Maintenance of Paramutation at Multiple Maize Loci. *Plant Cell Online*. 2000;12(11):2101–18.
133. Knott DR. Anomalous segregations at the Sr6 locus for stem rust resistance in wheat. *Theor Appl Genet*. 2001;103(1):171–7.
134. Li AL, Geng SF, Zhang LQ, Liu DC, Mao L. Making the bread: Insights from newly synthesized allohexaploid wheat. *Mol Plant*. 2015;8(6):847–59.
135. 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 Mar;181(3):1147–57.
136. Lippman Z, Gendrel A-V, Al B. Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications. Vol. 9, *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance*: 2014. 152 p.
137. He P, Friebe BR, Gill BS, Zhou JM. Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat. *Plant Mol Biol*. 2003;52(2):401–14.

138. Chagué V, Just J, Mestiri I, Balzergue S, Tanguy AM, Huneau C, et al. Genome-wide gene expression changes in genetically stable synthetic and natural wheat allohexaploids. *New Phytol.* 2010;187(4):1181–94.
139. Veitia RA, Bottani S, Birchler JA. Cellular reactions to gene dosage imbalance: genomic, transcriptomic and proteomic effects. *Trends Gen.* 2008;24(8):390–7.
140. Bomblies K, Weigel D. Hybrid necrosis: Autoimmunity as a potential gene-flow barrier in plant species. *Nat Rev Genet.* 2007;8(5):382–93.
141. Alcázar R, García A V., Kronholm I, De Meaux J, Koornneef M, Parker JE, et al. Natural variation at strubbelig receptor kinase 3 drives immune-triggered incompatibilities between *arabidopsis thaliana* accessions. *Nat Genet.* 2010;42(12):1135–9.
142. Matsuoka Y, Takumi S, Kawahara T. Natural variation for fertile triploid F1 hybrid formation in allohexaploid wheat speciation. *Theor Appl Genet.* 2007;115(4):509–18.
143. Rubio-Somoza I, Weigel D. MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. *Trends Plant Sci.* Elsevier Ltd; 2011;16(5):258–64.
144. Ha M, Lu J, Tian L, Ramachandran V, Kasschau KD, Chapman EJ, et al. Small RNAs serve as a genetic buffer against genomic shock in *Arabidopsis* interspecific hybrids and allopolyploids. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(42):17835–40.
145. Casacuberta JM, Santiago N. Plant LTR-retrotransposons and MITEs: Control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes. *Gene.* 2003;311(1-2):1–11.
146. Feschotte C, Jiang N, Wessler SR. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat Rev Genet.* 2002 May;3(5):329–41.
147. Кунах ВА. Мобільні генетичні елементи і пластичність геному рослин. Київ, Логос; 2013. 288 p.
148. Kashkush K, Khasdan V. Large-scale survey of cytosine methylation of retrotransposons and the impact of readout transcription from long terminal repeats on expression of adjacent rice genes. *Genetics.* 2007;177(4):1975–85.

149. Charles M, Belcram H, Just J, Huneau C, Viollet A, Couloux A, et al. Dynamics and differential proliferation of transposable elements during the evolution of the B and A genomes of wheat. Vol. 180, Genetics. 2008. 1071-86
150. Ma J, Devos KM, Bennetzen JL. Analyses of LTR-retrotransposon structures reveal recent and rapid genomic DNA loss in rice. Genome Res. 2004 May;14(5):860–9.
151. Kashkush K, Feldman M, Levy AA. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. Nat Genet. 2003;33(1):102–6.
152. 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.
153. Kato M, Takashima K, Kakutani T. Epigenetic control of CACTA transposon mobility in Arabidopsis thaliana. Genetics. 2004 Oct;168(2):961–9.
154. Zhao D, Ferguson AA, Jiang N. What makes up plant genomes: The vanishing line between transposable elements and genes. Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech. Elsevier B.V.; 2016;1859(2):366–80.
155. Vicient CM, Casacuberta JM. Impact of transposable elements on polyploid plant genomes. Ann Bot. 2017;120(2):195–207.
156. Kinoshita Y, Saze H, Kinoshita T, Miura A, Soppe WJJ, Koornneef M, et al. Control of FWA gene silencing in Arabidopsis thaliana by SINE-related direct repeats. Plant J. 2007;49(1):38–45.
157. Grandbastien MA. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. Trends Plant Sci. 1998;3(5):181–7.
158. Kraitshtein Z, Yaakov B, Khasdan V, Kashkush K. Genetic and epigenetic dynamics of a retrotransposon after allopolyploidization of wheat. Genetics. 2010;186(3):801–12.
159. Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Sung GH, Spatafora JW, Carrington JC. Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in Arabidopsis thaliana. Nat Genet. 2004;36(12):1282–90.

160. Ito H. Small RNAs and transposon silencing in plants. *Dev Growth Differ.* 2012;54(1):100–7.
161. Martínez G, Panda K, Köhler C, Slotkin RK. Silencing in sperm cells is directed by RNA movement from the surrounding nurse cell. *Nat Plants.* Nature Publishing Group; 2016;2(4):1–8.
162. Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, et al. A microsatellite map of wheat. *Genetics.* 1998 Aug;149(4):2007–23.
163. Kalendar R, Schulman AH. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nat Protoc.* 2006;1(5):2478–84.
164. Гланц С. Медико Биологическая Статистика. Практика; 1998. 459 p.
165. Tsunewaki K. Monosomic analysis of synthesized hexaploid wheat. *Jap J Genet.* 1962;37(155-168).
166. Goncharov N. Location of the gene controlling the “non-glaucousness” of vegetative organs in tetraploid wheat. *Russ J Genet.* 1994;30:1282–3.
167. Allan REwIS, Vogel O. F1 monosomic analyses involving a smooth-awn durum wheat. *Wheat Inf Serv.* 1960;11:3–4.
168. Tsunewaki K. Genetic studies of a 6•-derivative from an 8• triticales. *Can J Genet Cytol.* 1964;6:1–11.
169. Antonyuk M., Ternovskaya T. Plant morphology characters as markers of the chromosome homoeologous groups of Triticeae. *Cyt Gen.* 1997;31(4):105–12.
170. Терновская ТК. Замещение хромосом генома D мягкой пшеницы хромосомами геномов U или Sl эгилопсов. *Цитология и генетика.* 1994;28(5):50–5.
171. Вдовиченко, Ж.В. Терновская ТК. Цитогенетическое изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы, устойчивых к мучнистой росе. *Агроэкологія та біотехнологія Зб наук работ.* 1999;3:70–8.
172. Liu Q, Ni Z, Peng H, Song W, Liu Z, Sun Q. Molecular mapping of a dominant non-glaucousness gene from synthetic hexaploid wheat. *Euphytica.* 2006 10;155(1-2):71–8.

173. Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol*. 2002 Dec;11(12):2453–65.
174. Johnson EB, Nalam VJ, Zemetra RS, Riera-Lizarazu O. Mapping the compactum locus in wheat and its relationship to other spike morphology genes of the Triticeae. *Euphytica*. 2007 Dec;163(2):193–201.
175. Zhironov EG, Ternovskaya TK. Substitution of D-genome in wheat. *Eur Wheat Aneuploid Co-op Newsl Agric ResInst Hungarian Acad Sci, Martonvashar Inst Plant Sci ResCambridge Lab*. 1987;60–5.
176. Шпильчин ВВ, Антонюк МЗ, Терновська ТК. Фенотипний поліморфізм за ознакою воскова осуга серед представників підтриби *Triticinae*. Наукові записки НаУКМА Біологія та екологія. 106:3–8.
177. Шпильчин ВВ, Терновська ТК. Зміна прояву ознаки воскова осуга у генераціях амфідиплоїдів підтриби *Triticinae*. Наукові записки НаУКМА Біологія та екологія. 2011;119:3–7.
178. Антонюк МЗ, Терновская ТК, Созинов АА. Идентификация блоков электрофоретических компонентов запасных белков, кодируемых генами трех видов эгилопса. *Физиология и биохимия культурных растений*. 1994;26(5):474–81.
179. Sourdille P, Tavaud M, Charmet G, Bernard M. Transferability of wheat microsatellites to diploid Triticeae species carrying the A, B and D genomes. *TAG Theor Appl Genet*. 2001 Aug 1;103(2-3):346–52.
180. Liu S, Zhao S, Chen F, Xia G. Generation of novel high quality HMW-GS genes in two introgression lines of *Triticum aestivum*/*Agropyron elongatum*. *BMC Evol Biol*. 2007 Jan;7:76.
181. Yuan Z, 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 Jan;6(8):e23511.

182. Schranz ME, Osborn TC. De novo variation in life-history traits and responses to growth conditions of resynthesized polyploid *Brassica napus* (Brassicaceae). *Am J Bot*. 2004 Feb;91(2):174–83.
183. Adams KL, Percifield R, Wendel JF. Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. *Genetics*. 2004 Dec;168(4):2217–26.
184. Zhironov EG, Ternovskaya TK. Transfer of D genome from common wheat to durum wheat. *Wheat Inform Serv*. 1988;(65):4–6.
185. Терновская ТК, Жиров ЕГ. Геном D мягкой пшеницы. Генетический контроль признаков восковой налет, опушение колосковой чешуи и окраска зрелого колоса. *Цитология и генетика*. 1993;27(3):15–20.
186. King RW, Wettstein-Knowles P von. Epicuticular waxes and regulation of ear wetting and pre-harvest sprouting in barley and wheat. *Euphytica*. Kluwer Academic Publishers; 2000 Mar 1;112(2):157–66.
187. González A, Ayerbe L. Effect of terminal water stress on leaf epicuticular wax load, residual transpiration and grain yield in barley. *Euphytica*. 2009 ;172(3):341–9.
188. Merah O, Deleens E, Souyris I, Monneveux P. Effect of Glauousness on Carbon Isotope Discrimination and Grain Yield in Durum Wheat. *J Agron Crop Sci*. 2000 Dec;185(4):259–65.
189. Shpylchyn V, Martynenko V, T. T. Genetic instability of amphidiploid *Miossa* (*Triticum durum* x *Aegilops comosa*, AABBMtMt) resistant to powdery mildew. In: *Proceedings of the 13th ICRPM Conference*. 2012. p. 164–5.
190. Jones JK, Majisu BN. The homoeology of *Aegilops mutica* chromosomes. *Can J Genet Cytol*. 1968;10(3):620–6.
191. GrainGenes Class Browser: Marker [Internet]. Available from: <https://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/GG3/browse.cgi?class=marker>
192. Adonina I, Salina E, Pestsova E, Röder M. Transferability of wheat microsatellites to diploid *Aegilops* species and determination of chromosomal localizations of microsatellites in the S genome. *Genome*. 2005;970:959–70.

193. Leonova IN, Laikova LI, Popova OM, Unger O, Börner a., Röder MS. Detection of quantitative trait loci for leaf rust resistance in wheat—*T. timopheevii*/*T. tauschii* introgression lines. *Euphytica*. 2006;155(1-2):79–86.
194. Castillo A, Budak H, Martín AC, Dorado G, Börner A, Röder M, et al. Interspecies and intergenus transferability of barley and wheat D-genome microsatellite markers. *Ann Appl Biol*. 2010 Apr 20;156(3):347–56.
195. Bennett D, Izanloo A, Edwards J, Kuchel H, Chalmers K, Tester M, et al. Identification of novel quantitative trait loci for days to ear emergence and flag leaf glaucousness in a bread wheat population adapted to southern Australian conditions. *Theor Appl Genet*. 2012 Mar;124(4):697–711.
196. Börner A, Schumann E, Fürste A, Cöster H, Leithold B, M.Röder, et al. Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *TAG*. 2002;105(6-7):921–36.
197. Kulwal P., Roy J., Balyan H., Gupta P. QTL mapping for growth and leaf characters in bread wheat. *Plant Sci*. 2003;164(2):267–77.
198. Larson SR, Kishii M, Tsujimoto H, Qi L, Chen P, Lazo GR, et al. Leymus EST linkage maps identify 4NsL-5NsL reciprocal translocation, wheat-Leymus chromosome introgressions, and functionally important gene loci. *Theor Appl Genet*. 2012 Jan;124(1):189–206.
199. Pshenichnikova TA, Lapochkina IF, Shchukina L V. The Inheritance of Morphological and Biochemical Traits Introgressed into Common Wheat from *Aegilops speltoides* Tausch. *Genet Resour Crop Evol*. 2006;54(2):287–93.
200. Tang Z, Fu S, Yan B, Zhang H, Ren Z. Unequal chromosome division and inter-genomic translocation occurred in somatic cells of wheat-rye allopolyploid. *J Plant Res*. 2012;125(2):283–90.
201. McClintock B. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci*. 1950;36(6):344–55.
202. Shpylchyn V V., Antonyuk MZ, Ternovska TK. Genetic analysis of artificial *Triticinae* amphidiploid *Aurotica* based on the glaucousness trait. *Cytol Genet*. 2014;48(5):308–17.