

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

Шпильчин Віталій Віталійович

УДК 631.523.581

**ЗМІНА ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА w^I У ПОКОЛІННЯХ АМФІДИПЛОЇДІВ
TRITICINAE**

03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Національному університеті «Києво-Могилянська академія»,
Міністерство освіти і науки України

Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор
Терновська Тамара Костянтинівна,
Національний університет «Києво-
Могилянська академія», завідувач кафедри
біології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий
співробітник, член-кор. НААН України
Файт Віктор Іванович,
Селекційно-генетичний інститут –
Національний центр насіннєзнавства та
сортовивчення, заступник директора з
наукової роботи

кандидат біологічних наук, старший
науковий співробітник
Козуб Наталія Олександрівна
Інститут захисту рослин НААН України,
завідувач лабораторії екологічної генетики

Захист відбудеться 5 липня 2018 о 13.00 на засіданні спеціалізованої вченої ради
К 26.202.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної
академії наук України за адресою: вул. Академіка Заболотного 148, м. Київ
03143.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту клітинної біології та
генетичної інженерії Національної академії наук України за адресою: вул.
Академіка Заболотного 148, м. Київ 03143.

Автореферат розіслано ____ червня 2018

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук

К.В. Листван

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Воскова осуга вкриває поверхню вегетативних органів всіх наземних рослин, хоча експресивність ознаки може значно варіювати. У злаків добре розвинений шар осуги надає рослині блакитний відтінок. Рослина зі слабким шаром воскової осуги виглядає яскраво-зеленою. Ознака не є селективно-нейтральною. Сорти пшениці переважно мають міцний шар осуги, а серед дикорослих представників *Triticinae* переважають рослини без воскової осуги (Monneveux et al., 2004, Simmonds et al., 2007, Watanabe et al., 2005). 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 (McIntosh et al., 2008). 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 ознакою наявність воскової осуги спостерігається серед штучних гексаплоїдів *Triticinae* (Терновская, 1999). Тридцять років тому було створено чотири геномно-заміщених амфідиплоїди, в яких субгеном DD озимого сорту пшениці м'якої (*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) (Жиров, Терновская, 1984, Жиров, 1989). 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 DD виду *Ae. tauschii*, природного джерела субгенома D м'якої пшениці (MIT^D, AABBDD) (Жиров, 1989, Терновская, 1997). Мінливість за ознакою наявність/відсутність 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 (Антонюк, Терновська, 2001, Єфіменко та ін., 2018). 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 зміненним 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 (Терновская, 1999).

Останнім часом інтенсивно досліджуються процеси, які відбуваються в природних та штучно створених амфідиплоїдах під час формування їхнього геному. Результати спростовують нашу впевненість у стабільності геному протягом онтогенезу, перш за все геному гібридного походження (Kashkush et al., 2002, Kenan-Eichler et al., 2011, Lewsey et al., 2016, Yu et al., 2017). Зміни реєструються на епігенетичному (регуляція експресії генів) та на генетичному рівні. Як один з найміцніших промоторів таких перебудов розглядається наразі активність (ретро)транспозонів внаслідок «геномного стресу» (McClintock, 1984), який спостерігається при об'єднанні різних геномів у один (Bennetzen, 2000, Tomita, 2008, Parisod et al., 2009, Zhang, 2004, Fedoroff, 2000). Мінливість за ознакою наявності/відсутності воскової осуги підходить для вивчення молекулярно-генетичних процесів, що відбуваються у об'єднаному геномі внаслідок геномного стресу. 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 та 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 за даними оцінки 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, яка є причиною спостережуваної мінливості.
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 для виявлення асоціації між рухом ретротранспозона та мікросателітним локусом, зчепленим з геном, мутація в якому виявляється як поява блакитних рослин у популяції зелених рослин, за походженням гомозиготних.

Об'єкт дослідження – штучні амфідиплоїди пшениці з перманентною мінливістю за ознакою відсутності/наявності 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 ДНК 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 наявності/відсутності 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 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 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.

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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В розділі розглянуто загальні відомості щодо біосинтезу, генетичної регуляції та фізіологічної ролі воскової осуги у рослин. Докладно представлені дані щодо генетичного контролю цієї ознаки у пшениці м'якої, охарактеризовано основні гени, які беруть участь в цьому процесі. Проаналізовано дані щодо структурних і функціональних перетворень, які відбуваються в гібридному геномі внаслідок алополіплоїдизації, та їхній вплив на формування і стабілізацію таких геномів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Рослинний матеріал. У роботі використовували такий рослинний матеріал: геномно-заміщені амфідиплоїди Авродес (AABBSS), Аврозис (AABBS^{sh}S^{sh}), Авролата (AABBUU), Авротіка (AABVTT), геномно-доданий амфідиплоїд Міоза (AABVMM) (Жиров, 1989) геномно-додані амфідиплоїди серії MIT^D (AABVDD) (Терновская, 1999), гексаплоїдні інтрогресивні лінії пшениці, що походять від геномно-заміщених амфідиплоїдів Авродес, Аврозис, Авролата, 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, рослини F₁ та F₂ від схрещування амфідиплоїдів Міоза з контрастними фенотипами, рослини F₁, F₂, F₃ та F₄ від схрещування амфідиплоїдів Авротіка з контрастними фенотипами, сорт гексаплоїдної озимої пшениці м'якої Аврора (*Triticum aestivum* L.).

Виділення ДНК, ПЛР та електрофорез. ДНК виділяли з зелених листків та (або) етильованих паростків з використанням ЦТАБ буферу. Для проведення ПЛР в роботі було використано праймери до мікросателітних послідовностей, що знаходяться на 2В та 2D пшеничних хромосомах. Послідовності праймерів були взяті з літературних джерел (Röder et al. 1998) та з баз даних послідовностей GrainGenes (<http://wheat.pw.usda.gov/>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Послідовності праймерів для методів IRAP та REMAP підбиралися на основі літературних даних (Kalendar & Schulman 2006). Температура плавлення праймерів розраховувалася за допомогою програмного забезпечення Oligo 6.31 (Molecular Biology Insights, Inc.). Продукти ампліфікації розділяли в 6% поліакриламідному гелі з додаванням 6М сечовини, візуалізували продукти з

використанням нітрату срібла; в агарозному гелі, візуалізували з використанням бромистого етидію; в системі ALFexpress II (“Amersham”, США) з використанням стандартизованого акриламідного геля ReproGel, візуалізували за допомогою програми Fragment Analyzer 1.00.36.

Методи роботи з білками. Екстракцію гліадинів, глютенінів, альфа- та бета-амілази проводили із застосуванням відповідних екстракційних буферів. Електрофоретичне розділення проводили в поліакриламідному гелі, згідно з рекомендаціями оригінаторів методик (Антонюк та ін., 1994, 1995).

Статистичний аналіз. Статистична обробка результатів полягала у порівнянні розподілів ознак по фенотипних класах, 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 (Гланц, 1998).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Встановлення моделі успадкування ознаки наявність/відсутність воскової осуги. У ході дослідження було встановлено модель успадкування ознаки воскова осуга серед інтрогресивних ліній, створених за участю геномно-заміщених амфідиплоїдів Авродес (AABBSS), Аврозис (AABB^{SshSsh}) та Авролата (AABBUU), схема створення яких (на прикладі Авролати) зображена на рис. 1.

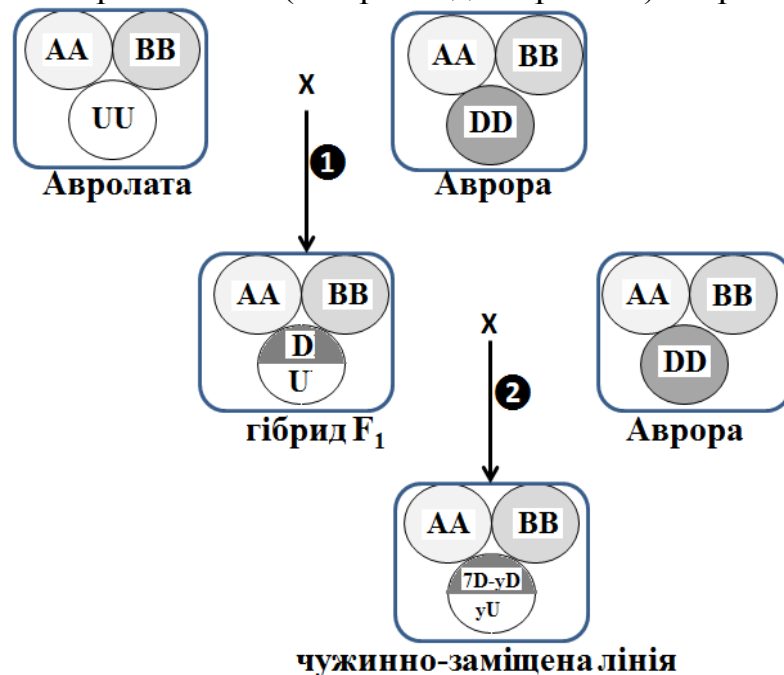


Рис. 1. Схема створення чужинно-заміщених і транслокаційних ліній пшениці з використанням геномно-заміщеного амфідиплоїда на прикладі Авролати. ① Гібрид F₁ від схрещування Авролати і Аврори беккросується з Авророю 1-3 рази до відновлення самофертильності. ② Серед нащадків від самозапилення беккросних рослин цитологічно виділяють 42-хромосомні рослини, доводять, що «у» пар хромосом D заміщені на «у» пар хромосом U та перевіряють на наявність транслокацій (Жиров & Терновская 1984).

Особливістю даних рослин є те, що серед більшості ліній, які не мають воскової осуги (зелені) з моменту створення перманентно відбувається вищеплення рослин з восковою осугою (блакитних), що триває до втрати носіїв домінантного фенотипу (відсутність воскової осуги) (рис. 2).



Рис 2. Вигляд пшеничних рослин з контрастними фенотипами за ознакою інтересу на стадії виколошування: рослини з восковою осугою – ліворуч, рослини без воскової осуги – праворуч.

Початково, 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 *Iw1* та *Iw2*) рослини F_1 не матимуть осуги, а у популяції F_2 буде спостерігатися менделівське моногенне та дигенне розщеплення. Але результати схрещувань відрізнялися від очікуваних (табл. 1).

Результати оцінки в F_1 від схрещування контрастних за ознакою ліній між собою та з генотипом Аврора були не такі, що очікувались. Переважно всі рослини F_1 були або повністю блакитними, або мали зелений колос та блакитне листя та стебло. Домінантна ознака (зелена) майже не виявлялася у гібридах першого покоління всупереч очікуванню. Було зроблено припущення, що рослини, які за фенотипом є зеленими, продукують гамети, в яких домінантний алель гена-інгібітора якимось чином змінився на рецесивний, тобто відбувається зміна його експресії, і серед нащадків від схрещування ліній з контрастними фенотипами з'являються переважно F_1 з рецесивною ознакою. Навіть якщо F_1 має, як годиться, домінантну ознаку (зелені чи зелено-блакитні), серед рослин F_2 або зовсім немає розщеплення, або розщеплення є, але у порівнянні з очікуваним 3 домінантних : 1 рецесивна розщеплення спотворено через зростання кількості рослин із рецесивним фенотипом.

Таблиця 1

Характеристика компонентів схрещування, гібридів F₁ та F₂ 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.
res 193 x res 33	блакитний	Зелений	зелено-бл.	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-бл.	блакитний	блакитні	117 блакитних
res 31 x res 32-2	зелено-бл.	блакитний	зелено-бл.	94 блакитних
res 32-2 x res 22	блакитний	зелено-бл.	блакитні	56 зел-бл.
res 12 x res 31	блакитний	зелено-бл.	зелено-бл.	34 бл., 52 зел-бл.
res 21-1 x res 32-2	зелено-бл.	блакитний	блакитні	68 бл., 10 зел-бл.
res 12 x res 13	блакитний	зелено-бл.	блакитні	13 бл., 21 зел-бл.
res 12 x res 13	блакитний	зелено-бл.	блакитні	82 бл.
res 25 x res 22	блакитний	зелено-бл.	блакитні	49 бл., 14 зел-бл.
(res 3 x res 252)x (res 3 x res 252)	зелений	блакитний	зелені	72 бл., 41 зел.
(res 3 x res 252) x (res 3 x res 252)	блакитний	Зелений	зелені	41 бл., 28 зел.

Відповідно до феномену гомеології геномів та явища трансферабільності маркерів до мікросателітних локусів, було проведено мікросателітний аналіз із застосуванням праймерів до мікросателітних локусів, специфічних до 2D хромосоми, щоб з'ясувати наявність зміни експресії генів-інгібіторів, які розташовані на хромосомах другої гомеологічної групи третього чужинного субгеному відповідних штучних гексаплоїдів.

Для ліній похідних геномно-заміщених форм вдалося ідентифікувати продукти ампліфікації у ПААГ для трьох локусів: *Xcfd51*, *Xcfd56* та *Xbarc159* (табл. 2).

Аналіз показав, що спектр ампліфікації ДНК ліній-похідних Аврозису 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 ліній-похідних Авродеса – результати були отримані неоднозначні,

що може бути пояснено рекомбінантною структурою їхньої відповідної хромосоми. Як і очікувалося, спектри ліній з проміжним фенотипом (зелений колос, листя і стебло вкриті восковою осугою) не були подібними до спектрів Аврори чи Авродесу за трьома локусами. Це пояснюється тим, що у контролі такого фенотипу бере участь ген *Iw3*, локалізований на хромосомі 1В.

Таблиця 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 амфідипл.	алель Аврори	алель амфідипл.	алель Аврори	алель амфідипл.
3	+		+		+	
5		+		+		+
12		+	+			+
13		+	+		+	
19		+			+	+
21-1	+		+			+
22	+		+			+
25	+		+		+	
31	+			+	+	
32-2		+		+		+
33		+		+		+
60		+		+		+
105	+		+		+	
130	+		+		+	
158		+		+		+
160		+		+		+
193		+		+		+
252		+		+		+

Аналіз зміни прояву ознаки воскова осуга у генераціях амфідиплоїдів Авротіка, Міоза та МІТ. Було проведено аналіз геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка та геномно-доданих амфідиплоїдів Міоза та МІТ^D, в яких відбувалася зміна стану гена-інгібітора воскової осуги з домінантного до рецесивного та втрачалася інгібіторна дія цього гена. Порівняння електрофоретичних спектрів контрастних за ознакою інтересу Авротіки та Міози за деякими білками різниці не виявило, окрім гліадинових спектрів для зеленої та блакитної Авротіки (рис. 3). Була наявна різниця в компонентах ω -зони. Відомо, що компоненти цієї зони контролюються генами, розташованими на хромосомах 1-ої гомеологічної групи.

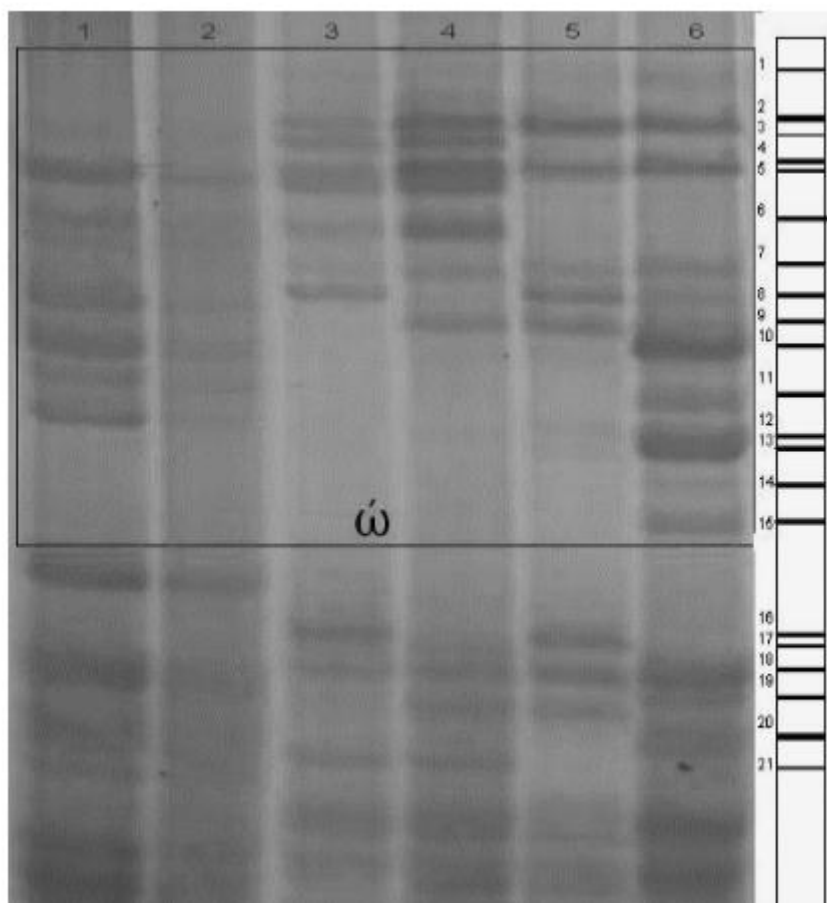


Рис 3. Електрофоретичний спектр гліадинів окремих рослин: 1) Міюза (зел), 2) Міюза (бл), 3) Авротіка 1 (зел), 4) Авротіка 2 (зел), 5) Авротіка 2 (бл), 6) Аврора.

Результати гібридологічного аналізу контрастних морфотипів Авротіки та Міюзи, як і в випадку з інтрогресивними лініями, не додали інформації щодо причин мінливості за ознакою інтересу: F_1 для деяких комбінацій схрещування мали очікуваний фенотип (зелений), але і в такому випадку у F_2 спостерігали надлишок рецесивних фенотипів (табл. 3).

Застосування праймерів до SSR локусів, специфічних до хромосоми 2D у всіх випадках дало продукти ампліфікації, хоча субгеном D не входить до складу жодного амфідиплоїда, оскільки є заміщеним на геном відповідного виду егілопса. Серед семи SSR-локусів хромосоми 2D, один з них — *Xbarc124-2DS* (знаходиться на короткому плечі хромосоми 2D на відстані 0,9 сМ від гена *Iw2*) дав різні продукти ампліфікації у зеленої та блакитної форм Міюзи, тому припускається, що причиною появи зеленого морфотипу є зміна у хромосомі 2M *Ae. comosa*, яка зачіпає ген ортологічної серії *Iw2*. Загалом поліморфізм спостерігався між продуктами ампліфікації із праймерами до трьох локусів, розташованих на хромосомі 2B (*Xcfd238-2BS*, *Xbarc318-2BS*, *Xwmc361-2BL*) з ДНК Міюзи з восковою осугою та Міюзи без воскової осуги. Спектри Авротіки у всіх випадках були мономорфними.

Таблиця 3

Характеристика компонентів схрещування, гібридів F₁ та F₂ від схрещування рослин Авротіки з різними градаціями ознаки наявності/відсутності воскової осути

Комбінація схрещування	Компоненти схрещування		Гібриди	
	♀	♂	F ₁	F ₂
Авротіка 1 х Авротіка 2)	Зелений	блакитний	зелений	36 зелених, 28 блакитних
Авротіка 1 х Авротіка 1	зелено-блакитний	Зелений	зелений	16 зелених
Авротіка 1 х Авротіка 1	Зелений	блакитний	блакитний	32 блакитних
Авротіка 2 х Авротіка 1	блакитний	Зелений	зелений	36 блакитних, 23 зелених
Авротіка 2 х Авротіка 1	блакитний	Зелений	зелений	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-блакитних, 38 блакитних

В ході проведення генетичного аналізу амфідиплоїдів Авротіка було запропоновано наступні гаплотипи: Авротіка 1 (зелено-блакитна) — *iw3W1iw1iw2(T)Iw3(T)*, Авротіка 1 (зелена) — *iw3W1iw1Iw2(T)Iw3(T)*, Авротіка 2 (блакитна) — *iw3W1iw1iw2(T)iw3(T)*, Авротіка 2 (зелено-блакитна) — *iw3W1iw1iw2(T) Iw3(T)*, Авротіка 2 (зелена) — *iw3W1iw1iw2(T)iw3(T)*.

Результати гібридологічного аналізу показали, що зелено-блакитний фенотип, гіпостатичний до дії гена *Iw2(T)*, має утворюватися внаслідок 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 серед зелених достатньо однієї мутації (*Iw2(T)→iw2(T)*) з наступним самозапиленням мутанта. У популяції зеленої Авротіки 2 можуть з'являтися блакитні рослини, що є результатом 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)iw2(T) Iw3(T)iw3(T)*. Отже, різниця між контрастними за ознакою інтересу формами Авротіки – в одному гені для зеленої та зелено-блакитної Авротіки 1, одному гені для зеленої та

зелено-блакитної Авротіки 2, одному гені для зелено-блакитної та блакитної Авротіки та двох генах для зеленої і блакитної Авротіки. Статистично доведено, що немає розбіжностей між емпіричним співвідношенням обсягів фенотипних класів та теоретично очікуваним на підставі запропонованих генотипів. Проте, у всіх комбінаціях схрещування, на всіх етапах оцінки розщеплення, кількість блакитних рослин завжди більша очікуваної, а кількість рослин з домінантним фенотипом – менша (табл. 4). Це можна вважати наслідком певної молекулярної події, яка позбавляє ефективності домінантні алелі ортологічної серії *Iw*.

Таблиця 4

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

Комбінація схрещування та фенотипи	Співвідношення між фенотипними класами серед рослин, які:		
	Оцінено на стадії колосіння	Зібрано зрілих	Дали початок популяціям F ₃ та були джерелом ДНК
Авротіка 1(зел-блак) х Авротіка 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)
Авротіка 1(зел) х Авротіка 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)
Авротіка 1(зел) х Авротіка 2(блак)	Т: 50(зел)+13(зел-блак)+4(блак) Е: 56(зел)+6(зел-блак)+5(блак)		
Авротіка 2(зел-блак) х Авротіка 2(блак)	Т: 17(зел-блак)+5(блак) Е: 15(зел-блак)+7(блак)		
Авротіка 2(блак) х Авротіка 2(зел-блак)	Т: 32(зел-блак)+10(блак) Е: 29(зел-блак)+13(блак)		

Було проведено мікросателітний аналіз популяції F₂ отриманої від схрещування Авротіка 1(зелена) х Авротіка 2(блакитна), яка розщеплюється за генами *Iw2(T)* та *Iw3(T)*. Із 9 перевірених локусів, специфічних для хромосоми 2В, продукт ампліфікації був отриманий для 8, а поліморфними для контрастних батьківських форм виявилися локуси *Xgwm429* та *Xbarc167*. Із 18 локусів, специфічних до хромосоми 2Т поліморфними виявилися три локуси, *Xbarc142*,

Xgwm102 та *Xgwm702*. Перевірка кожного з п'яти поліморфних локусів на відповідність моногенному розщепленню серед рослин F_2 гібридів зеленого та блакитного морфотипів Авротіки 1 показала, що всі п'ять поліморфних SSR-локусів є селективно нейтральними та можуть бути використані для перевірки їхнього зчеплення з ознакою інтересу (табл. 5).

Таблиця 5

Розщеплення за алелями мікросателітних локусів у популяції (Авротіка 1 зелена x Авротіка 2 блакитна) F_2

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(a), 206(b)	5	18	10	1,79 P>0,05
<i>Xbarc167</i> 254(a), 260(b)	7	15	11	1,24 P>0,05
<i>Xbarc142</i> 272(a), 268(b)	7	15	11	1,24 P>0,05
<i>Xgwm102</i> 203(a), 195(b)	9	15	8	0,27 P>0,05
<i>Xgwm702</i> 147(a), 144(b)	9	13	11	1,73 P>0,05

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

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

Було показано, що ген *Iw2(T)* та локус *Xgwm702* не характеризуються незалежним успадкуванням і можуть бути зчепленими на хромосомі 2Т. Результати гібридологічного та мікросателітного аналізу свідчать, що причиною зміни прояву ознаки інтересу у амфідиплоїдів Авротіка є мутація домінантного алеля гена *Iw2* до рецесивного стану, що призводить до зміни експресії гена та перетворення домінантної ознаки на рецесивну.

Дослідження поліморфізму геномів контрастних морфотипів методами IRAP та REMAP. Було зроблено припущення, що зміна експресії гена через втрату домінантного стану гена *Iw2* відбувається внаслідок геномного стресу, одним з проявів якого є активність мобільних генетичних елементів. Для дослідження цієї гіпотези були застосовані методи IRAP та REMAP з використанням різних комбінацій праймерів до довгих термінальних повторів ретротранспозонів (*Nikita*, *Sabrina*, *Sukkula* та *REMAPGAn*) та мікросателітних локусів для скринування геномів штучних амфідиплоїдів Авротіка та Міоза, контрастних за ознакою воскова осуга (табл. 6).

Поліморфними виявилися спектри блакитних та зелених рослин Авротіки з парами IRAP праймерів – *Nikita/Nikita*, *Sukkula/Sukkula* та *Sabrina/Sabrina*: спектр Авротіки 1 (зелена) відрізнявся від спектру Аврори наявністю нового

компоненту, а спектр Авротіки 2 (блакитна) відрізнявся від спектру контрастної форми втратою деяких компонентів спектру (рис. 4).

Таблиця 6

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

Комбінація праймерів	T _(a)	Максимальна кількість отриманих продуктів	Варіювання розміру продуктів (bp)
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

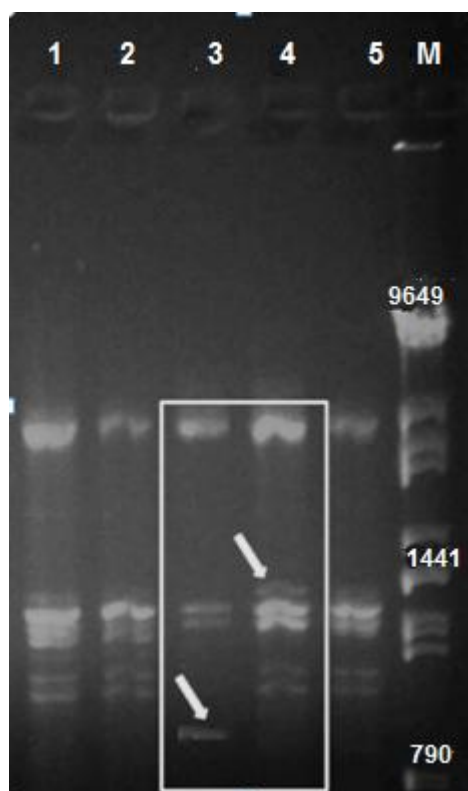


Рис. 4. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації з IRAP-праймерами *Nikita/Nikita*. М – маркер мас, 1 – Міоза блакитна, 2 – Міоза зелена, 3 – Авротіка 2 блакитна, 4 – Авротіка 1 зелена, 5 – Аврора.

При застосуванні пари *Sukkula/Sukkula* виявлялися поліморфні продукти у спектрах Міоза (зелена) та Міоза (блакитна). Це дає можливість припустити, що зміна домінантного алеля гена інтересу на рецесивний могла бути спричинена внутрішньохромосомними локальними перебудовами гібридного геному, пов'язаними з активністю ретротранспозонів *Sukkula*.

З метою виявлення перебудов у гені *Iw2(T)*, спричинених мобільними генетичними елементами у контрастних за ознакою воскова осуга рослин Авротіка 1, Авротіка 2 та ліній F₄, було застосовано модифікований нами метод REMAP. Використовували мікросателітні локуси, які за нашими даними зчеплені з геном інтересу (*Xgwm702*) або розташовані поблизу гена *Iw2(T)* (*Xbarc124* та *Xgwm102*). Ці

послідовності використовували як правий праймер, а послідовності до довгих термінальних повторів ретротранспозонів як лівий праймер. Серед перевіреної 21 комбінації праймерів, 15 давали продукти ампліфікації (табл. 7).

Таблиця 7

Комбінації REMAP праймерів і продукти ампліфікації

Комбінація праймерів	T(a)	Максимальна кількість продуктів ампліфікації	Варіювання розміру продуктів (bp)
<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

Було показано розбіжності у кількості компонентів у спектрах батьківських форм Аврори, Авротіки 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. Застосування специфічних послідовностей, що фланкують мікросателітні повтори для методу REMAP сприяло зменшенню кількості компонентів у спектрах. Спектри, отримані за участю різних REMAP-праймерів, були переважно мономорфними, окрім пари *Xgwm702F/REMAPCAn*, із якою було отримано новий компонент спектрів у гібридних ліній Авротіки з воскової осугою, що відрізняло їх від спектрів рослин без воскового шару (рис. 5).

Оскільки за нашими даними локус *Xgwm702* є зчепленим з геном *lw2(T)*, можна припустити, що наявність поліморфних продуктів, отриманих при ампліфікації із цією комбінацією праймерів, вказує на наявність перебудов, пов'язаних з активністю транспозону поблизу даного гена. Це може бути причиною зміни експресії гена *lw2(T)* від домінантного стану до рецесивного, в результаті на рослинах з'являється воскова осуга.

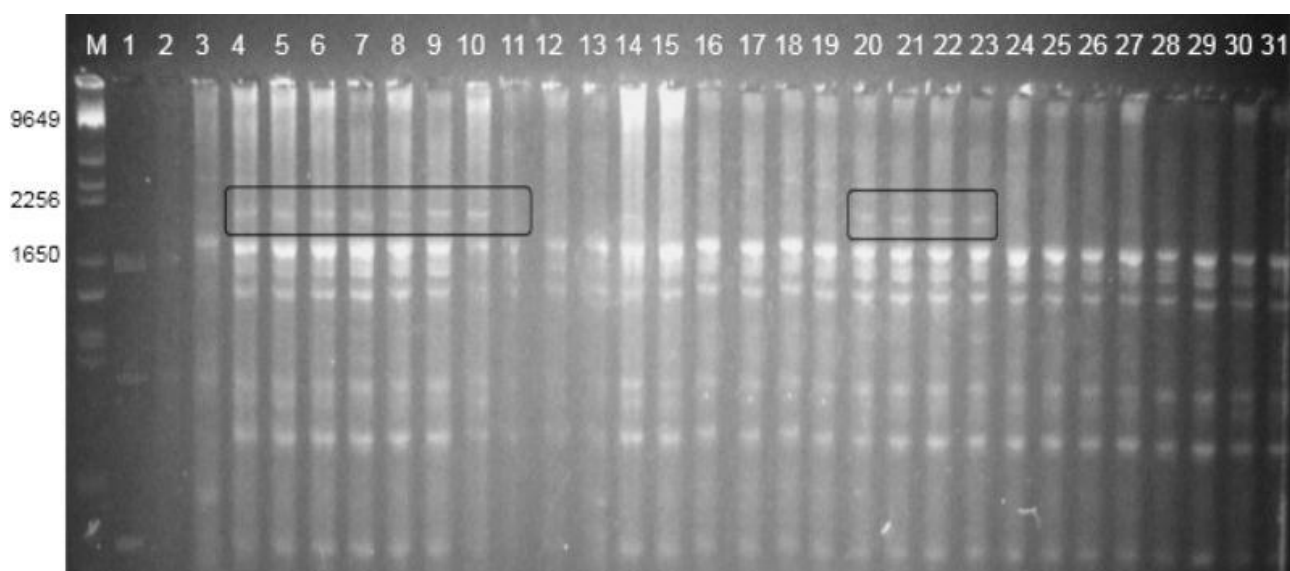


Рис. 5. Поліморфні продукти ампліфікації у REMAP-спектрах комбінації праймерів *Xgwm702F/REMAPCAп*. М – маркер мас, 1 – Авротіка 2 блакитна; 2 – Авротіка 1 зелена; 3 – Аврора; 4, 5, 6, 7 – F4 (блакитні); 8, 9, 10, 11, – F4 (блакитні); 12, 13, 14, 15 – F4 (зелені); 16, 17, 18, 19 – F4 (зелені); 20, 21,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

Враховуючи отримані результати та зважаючи на попередні дослідження можна припустити, що однією з причин зміни прояву ознаки наявності/відсутності 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/REMAPCAп* 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 втрату його інгібуючої функції та появу рослин, поверхня листків і колосу яких вкрита восковою осугою.

ВИСНОВКИ

Вивчення нестабільності геномів гібридного походження складає наразі найбільш актуальну галузь досліджень з генетики рослин, оскільки 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 розв'язок згаданої проблеми, тому що в ньому запропоновано та апробовано зручну модель вивчення внутрішньогеномної зміни у гібридному геномі, яка морфологічно виявляється як зміна прояву ознаки наявності/відсутності воскової осуги на 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 2Т *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 F₂ 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 Міоза 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 самої 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* → *iw2*, яке є причиною перманентної зміни ознаки з домінантної на рецесивну, дійсно відбувається як наслідок руху ретротранспозонів в геномі.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ 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 написання 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 Glauconsness 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, написання 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).*

АНОТАЦІЯ

Шпильчин В.В. Зміна експресії гена W^I у поколіннях амфідиплоїдів Triticinae. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика. – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН 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.

Особливості успадкування ознаки вивчалися на геномно-заміщених амфідиплоїдах Авродес (AABBSS), Аврозис (AABBS^{sh}S^{sh}), Авролата (AABBUU) та Авротіка (AABBTТ) та геномно-доданих амфідиплоїдах Міоза (AABVMM) та МІТ (AABVDD). Відомо, що наявність воскової осуги є рецесивною ознакою. Однак в F₁ від схрещування контрастних батьківських форм майже всі рослини мали воскову осугу або демонстрували третій фенотип – зелений колос, листя вкриті восковою осугою. Враховуючі схему походження рослинного матеріалу, причиною цього слід вважати певну зміну в геномі, що відбувається до утворення рослиною гамет, а також те, що рослини з домінантним фенотипом можуть бути гетерозиготами за домінантним алелем.

Рослинний матеріал був проаналізований за деякими білками, що контролюються генами відомої хромосомної локалізації. Білкові 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. Для проведення генетичного аналізу Авротіки були запропоновані гаплотипи за генами інтересу. Мікросателітний аналіз був проведений з застосуванням праймерів до мікросателітних локусів, специфічних до 2D та 2В хромосом з метою зрозуміти, у якій з вказаних хромосом змінюється експресія гена серії *Iw* в штучних гексаплоїдах, в результаті якої відбувається зміна домінантного фенотипу рослин (зелений) на рецесивний (блакитні). Для контрастних форм Авротіки і геномно-доданого амфідиплоїда Міоза було показано поліморфізм за мікросателітними локусами, локалізованими як на короткому плечі 2D хромосоми, так і на обох плечах хромосоми 2В. Популяція, що розщеплюється за ознакою інтересу [Авротіка 1(зелена) x Авротіка 2(блакитна)]F₂, була піддана мікросателітному аналізу з застосуванням праймерів до коротких плечей 2В та 2D хромосом. Для локуса *Xgwm702* була показана відсутність незалежного успадкування щодо гена *Iw2(T)*. Був проведений аналіз 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* ампліфікувала поліморфні продукти з ДНК контрастних морфотипів Міози. Для контрастних форм Авротіки був встановлений поліморфізм за модифікованим методом REMAP, що вказує на наявність перебудов, пов'язаних з активністю мобільних генетичних елементів поблизу гена *Iw2(T)*, що може бути причиною втрати домінантного стану даного гена.

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

АННОТАЦИЯ

Шпильчин В.В. Изменение экспрессии гена W^I в поколениях амфидиплоидов *Triticinae*. - Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.15 – генетика. – Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 2018.

Диссертационное исследование посвящено выявлению причины перманентного изменения проявления признака наличие/отсутствие воскового налета в пшеничных амфидиплоидах, интрогрессивных линиях и полученных от них гибридах.

Особенности наследования признака изучались на геномно-замещенных амфидиплоидах Авродес (AABBSS), Аврозис (AABBS^{sh}S^{sh}), Авролата (AABBUU) и Авротика (AABBTT) и геномно-добавленных амфидиплоидах Миоза (AABVMM) и МИТ^D (AABVDD). Наличие воскового налета является рецессивным признаком. Однако в F₁ от скрещивания контрастных родительских форм почти все растения имели восковой налет или характеризовались третьим фенотипом – колос зеленый, листья покрыты восковым налетом. Учитывая схему происхождения растительного материала, причиной этого следует считать изменения в геноме до момента формирования растением гамет, а также то, что растения с доминантным фенотипом могут быть гетерозиготами по доминантному аллелю.

Растительный материал был проанализирован по некоторым белкам, которые контролируются генами известной хромосомной локализации. Белковые спектры контрастных по признаку интереса растений оказались мономорфными для глютеенинов, альфа-амилазы, бета-амилазы и глиадинов. Исключением стали контрастные образцы Авротики, для которых полиморфными оказались глиадины ω-зоны. Для проведения генетического анализа Авротики были предложены гаплотипы по генам интереса. Был проведен микросателлитный анализ с использованием праймеров микросателлитных локусов, специфичных для хромосом 2D и 2B с целью понять, в какой из указанных хромосом изменяется экспрессия гена серии Iw в искусственных гексаплоидах, в результате которой происходит изменение доминантного фенотипа растений (зеленый) на рецессивный (голубой). Для контрастных форм Авротики и геномно-добавленного амфидиплоида Миоза показан полиморфизм для микросателлитных локусов, локализованных как на коротком плече хромосомы 2D так и на обоих плечах хромосомы 2B. Популяция, которая расщепляется по признаку интереса [Авротика 1 (зеленая) х Авротика 2 (голубая)] F₂ была подвергнута микросателлитному анализу с применением праймеров к коротким плечам хромосом 2B и 2D. Для локуса *Xgwm702* было показано отсутствие независимого наследования с геном $Iw2$ (*T*). Был проведен анализ с помощью маркерных систем IRAP и REMAP. С IRAP-праймерами пары *Nikita/Nikita* были получены полиморфные продукты для образцов Авротика 1 без воскового налета и Авротика 2 с восковым налетом. Пара *Sukkula/Sukkula*

амплифицировала полиморфные продукты с ДНК контрастных морфотипов Миозы. Для контрастных форм Авротики был показан полиморфизм с использованием модифицированного метода REMAP, что указывает на наличие перестроек, связанных с активностью мобильных генетических элементов вблизи гена *Iw2(T)*, которая может быть причиной потери доминантного состояния данного гена.

Ключевые слова: восковой налет, геномно-замещенные амфидиплоиды, геномно-добавленные амфидиплоиды, микростателлитные локусы, IRAP, REMAP, изменчивость.

SUMMARY

V.V. Shpylchyn. Changes in expression of the gene *Wⁱ* 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 variability of the trait is observed among artificial genome substituted, genome added hexaploids, and introgressive lines. Variability in its essence is illegitimate, as it was found among the populations of theoretically homozygous plants, permanent, because glaucous plants unexpectedly appeared constantly in each subsequent generation and irreversibly, since plants with a changed phenotype in subsequent generations never returned to the original phenotype. Unexpected variability of this trait is the result of processes occurring in natural and artificial amphidiploids during the formation of their genomes.

The inheritance of the trait was studied on the genome substituted lines Aurodes (AABBSS), Aurosis (AABBS^{sh}S^{sh}), Aurolata (AABB^{uu}) and Aurotica (AABBTT) and genome added amphidiploids Miosa (AABBMM) and MIT (AABBDD). Although the glaucousness is a recessive trait, in the F₁ from contrast parent phenotypes crossing, almost all plants were glaucous or had non-glaucous spike and glaucous leaves. Taking in account the origin of the plant material, we consider that the reason for this may lie in certain changes that occur in the plant genome before gametogenesis. Moreover, it should be noted that plants with a dominant phenotype can be heterozygous for dominant allele.

Plant material was analyzed with protein-based molecular markers that have known chromosome location. Protein 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. A microsatellite analysis with primers to SSR loci specific to the 2D chromosome was performed to determine changes in the expression of the gene located the 2nd homeologous group chromosomes from the 3rd subgenome of the

corresponding artificial hexaploids. The amplification products in denaturing conditions were identified for introgressive lines for three SSR loci: *Xcfd51*, *Xcfd56*, and *Xbarc159*. The microsatellite analysis of glaucous and non-glaucous Aurotica plants and genome added amphidiploid Miosa showed polymorphism for loci located on the short arm of chromosome 2D and for the loci on the short and the long arms of chromosome 2B respectively.

For the genetic analysis of amphidiploid Aurotica 5 contrast on glaucousness trait samples were used: Aurotica 1 (non-glaucous), Aurotica 1 (intermediate phenotype), Aurotica 2 (non-glaucous), Aurotica 2 (intermediate 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 W1 iw1 Iw2 (T) Iw3 (T)*, an intermediate form that differs from the initial one for one gene – *iw3 W1 iw1 iw2 (T) Iw3 (T)*, a haplotype of the glaucous form – *iw3 W1 iw1 iw2 (T) iw3 (T)* differs from the initial haplotype by two genes.

Segregating 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. 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 variant of REMAP method was used when one of the primers was a specific microsatellite locus. Almost all combinations produced monomeric products, except for the combination *Xgwm702F/REMAPCAn*. Amplification with this pair of primers produced an additional component in an electrophoretic spectrum of DNA of glaucous hybrid lines. According to our data, the *Xgwm702* locus is linked to the *Iw2(T)* gene and amplification of polymorphic products with the primer to LTR of retrotransposon indicates alterations 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.

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