



Максим Зіновійович Антонюк, к.б.н., доцент кафедри біології, керівник Лабораторії генетики та клітинної біології Національного університету «Києво-Могилянська академія»

З В І Т

за проектом дослідницьких грантів для науково-педагогічних працівників НаУКМА від Благодійного Фонду «ПОВІР У СЕБЕ»

Тема: «Молекулярно-генетичний поліморфізм *Triticum turgidum* та озимих сортів Пшениці м'якої (*Triticum aestivum*), залучених до інтрогресивної гібридизації з нею».

Термін виконання проекту: 2018 р.

Пшениця м'яка (*Triticum aestivum* L.) є основним сільськогосподарським видом, що культивується у помірних широтах та другим за своїм значенням щодо одержуваних з неї калорій для харчування людини. Як і інші рослини, що культивуються, пшениця вражається великою кількістю шкідників та хвороб, що призводить до значної втрати її урожайності. До небезпечних та широко розповсюджених захворювань пшениці належать стеблова (збудник *Puccinia graminis* Pers. f. sp. tritici Eriks. and E.Henn. tritici), листовка (*Puccinia triticina* Eriks) іржі, борошниста роса (*Blumeria graminis* (DC) Speer (Syn. *Erysiphe graminis* DC) f. sp. tritici), фузаріоз зерна (збудник *Fusarium graminearum*). За різних ґрунтово-кліматичних умов вирощування та

накопичування шкочинних рас збудника втрати врожайності через вказані хвороби оцінюються як 5-30% і можуть сягати в роки епіфітотій 50%. Шлях захисту від вказаних хвороб лежить у забезпеченні генетичної стійкості сортів пшениці до патогенів. Ефективність надійних протягом багатьох років та широко розповсюджених генів стійкості може втратитися раптово та незворотно. Фузаріоз, крім свого впливу на пшеничну рослину, має значення і для одержання сільськогосподарської продукції належної якості. Ідентифіковано багато генів, які забезпечують стійкість до вказаних збудників: понад 50 *Sr*-генів стійкості до стеблової іржі, 67 *Lr*-генів стійкості до листової іржі, 62 *Pm*-генів стійкості до борошнистої роси. Ці гени були ефективними у різні проміжки часу у залежності від наявних рас збудника. Джерелом нових генів стійкості можуть бути як сорти м'якої пшениці та її місцеві зразки, так і генофонд інших видів та родів *Triticinae*: тетраплоїдні види пшениці з геномами A, B, G, види *Aegilops* різного рівня плоїдності з геномами D S, S^l, S^{sh}, U, T, C, *Thinopyrum*, *Elytrigia*. На сьогодні у генофонд м'якої пшениці перенесено 27 генів *Sr*, 35 генів *Lr* та 35 генів *Pm* чужинного походження, причому серед нових генів, ідентифікованих в останні роки, такі гени переважають. Передача чужинних генів до геному пшениці є складною справою, і серед методів, що їх зараз використовують для зміни геному пшениць і злаків загалом домінують методи хромосомної інженерії. Основний недолік методів хромосомної інженерії полягає в тому, що потрібний ген потрапляє до геному інтрогресивної пшеничної лінії у складі цілої чужинної хромосоми чи великої транслокації, часто негенологічної, на пшеничну хромосому, яка часто включає ціле плече. Тому до геному пшениці крім цільового гена потрапляє деякий обсяг чужинного хроматину, і це призводить до формування ознак, які погіршують цінність такої лінії для селекціонерів пшениці. Пшениця Мігушової (*Triticum miguschovae* Zhir.), штучний амфідиплоїд тетраплоїдного виду *T. militinae* (AbAbGG) та диплоїда *Aegilops tauschii* (DD), є стійкою до фузаріозу пшениці – одного з небезпечних та поширених її за-хворювань, що спричиняється грибами роду

Fusarium [2]. Фузаріоз не лише зменшує урожай, а й робить його непридатним для вживання людиною та тваринами через накопичення у зерні токсинів. Ці токсини, зокрема зеарален та ніваленоли, мають виражену нейро та ендокринно токсичну дію. Стійких до фузаріозу сортів пшениці поки немає. Генетична стійкість виявлена серед видів з геномами, близькоспорідненими із пшеничними субгеномами, це *T. militinae*, *T. timopheevii*, *T. miguschovae* (суб-геном G) та *T. macha*, *Ae. taushii*, *T. miguschovae* (субгеном D).

Раніше нами було виявлено, що схрещування між м'якою пшеницею та пшеницею Мігушової конгруентне, призводить до формування фертильних гібридів та ліній, стійких до борошнистої роси, та із підвищенням вмісту білка у зерні. Доведено, що *T. miguschovae* має генетичну стійкість до фузаріозу і тому може бути джерелом відповідних генів для їхнього перенесення до генетичного пулу сортів пшениці м'якої канадського походження. Як реципієнти інтрогресій від пшениці Мігушової нами обрано сорти української селекції. Інтрогресія може полягати у заміщенні хромосом пшениці м'якої на хромосоми A^b, G чи D видів *T. militinae* та *Ae. tauschii* і формуванні рекомбінантних чи транслокованих хромосом із залученням хроматину згаданих геномів та субгеномів пшениці м'якої. **Першим етапом роботи має стати дослідження поліморфізму між гексаплоїдами *T. aestivum* та *T. migushovae* за генами, відома локалізація яких буде вказувати на належність інтрогресії до певної групи з семи гомеологічних груп хромосом *Triticinae*.** Виконували порівняльний аналіз *T. migushovae* та сортів *T. aestivum*, залучених до схрещування з метою створення інтрогресивних ліній за електрофоретичними спектрами запасних білків, ферментів, які кодуються генами відомої хромосомної локалізації, а також низки хромосоми-специфічних мікросателітних локусів. Дослідження включало скринування геномної ДНК кількох озимих сортів Пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L) та Пшениці Мігушової (*Triticum miguschovae* Zhir) для ідентифікації молекулярно-генетичних маркерів, специфічних до хромосом

певних гомеологічних груп пшеницевих та поліморфних щодо алельної різноманітності у межах геному Пшениці Мігушової з одного боку та сортів Пшениці м'якої – з іншого. Ідентифікація таких поліморфних маркерних систем відкриває можливість вивчення структури геномів інтрогресивних ліній *Triticum aestivum* / *Triticum miguschovae*, які планується створити на основі гібридів F₁ між вказаними видами пшениці. **Актуальність дослідження полягатиме не лише в ідентифікації потенційних маркерів чужинних включень до геному Пшениці м'якої, але і, у подальшій перспективі, виділенні таких молекулярно-генетичних маркерних систем, які демонструватимуть неканонічне успадкування вже у гібридах F₁ та стануть, отже, кандидатами на вивчення як сайтів геномних перебудов, які супроводжують процес гібридизації.**

Рослинним матеріалом були сухі зернівки та 1–3-денні паростки пшениці Мігушової і сортів пшениці м'якої Одеська 267, Панна, Вдала та Лелека селекції Селекційно-генетичного інституту НААН. Виділення, електрофоретичне розділення у поліакриламідному гелі та аналіз спектрів виконано відповідно до модифікованих нами раніше методик роботи з білками пшениці м'якої: гліадинами, високомолекулярними глютенінами, альфа-амілазою та бета-амілазою, пероксидазою, листковою та зерново естеразами, кислотою фосфатазою. ДНК виділяли за модифікованим СТАВ-методом; проводили ПЛР ДНК ліній із праймерами до мікросателітних локусів (SSRs); проводили ДНК електрофорез продуктів ампліфікацій у 6% ПААГ у денатуруючому середовищі (6М сечовини) та електрофорез продуктів ампліфікацій у 2% агарозному гелі. ДНК виділяли із листків рослин ліній пшениці. Методом ПЛР було проведено ампліфікацію ДНК досліджуваних ліній рослин за праймерами, розробленими до мікросателітних локусів на 1D, 2D, 3D, 4D, 5D, 6D та 7D хромосомах м'якої пшениці за допомогою об'єднаної мікросателітної карти.

Лінії було вивчено із застосуванням наступних мікросателітних локусів:

- на 1D хромосомі: *Xgwm33-1DS*, *Xcfd192-1DS*, *Xgwm106-1DS*;
- на 2D хромосомі: *Xcfd56-2DS*, *Xcfd43-2DS*, *Xcfd17-2DL*,
Xcfd161-2DL;
- на 3D хромосомі: *Xcfd9*, *Xcfd34*, *Xcfd55*, *Xcfd64*, *Xcfd141*, *Xcfd152*,
Xcfd201, *Xcfd211*, *Xcfd223*, *Xwmc552*, *Xgdm72*;
- на 4D хромосомі: *Xwmc285-4DS*, *Xwmc89-4DS*, *Xcfd106-4DS*,
Xwmc399-4DL, *Xwmc84-4DL*;
- на 5D хромосомі: *Xcfd18-5DS*, *Xgwm190-5DS*, *Xcfd189-5DS*,
Xbarc143-5DS, *Xcfd8-5DL*, *Xwmc434-5DL*, *Xcfd86-5DL*, *Xwmc443-5DL*;
- на 6D хромосомі: *Xbarc173*, *Xcfd42*, *Xcfd132*, *Xbarc196*, *Xcfd287*,
Xcfd95, *Xcfd60*, *Xbarc96*;
- на 7D хромосомі: *Xwmc506*, *Xcfd41*, *Xbarc154*, *Xgwm44*, *Xbarc172*,
Xbarc111, *Xbarc53*, *Xcfd69*.

Результати:

Було отримано та піддано порівняльному аналізу електрофоретичні спектри названих білків. Було ідентифіковано компоненти спектрів, які можуть слугувати маркерами щодо наявності хромосом пшениці Мігушової у геномах інтрогресивних ліній, створення яких започатковано з використанням чотирьох сортів пшениці м'якої. Всебічне вивчення гліадинових спектрів пшениці дає змогу стверджувати, що компоненти верхньої частини омега-зони контролюються генами *Gli-D1* (хромосома 1DS), середньої та нижньої частини тієї самої – генами *Gli-B1* (1BS), компоненти альфа-зони контролюються переважно генами *Gli-A2* (6AS), а бета- і гама-зони представлені продуктами експресії генів *Gli-B2* (6BS) та *Gli-D2* (6DS). Порівняння спектрів пшениці Мігушової зі спектрами вивчених сортів пшениці м'якої дає не так багато, як для генів двох три-плікованих груп зчеплення, маркерних елементів. За схрещування з сортом Лелека поява у спектрах інтрогресивних ліній четвертого зверху компонента в ω зоні може вказати на наявність у геномі інтрогресивної лінії хромосоми 1D пшениці

Мігушової. В зоні α гліадини пшениці Мігушової представлені характерним блоком компонентів, які відрізняють її спектр від спектрів усіх вивчених сортів і можуть бути застосованими для ідентифікації хромосоми 6Ab у геномах інтрогресивних нащадків. Щодо хромосоми 1G, за даними, другий та третій помічені стрілками компоненти ω зони можуть бути для неї маркерними, якщо у спектрі гліадинів реціпієнтного сорту (Вдала, Одеська 267) таких компонентів немає. Для тих самих сортів маркерним видається помічений стрілкою компонент у β зоні та характерний блок компонентів, помічений боксом, у тій самій зоні.

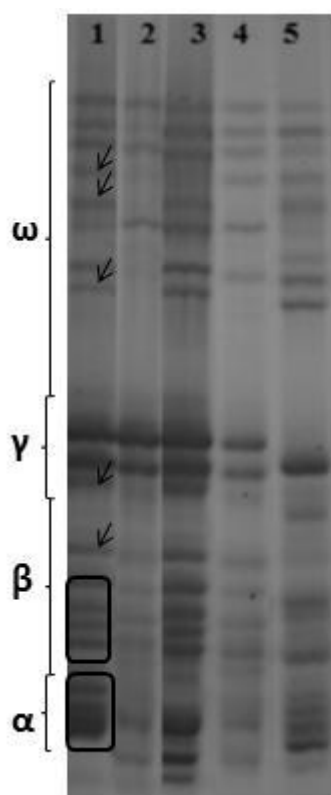


Рис. 1. Електрофретичні спектри гліадинів. Тут і на рис.2: 1 – пшениця Мігушової; 2 – сорт пшениці м'якої Вдала; 3 – Лелека; 4 – Одеська 267; 5 – Панна. Стрілками та боксами позначені компоненти спектрів, які є цікавими щодо обговорення їхньої маркерної компетентності.

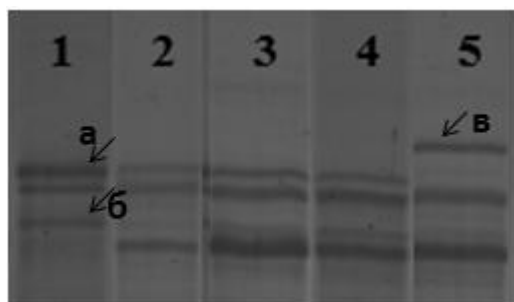


Рис. 2. Електрофоретичний спектр глютенінів

Спектр глютенінів пшениці Мігушової має лише один специфічний компонент, **б**. Його поява пов'язана з хромосомою 1G. Компонент є маркерним для усіх комбінацій схрещування з використаними сортами пшениці. Для сорту Панна інформативною є поява у спектрі інтрогресивних ліній компонента **а** за-мість компонента **в**, оскільки це може вказувати на заміщення 1A на 1Ab.

У *T. miguschovae* спектр б-амілази має компоненти **б** (*b-Amy-Ab1*), **г** (*b-Amy-D1*) та пару компонентів **д** (*b-Amy-G1*). Остання пара є маркером хромосоми 4G для заміщення хромо-соми 4D кожного з досліджених сортів. Пару компонентів **в** у спектрі завжди можна відрізни-ти від розташування пари компонентів **г**, яка притаманна деяким сортам пшениці м'якої та пшениці Мігушової і контролюється геном *b-Amy-D1*. Серед досліджених сортів такою парою компонентів характеризуються Вдала та Панна. Інші два сорти не відрізняються за геном *b-Amy-D1* від пшениці Мігушової, отже, цей фермент для хромосоми 4D для них маркерним не є. У спектрах бета-амілази інтрогресивних ліній на тлі геному Панни слід звертати увагу на відсут-ність компонента **а** (ген *b-Amy-A1*, хромосома 5A), адже у спектрі пшениці Мігушової його немає. Альфа-амілази мають часову специфіч-ність: спочатку проростання насінин активу-ються амілази, які дають на спектрі malt-зону (М), гени локалізовані у хромосомах 6-ої групи; потім – green-зону (Г), гени хромосом 7-ої групи. Незмінний триплет (Н) наявний у спектрах усіх вивчених генотипів, хромосомний контроль невідомий. Раніше нами було встановлено, що у зоні М альфа-амілази пшениця Мігушової має один

компонент (а) і він контролюється геном *a-Amy-D1* (6DL). Отже, можна ідентифікувати лінії із заміщенням 6D пшениці Мігушової для всіх досліджуваних сортів. У зоні Г верхній компонент б спектра пшениці Мігушової контролюється геном *a-Amy-D2* (7DL). Маркерним він є лише для сорту Вдала, у спектрах інших сортів він у наявності. Нижній компонент цієї зони (в) контролюється геном *a-Amy-B2* (7BL), і такого компонента немає у спектрах Вдалої та Лелеки. Отже, заміщення хромосоми 7B у цих сортах на хромосому 7G пшениці Мігушової можна ідентифікувати з використанням цього ферменту. Середнього компонента цієї зони (ген *a-Amy-A2,7AL*) немає, а серед сортів він відсутній лише у спектрі Вдалої. Для трьох інших сортів відсутність компонента можна використовувати як маркер зміни хромосоми 7A на хромосому 7Ab. Частина спектра листової естерази контролюється генами *Est-1*, локалізованими у хромо-сомах 3-ої гомеологічної групи. Спектр пшениці Мігушової відрізняється від спектрів листової естерази всіх досліджуваних сортів відсутністю компонентів у середній частині та наявністю потужного компонента з найнижчою рухливістю (а). Обидва елементи спектра є маркерними для пшениці Мігушової і можуть бути легко ідентифіковані у спектрах інтрогресивних ліній із заміщеннями хромосом 3-ої групи пшениці м'якої на хромосоми пшениці Мігушової. Маркерними для диференціювання хромосом пшениці Мігушової та хромосом сортів пшениці м'якої є 6-ий та 7-ий компоненти. Пари з такою рухливістю немає у спектрах жодного з досліджуваних сортів. У їхніх спектрах ця частина представлена одним компонентом, рухливість якого збігається, або з верхнім або з нижнім компонентом пари зі спектра естерази пшениці Мігушової, але вони добре розрізняються.

Компоненти спектра зернової пероксидази контролюються генами хромосом 3-ої (*Per-3*) та хромосоми 7A, 4B, 7D (*Per-4*) [14]. Нами було встановлено раніше, що компоненту 2 спектра пероксидази *T. miguschovae* немає аналога на відповідному спектрі м'якої пшениці, і це підтверджується використанням іншого набору сортів у нашому дослідженні. Інший

компонент спектру, 4, у пшениці Мігушової та його прабатька пшениці Мілітини (AbAbGG) у наявності замість двох компонентів (4 та 5) у всіх вивчених сортів пшениці. Ці два компоненти (2 і 4) можуть маркувати гени пероксидази, локалізовані у геномах *Ab* і *G*, хоча їхній хромосомний контроль не встановлено. Гени кислої фосфатази локалізовані на хромосомах 4-ої гомеологічної групи пшениці [14]. Спектр пшениці Мігушової має компонент **a**, відсутній у спектрах всіх сортів пшениці м'якої, і він контролюється хромосомою 4G [13]. Крім того, відсутність низки компонентів, що контролюються 4D хромосомою пшениці Мігушової, також можна використовувати для диференціації хромосоми 4D м'якої пшениці та пшениці Мігушової.

Аналіз Пшениці Мігушової та сортів пшениці на наявність поліморфізму за мікросателітними локусами, локалізованими у хромосомах різних гомеологічних груп

Було проведено скринування досліджуваних наявних генотипів за алелями мікросателітних локусів, специфічних до 1-ої, 2-ої, 3-ої, 4-ої, 5-ої, 6-ої, 7-ої хромосом D геному пшениці. Хромосомна локалізація досліджуваних мікросателітів наведена на рис.3.

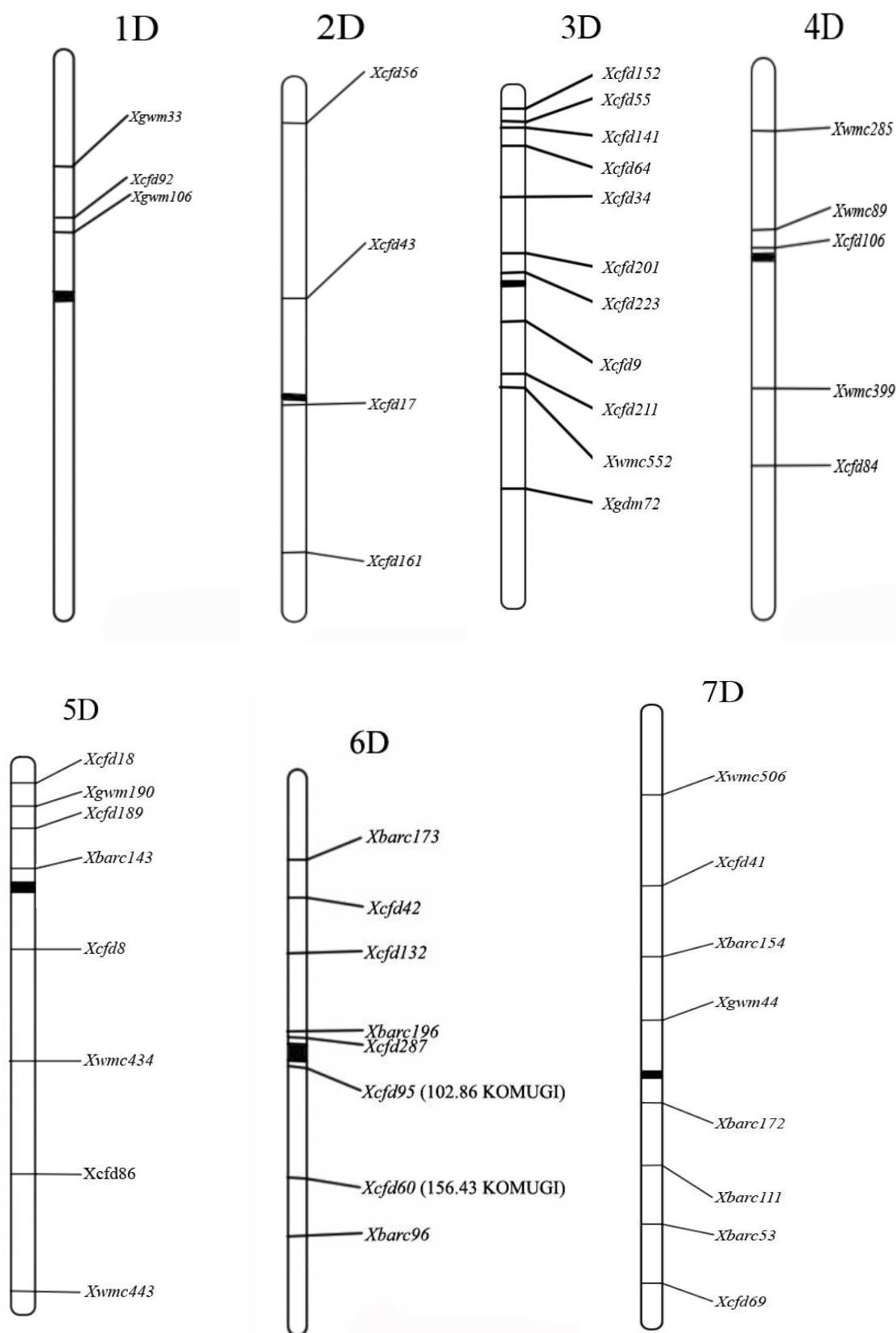


Рис.3 Хромосомна локалізація досліджених мікросателітних маркерів.

Було проаналізовано генотипи- компонти схрещування: синтетичного виду *Triticum miguschovae* Zhiron, сортів озимої пшениці м'якої *T. aestivum* L.: Лелека, Панна, Вдала, Одеська 267. за допомогою мікросателітних локусів.

На рис.4 наведено зразки спектрів, у яких виявлено компоненти спектрів, поліморфних на досліджуваному рослинному матеріалі

Це локуси: *Xcfd56-2DS*, *Xcfd152-3DS*, *Xgdm72-3DL*, *Xgwm190-5DS*, *Xcfd8-5DL*, *Xcfd60-6DL*, *Xbarc111-7DL*, *Xbarc53-7DL*. До локусів, які були виявлені у всіх амфідиплоїдів, належать усі досліджувані локуси 1-ої хромосоми (*Xgwm33*, *Xcfd92*, *Xgwm106*), 3 локуси на 2D хромосомі (*Xcfd43*, *Xcfd17*, *Xcfd161*), 2 локуси на хромосомі 3D (*Xcfd211-3DL*, *Xcfd223-3DS*), по одному локусу на 4-ій, 5-ій та 7-ій хромосомах (*Xcfd84-4DL*, *Xwmc434-5DL*, *Xgwm44-7DS*). Серед них чотири були раніше задекларовані саме як хромосомно специфічні до відповідних хромосом D геному (це локуси *Xcfd92*, *Xcfd43*, *Xcfd161*, *Xcfd84*).

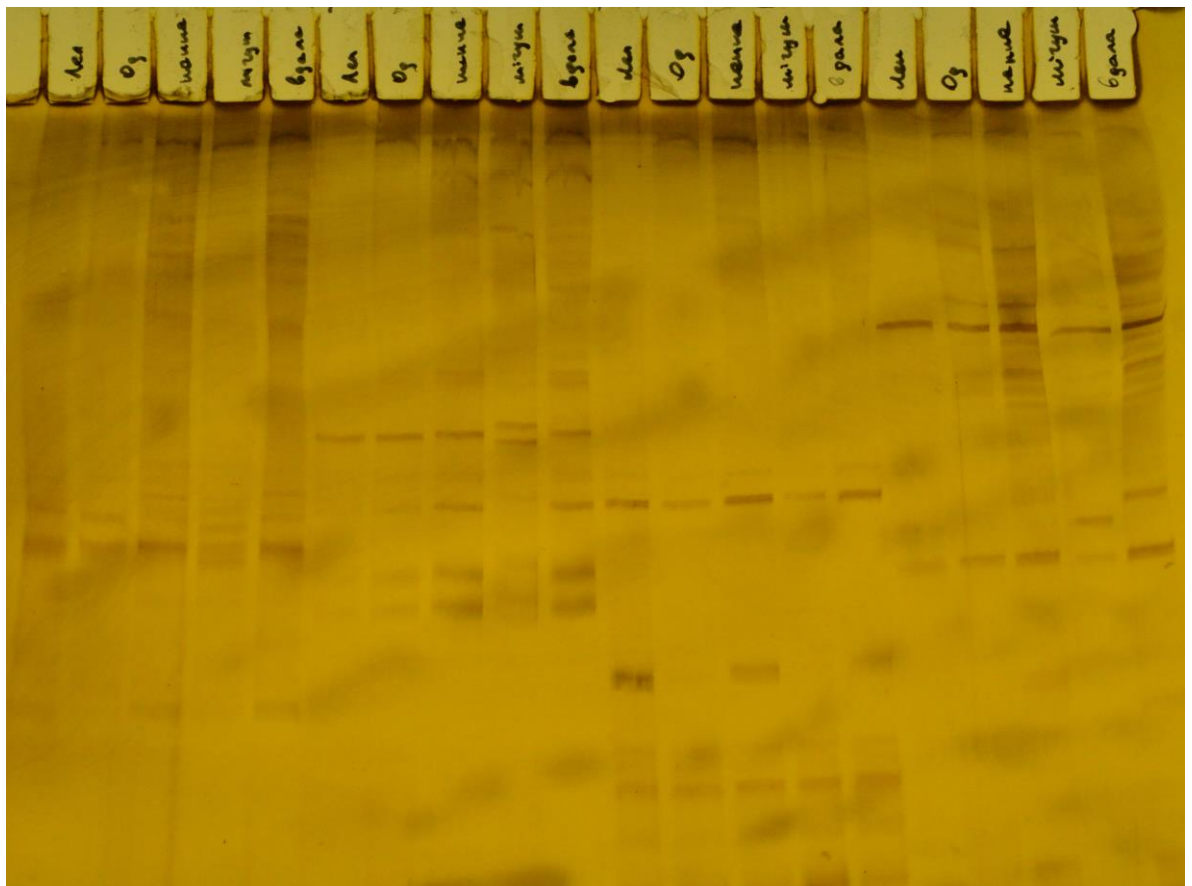


Рис.4 Приклад спектрів мікросателітів, розділені у ПААГ у денатурованих умовах.

Висновки:

Гліадинові спектри ω -зони можна використовувати для виявлення заміщення за хромосою 1D для сорту Лелека і за хромосою 1G для сортів Вдала та Одеська 267. Гліадини α -зони ефективні для ідентифікації заміщення 6Ab/6A для всіх сортів. Спектр глютенінів пшениці Мігушової має лише один специфічний компонент, пов'язаний із хромосою 1G, ефективний для всіх сортів. Для сорту Панна так можна ідентифікувати заміщення 1A на 1Ab. Спектр бета-амілази придатний для пошуку заміщень 4G/4D для всіх сортів; для деяких сортів можна ідентифікувати заміщення хромосоми 4D на гомолог пшениці Мігушової. За спектром альфа-амілази можна ідентифікувати лінії із заміщенням 6D пшениці Мігушової для всіх досліджуваних сортів. Для пошуку заміщення за хромосою 7D можна використовувати лише інтрогресивні нащадки сорту Вдала. За використання у схрещуваннях сортів Вдала та Лелека можна виявити заміщення 7B на 7G. Для всіх сортів, крім Вдалої, можна ідентифікувати заміщення 7A на 7Ab. За спектрами листової та зернової естарази спектри всіх сортів пшениці м'якої відрізняються від спектра пшениці Мігушової, і цим диференціюються хромосоми 3-ої гомеологічної групи. За спектром кислої фосфатази маркерним для пшениці Мігушової є компонент, який контролюється хромосою 4G, отже, інтрогресивні рослини з заміщенням цієї хромосоми будуть ідентифіковані. – З використанням SSR локусів низка можуть використовуватися для диференціації аналізованих генотипів пшениці. Це локуси: *Xcfd56-2DS*, *Xcfd152-3DS*, *Xgdm72-3DL*, *Xgwm190-5DS*, *Xcfd8-5DL*, *Xcfd60-6DL*, *Xbarc111-7DL*, *Xbarc53-7DL*. До локусів, які були виявлені у всіх амфідиплоїдів, належать усі досліджувані локуси 1-ої хромосоми (*Xgwm33*, *Xcfd92*, *Xgwm106*), 3 локуси на 2D хромосомі (*Xcfd43*,

Xcfd17, *Xcfd161*), 2 локуси на хромосомі 3D (*Xcfd211*-3DL, *Xcfd223*-3DS), по одному локусу на 4-ій, 5-ій та 7-ій хромосомах (*Xcfd84*-4DL, *Xwmc434*-5DL, *Xgwm44*-7DS).

За результатами проекту підготовано низку публікацій та продовжується робота з вивчення питання стійкості пшениць до грибів роду *Fusarium*. Програма стипендій "Повір у себе" сприяла оптимізації робочого часу для завершення написання докторської дисертації «Інтрогресія як індуктор мінливості геному пшениці *Triticum aestivum* L.», яку було успішно захищено у травні 2019 року.

Назва дисертації – «Інтрогресія як індуктор мінливості геному пшениці *Triticum aestivum* L.» -
http://ifbg.org.ua/sites/default/files/u93/dis_antonyuk.pdf

Шифр та назва спеціальності – 03.00.15 – генетика

Шифр спеціалізованої ради – Д 26.254.01

Назва ВНЗ, наукової установи, її відомче підпорядкування, адреса і телефон – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» (04123, м. Київ, вул. Осиповського 2А; тел. (044) 434-37-77)

Дата захисту: 29.05.2019