

УДК: 575.113:575:116+575.222.73

SSR-МАРКУВАННЯ ГЕНІВ, ЗАЛУЧЕНИХ ДО КОНТРОЛЮ ОСТИСТОСТІ В ТВЕРДОЇ ПШЕНИЦІ (*TRITICUM DURUM* DESF.)

Д.О. ПРОКОПИК, Т.К. ТЕРНОВСЬКА

Національний університет "Києво-Могилянська академія"

Україна, 04070, м. Київ, вул. Г. Сковороди, 2

e-mail: tern@ukma.kiev.ua

*Виконано генетичний аналіз остистих та безостих зразків твердої пшениці (*Triticum durum* Desf.) за ознакою остистість колосу та мікросателітними локусами, специфічними для хромосом 4A, 5A та 6B пшениці. Показано, що домінантний промотор остистості *Vp*, наявність якого у геномі остистих твердих пшениць передбачалась нами у попередньому дослідженні, розташований на хромосомі 6B, оскільки зчеплений на відстані 27,5 сМ з мікросателітним локусом *Xbarc178*, який локалізований на цій хромосомі.*

*Ключові слова: тверда пшениця, остистість, генетичний аналіз, метод *Lod scores*, мікросателіти.*

Вступ. Прийнято вважати, що ознака остистості колосу контролюється трьома генами – *Hd* (hooded, закритий капюшоном), *B1* та *B2* (tipped 1 й tipped 2, з наконечником) – розташованими на 4A, 5A і 6B хромосомах відповідно [1]. Ці гени є домінантними інгібіторами остистості, тобто повністю остиста рослина мусить бути рецесивною гомозиготою. Можливі також проміжні варіанти остистості. Зокрема, у рослини із геном *hd* ості будуть значно коротші та нахилені при основі; апікальні ості можуть бути загнутими чи закрученими, а луска сплюсненою. У гомозигот за геном *b1* (tipped 1) ості в основі та посередині колосу є дуже короткими, проте на верхівці колосу вони сягають 1 см, розташовані прямо й не закручуються. У особин із фенотипом tipped 2 (*b2*) ості не перевищують 6 мм, можуть загинатись та більше сконцентровані посередині колосу. Присутність принаймні двох домінантних генів повністю пригнічує утворення остей. Ця інформація стосується винятково м'якої пшениці, на якій проведено дослідження із генетичного аналізу щодо контролю даної ознаки та фізичного картування генів за допомогою делеційних мутантів. Усі можливі варіанти остистості зустрічаються і серед твердих пшениць, хоча безостість для них, зазвичай, не характерна. Наразі невідомо, чи ті ж інгібітори залучені до контролю остистості в твердої пшениці, що і в м'якої [2].

Незважаючи на майже столітню історію дослідження та просту, на перший погляд, систему контролю ознаки, у вивченні остистості поки не можна ставити крапку. В низці робіт наводилися дані щодо присутності не лише інгібіторів, але й промоторів остистості: Watkins та Ellorton (1940) виділили п'ять основних генів: *B1*, *b2a*, *B2*, *A*, *Hd* – серед яких *A* був промотором, *b1a* зумовлював напівостистий стан, а решта була супресорами; моносомний аналіз не лише

підтвердив такі дані, але й показав залучення інших хромосом до контролю даної ознаки. Автори припускали наявність ще й алелю *b2a*. Наприклад, Wenzel (1971) показав присутність генів, що контролюють остистість, на восьми хромосомах, серед яких 1В, 5D та 7А були показані вперше [цит. за 3]. Mokhtarzadeh [4] досліджував F_1 від схрещування моносомної серії сорту Чайніз Сприн (ЧС) із остистою твердою пшеницею. Автор постулював участь дев'яти хромосом у контролі остистості: 5А, 1В, 3В, 4В, 5В, 6В (промотори) та 2А, 6А й 2В (інгібітори). Goud [3] запропонував наявність множинних алелів, розташованих на різних хромосомах, для гена-промотора *a*. Позаяк, на сьогоднішній день, промоторні гени не входять до каталогу генів та генних символів, і посилання на згадані роботи майже не зустрічаються в сучасних статтях [1]. На 4AS хромосомі локалізовано ген *Hd*, один із генів-інгібіторів остистості. Із присутністю цього гена пов'язують розвиток остеподібних відростків [2].

Дослідження генетичного контролю остистості вказують на складні механізми пригнічення утворення остей та взаємодію генів *Hd*, *B1* та *B2*. Наприклад, анеуплоїди сорту ЧС за ділянками 5AL-10, в яких відсутній локус із геном *B1*, є частково остистими. Аналогічно, апікальні ості з'являються в делеційного мутанта за ділянкою 6BL-6, на якій розташований ген *B2*. З огляду на цитогенетичні дослідження, зараз припускають, що напівостистий стан зумовлений епістатичною взаємодією генів *B1* та *B2* та промоторних генів [1]. Sourdille та спів. [2] припустили, що ген *B1* сам не може пригнічувати утворення остей у гомозиготній за двома рецесивними генами рослини, в той час, як відсутність гена *B2* (генотип *Hd_B1_*) зводить нанівець інгібіторний ефект двох інших генів.

У статті викладено результати перевірки можливої участі генів *Hd*, *B1* та *B2* у контролі остистості колосу у твердї пшениці через дослідження розщеплення між вказаними генами, мікросателітними локусами, специфічними до хромосом 5А та 6В м'якої пшениці, та різними градаціями ознаки остистості колосу.

Матеріали і методи

Як рослинний матеріал використано генотипи твердої пшениці (*Triticum durum* Desf.) Mutiko italicum 59h132 (MI), Чорномор, Леукурум, Рубрум, Кандиканс та гібридні популяції F_3 від двох комбінацій схрещування (табл. 1). Популяції F_3 отримані методом SSD (single seed descent) [5], так що рослини F_3 у кожній популяції є сукупністю поодиноких нащадків від кожної рослини F_2 . Оцінку остистості виконували на індивідуальних зрілих рослинах за трьома градаціями: безостий колос, остистий, колос має остеподібні відростки.

ДНК виділяли із листя індивідуальних рослин із застосуванням стандартного СТАВ методу. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили у відповідності до умов, вказаних у [6–9]. З цього ж джерела брали і послідовності праймерів, що фланкують мікросателітні повтори. Електрофорез продуктів ПЛР проводили у 6 % поліакриламідному гелі з 7М сечовини. Продукти ампліфікації виявляли за допомогою нітрату срібла [10].

Результати та обговорення

З праймерами до мікросателітних локусів *Xgwm410* та *Xwmc727* продукту отримано не було. Продукт ампліфікації із праймерами до локусів *Xwmc524-5AL*, *Xwmc577-5AL*, *Xwmc110-5AL* та *Xwmc152-6B* є монорморфним, тому їх вилучено із подальшої роботи (табл. 1). Спектри продуктів ампліфікації із праймерами до локусу *Xgwm291-5AL* (рис. 1) для

генотипів MI та Чорномор представлені подвійним компонентом, а у Леукурум та Кандиканс – одинарним. Очікуваний розмір продукту ампліфікації близько 120 пн. Локус є цікавим через тісне зчеплення з геном В1 [10].

Продукти ампліфікації із праймерами до локусу *Xcfd2155-5AL* [10] (рис. 2) де-

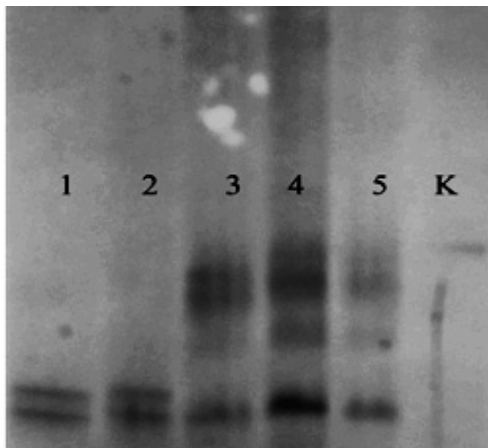


Рис. 1. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації генотипів твердї пшениці із праймерами до локусу *Xgwm291-5AL*: 1 – MI; 2 – Чорномор; 3 – Леукурум; 4 – Рубрум; 5 – Кандиканс; К – контроль (без ДНК)

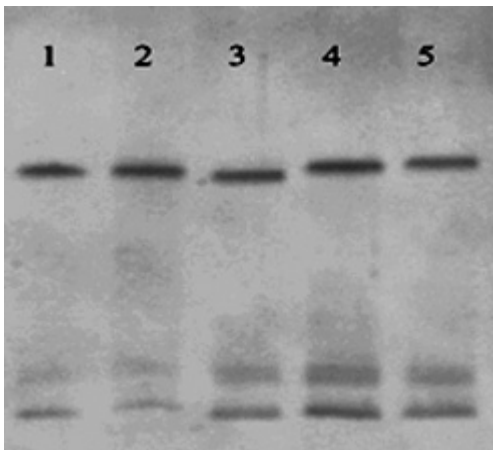


Рис. 2. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації генотипів твердї пшениці із праймерами до локусу *Xcfd2155-5AL*: 1- MI; 2 – Чорномор; 3 – Леукурум; 4 – Рубрум; 5 – Кандиканс

монструють поліморфізм лише при гарному розділенні, що вимагає ретельної роботи з ними. Усі батьківські форми, крім Леукурума, мають продукти ампліфікації однакового розміру, а Леукурум – трохи легший, тобто рухливіший в гелі.

Мікросателітний локус *Xcfd71-4AS* (рис. 3) можна використовувати в комбінаціях, де як батьківську форму залучено генотип MI, адже продукт ампліфікації із праймерами до цього локусу є дещо легшим в MI, ніж у решти генотипів. Для цього локусу вказано, що він є специфічним до 4D та 4A хромосом [10].

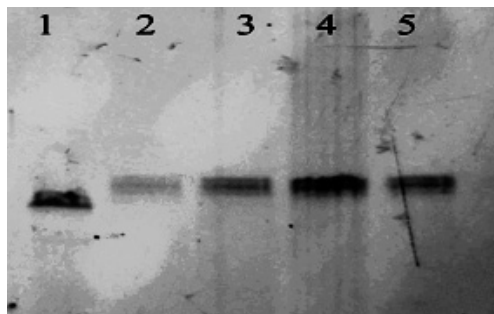


Рис. 3. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації генотипів твердї пшениці із праймерами до локусу *Xcfd71-4AS*: 1- MI; 2 – Чорномор; 3 – Леукурум; 4 – Рубрум; 5 – Кандиканс

Поліморфізм за продуктами ампліфікації з праймерами до мікросателітного локусу *Xcfa2256-4AS* (рис. 4) виявлено в комбінаціях, де як батьківську форму залучено генотип Рубрум. Притаманний йому продукт ампліфікації є легшим, ніж той же в інших генотипів. Різниця в молекулярній масі є достатньою для адекватного розрізнення компонентів. Очікуваний розмір продукту ампліфікації близько 170 пн.

ПЛР з праймерами до локусу *Xwmc516-4AS*, згідно із його характеристикою [10], дає множинні продукти. Спектр продуктів його ампліфікації для генотипів твердї пшениці виявився поліморфним (рис. 5). Очікуваний продукт має мати розмір 130-150 пн, тобто знаходиться в нижній частині спектра.

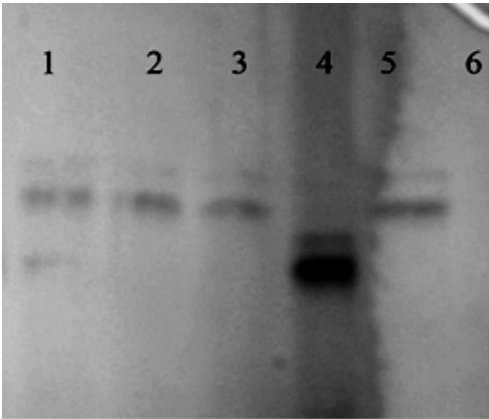


Рис. 4. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації генотипів твердої пшениці із праймерами до локусу *Xcfa2256-4AS*: 1 – MI; 2 – Чорномор; 3 – Леукурум; 4 – Рубрум; 5 – Кандиканс

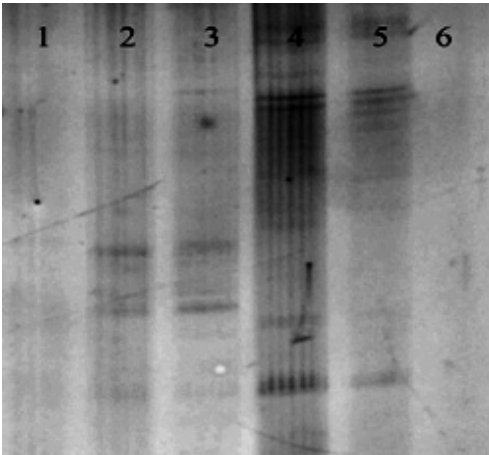


Рис. 5. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації генотипів твердої пшениці із праймерами до локусу *Xwtc516-4AS*: 1 – MI; 2 – Чорномор; 3 – Леукурум; 4 – Рубрум; 5 – Кандиканс; 6 – контроль

На 6ВL хромосомі знаходиться ген *B2*, один із інгібіторів остистості. Ми припускаємо, що в деяких із досліджених нами генотипів можуть бути присутні різні алелі цього гена [11]. Серед локусів, специфічних до 6В хромосоми, поліморфним виявився *Xgwm219-6BL*. У генотипу MI продукт ампліфікації, що утворюється із цією парою праймерів, є важчим, ніж в інших

генотипів (рис. 6). Локус *Xgwm219-6BL* можна використати для роботи із комбінаціями, в яких залучено генотип MI.

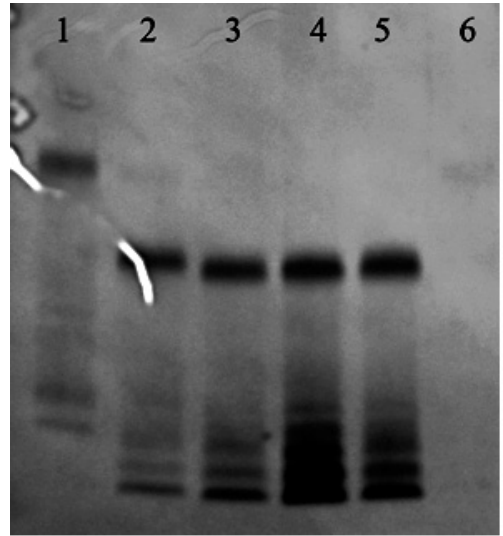


Рис. 6. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації генотипів твердої пшениці із праймерами до локусу *Xgwm219-6BL*: 1 – MI; 2 – Чорномор; 3 – Леукурум; 4 – Рубрум; 5 – Кандиканс

Із праймерами до локусу *Xwtc726-6BL* продукт ампліфікації утворюється лише в генотипу Рубрум (рис. 7). Тому напевно чи можна використовувати його для аналізу популяцій через можливість отримання хибно негативних результатів.

Із праймерами до локусу *Xbarc178-6В* продукт ампліфікації утворюється у всіх генотипів як поодинокий компонент, рухомість якого в генотипах MI, Рубрум та Леукурум є різною (рис. 8).

Результати дослідження поліморфізму за розташуванням продуктів ампліфікації у електрофоретичному спектрі для вивчених комбінацій схрещувань узагальнено у табл. 1.

Таким чином, для кожної із двох комбінацій схрещування наразі знайдено принаймні по дві пари праймерів, що фланкують мікросателітні повтори на хромосомах 4А, а також 5А або 6В. Для можливої ло-

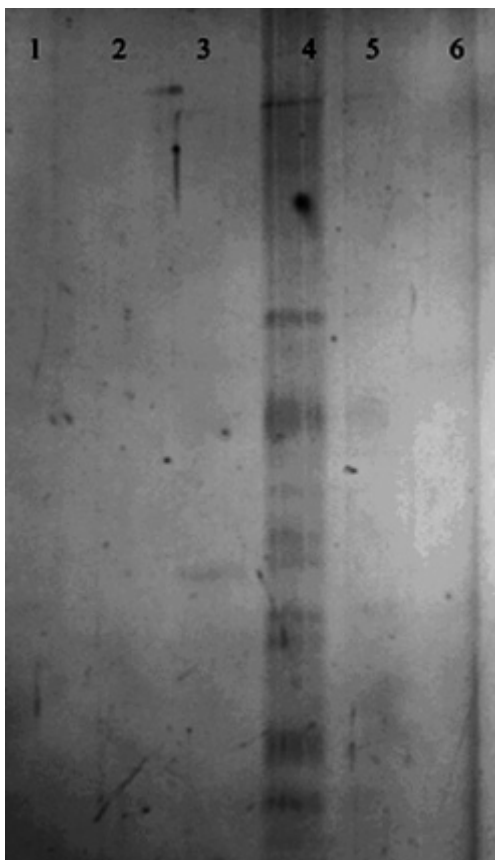


Рис. 7. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації генотипів твердій пшениці із праймерми до локусу *Xwmc726-6BL*: 1 – MI; 2 – Чорномор, 3 – Леукурум, 4 – Рубрум, 5 – Кандиканс, 6 – контроль

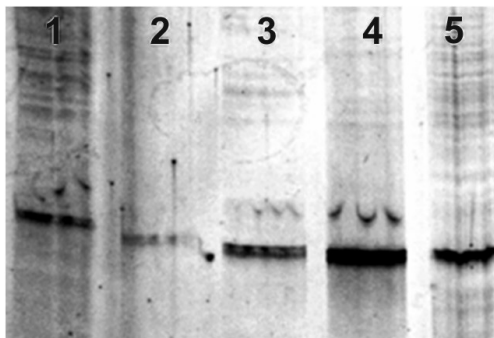


Рис. 8. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації генотипів твердій пшениці із праймерми до локусу *Xbarc178-6B*: 1 – MI; 2 – Леукурум; 3 – Чорномор; 4 – Рубрум; 5 – Кандиканс

калізації генів, що залучені у контроль остистості, слід проаналізувати популяції F_3 за маркерами до кожної із зазначених хромосом.

Для скринування розщеплення за спектрами продуктів ампліфікації можна використовувати такі мікросателітні локуси: у комбінації схрещування Рубрум x MI локуси *Xgwm291-5AL*, *Xcfd71-4AS*, *Xcfa2256-4AS*, *Xwmc516-4AS*, *Xgwm219-6BL*; у комбінації MI x Леукурум локуси *Xgwm291-5AL*, *Xcfd71-4AS*, *Xwmc516-4AS* та, можливо, *Xcfd2155-5AL*.

SSR-локуси є кодомінантними молекулярними маркерами, отже розщеплення у F_2 за кожною парою праймерів очікується $1_{\text{гомо1}} : 2_{\text{гетеро}} : 1_{\text{гомо2}}$. Проте ми працювали з ДНК рослин F_3 , отриманих як поодинокі нащадки від кожної з рослин F_2 . Оскільки по одній насінині було взято від кожної рослини F_2 випадково, а тверда пшениця є самозапилювачем, очікуване співвідношення у F_3 становить $3_{\text{гомо1}} : 2_{\text{гетеро}} : 3_{\text{гомо2}}$ [12]. Це впливає із співвідношення $4 \times (1_{\text{гомо1}} + 2 \times 1_{\text{гомо1}} : 4_{\text{гетеро}} : 2 \times 1_{\text{гомо2}}) + 2 \times (1_{\text{гомо2}} + 4_{\text{гомо2}})$, якщо кожна рослина F_2 дасть чотири насінини, мінімально необхідну кількість нащадків для реалізації всіх можливих генотипів у правильному кількісному співвідношенні при самозапиленні моногетерозиготи. Перевірка відповідності розщеплення за аелями мікросателітних локусів у F_3 розщепленню $3 : 2 : 3$ показала справедливість нульової гіпотези для всіх мікросателітних локусів (табл. 2).

За результатами попереднього гібридологічного аналізу, виконаного із застосуванням п'яти генотипів твердій пшениці [11], безостий фенотип лінії MI пояснюється наявністю у її геномі гена *B1*. Розщеплення у F_2 від схрещування генотипів MI та Рубрум, і генотипів Кандиканс та Чорномор показало, що різниця у кожній парі генотипів є моногенною. Розщеплення у F_2 від схрещування генотипів MI та Леукуру-

Таблиця 1. Наявність (+) та відсутність (–) поліморфізму в електрофоретичних спектрах, отриманих з праймерами до низки мікросателітних локусів, для компонентів схрещування двох гібридних комбінацій

| № | SSR-локус | Хромосома, де локалізований SSR-локус | Комбінація схрещування | |
|----|-----------------|---------------------------------------|------------------------|-------------------|
| | | | Рубрум x МІ | МІ x Леукурум |
| 1 | <i>Xgwm291</i> | 5AL | + | + |
| 2 | <i>Xwmc524</i> | 5AL | – | – |
| 3 | <i>Xgwm410</i> | 5AL | відсутній продукт | відсутній продукт |
| 4 | <i>Xwmc577</i> | 5AL | – | – |
| 5 | <i>Xcfd2155</i> | 5AL | – | + |
| 6 | <i>Xwmc110</i> | 5AL | – | – |
| 7 | <i>Xwmc727</i> | 5AL | відсутній продукт | відсутній продукт |
| 8 | <i>Xcfd71</i> | 4AS | + | + |
| 9 | <i>Xcfa2256</i> | 4AS | + | – |
| 10 | <i>Xwmc516</i> | 4AS | + | + |
| 11 | <i>Xwmc726</i> | 6BL | + | – |
| 12 | <i>Xwmc152</i> | 6BL | – | – |
| 13 | <i>Xgwm219</i> | 6BL | + | – |
| 14 | <i>Xbarc178</i> | 6BL | + | + |

рум свідчить про дигенну різницю між вказаними генотипами щодо генів остистості. Для вказаних зразків сортів твердої пшениці нами запропоновано такі генотипи за генами, що беруть участь у контролі остистості: лінія МІ $b_n b_n B1B1$, безоста через наявність домінантного інгібітора остистості $B1$ (хромосома 5A) та рецесивного алелю b_n домінантного промотора остистості, локалізованого за нашими припущеннями [13] у хромосомі 6B; лінія Рубрум $b_n b_n b1b1$, остеподібні відростки через відсутність домінантного промотора остистості B_n та домінантного інгібітора остистості $B1$; сорт Леукурум $B_n B_n b_1 b_1$, остистий завдяки домінантному промотору остистості B_n .

В даному дослідженні перевірено гіпотезу про моногенну різницю між зразками МІ

та Рубрум та дигенну різницю між зразками МІ та Леукурум за даними розщеплення у F_3 для співвідношення 5 безостих : 3 остеподібні відростки для першої комбінації схрещування та 15 остисті : 34 остеподібні відростки : 15 безостих — для другої (табл. 3).

У комбінації схрещування МІ x Рубрум відбувається розщеплення за геном $B1$, розташованим у хромосомі 5A та за мікросателітними локусами *Xgwm291*-5AL та *Xcfd2155*-5AL, розташованими у тій самій хромосомі. Якщо ці гени не зчеплені, усередині кожного з фенотипних класів, безості рослини та рослини з остеподібними відростками, за мікросателітними алелями буде спостерігатися розщеплення $3_{\text{гомо}1} : 2_{\text{гетеро}} : 3_{\text{гомо}2}$. У комбінації МІ x Леукурум, за нашими припущеннями [13],

Таблиця 2. Перевірка розподілу генотипів за алелями мікросателітних локусів у різних комбінаціях F_3 на відповідність теоретично очікуваному розщепленню $3_{\text{гомо1}}:2_{\text{гетеро}}:3_{\text{гомо2}}$

| Локус та комбінація схрещування | Кількість особин з генотипом | | | χ^2 | P |
|---------------------------------|------------------------------|--------|-------|----------|-------|
| | гомо1 | гетеро | гомо2 | | |
| Рубрум x MI | | | | | |
| <i>Xgwm291-5AL</i> | 19 | 6 | 12 | 3,29 | >0,05 |
| <i>Xcfd2155-5AL</i> | 28 | 27 | 29 | 2,30 | >0,05 |
| <i>Xcfd71-4AS</i> | 37 | 25 | 21 | 5,27 | >0,05 |
| <i>Xgwm219-6BL</i> | 21 | 8 | 26 | 3,81 | >0,05 |
| <i>Xbarc178-6B</i> | 33 | 26 | 27 | 1,81 | >0,05 |
| MI x Леукурум | | | | | |
| <i>Xcfd2155-5AL</i> | 24 | 30 | 32 | 5,47 | >0,05 |
| <i>Xbarc178-6B</i> | 31 | 31 | 25 | 5,80 | >0,05 |
| <i>Xcfd71-4AS</i> | 24 | 28 | 31 | 4,16 | >0,05 |

Таблиця 3. Розщеплення рослин F_3 за ознакою остистість

| Комбінація схрещування | Теоретичне співвідношення класів | Емпіричні обсяги класів у F_3 | Значення χ^2 та оцінка P |
|------------------------|--|---|-------------------------------|
| MI x Рубрум | 5 безост.:3 остепод.відр. | 83 безост.+ 33 остепод.відр | 2,08 P>0,05 |
| MI x Леукурум | 15 безост.:34 остепод.відр.:15 остист. | 43 безост.+69 остепод.відр.+ 27 остист. | 4,61 P>0,05 |

відбувається розщеплення за двома генами, один з яких може бути розташованим у хромосомі 5A, другий – у хромосомі 6B. Якщо жоден з генів остистості не зчеплений з локусом *Xcfd2155-5AL* чи *Xbarc178-6B*, у кожному фенотипному класі буде спостерігатися розщеплення за алелями мікросателітного локусу $3_{\text{гомо1}}:2_{\text{гетеро}}:3_{\text{гомо2}}$ (табл. 4).

Відхилення емпіричного співвідношення розщеплення від очікуваного спостерігали тільки у комбінації MI x Леукурум за локусом *Xbarc178*. Серед остистих рослин не було таких з алелем, специфічним для генотипу MI (безоста форма). Серед безостих рослин спостерігали нестачу рослин з алелем, специфічним для генотипу Леукурум та надлишок рослин з але-

лем, специфічним для генотипу MI. Оскільки локус *Xbarc178* розташований у хромосомі 6B, слід припустити, що домінантний промотор остистості *Bn* також локалізований у цій хромосомі та перевірити наявність зчеплення між локусом *Xbarc178* та геном *Bn*.

Для розрахунку зчеплення між вказаними локусами розробили алгоритм встановлення величини θ за даними розщеплення у F_3 за двома локусами методом максимальної правдоподібності через застосування методу Lod scores [15]. Було взято до уваги, що фенотипні класи за ознакою остистість формуються також за умов розщеплення за двома генами, так що у цілому у розщепленні брало участь три гени, два з яких, за нашим припущенням, є зчеп-

Таблиця 4. Перевірка розподілу генотипів за алелями мікросателітних локусів у різних фенотипних класах F₃ на відповідність теоретично очікуваному розщепленню 3_{гомо1}: 2_{гетеро}: 3_{гомо2}

| Локус та комбінація схрещування | Кількість особин із генотипом | | | χ ² | P |
|---------------------------------|-------------------------------|--------|-------|----------------|--------|
| | гомо1 | гетеро | гомо2 | | |
| Рубрум x M1 | | | | | |
| <i>Xgwm291-5AL</i> , безості | 14 | 4 | 7 | 3,69 | >0,05 |
| остеподібні відростки | 4 | 2 | 4 | * | =1,00 |
| <i>Xcfd2155-5AL</i> , безості | 21 | 13 | 26 | 0,91 | >0,05 |
| остеподібні відростки | 9 | 8 | 44 | 0,38 | >0,05 |
| <i>Xcfd71-4AS</i> , безості | 15 | 12 | 18 | 0,33 | >0,05 |
| остеподібні відростки | 11 | 2 | 8 | 3,25 | >0,05 |
| <i>Xgwm219-6BL</i> , безості | 12 | 5 | 17 | 2,90 | >0,05 |
| остеподібні відростки | 6 | 2 | 8 | * | =0,736 |
| <i>Xbarc178-6B</i> , безості | 27 | 18 | 15 | 4 | >0,05 |
| остеподібні відростки | 7 | 6 | 7 | 0,27 | >0,05 |
| M1 x Леукурум | | | | | |
| <i>Xcfd2155-5AL</i> , безості | 6 | 5 | 2 | * | =0,484 |
| остеподібні відростки | 16 | 15 | 17 | 1,79 | >0,05 |
| Остисті | 9 | 7 | 8 | 0,28 | >0,05 |
| <i>Xbarc178-6B</i> , безості | 2 | 6 | 13 | 7,83 | <0,05 |
| остеподібні відростки | 18 | 15 | 12 | 2,73 | >0,05 |
| Остисті | 6 | 7 | 0 | * | =0,04 |
| <i>Xcfd71-4AS</i> , безості | 5 | 3 | 3 | * | =1,00 |
| остеподібні відростки | 12 | 15 | 15 | 2,86 | >0,05 |
| Остисті | 7 | 8 | 9 | 1,11 | >0,05 |

Примітка: * – використано двобічний точний критерій Фішера [14], оскільки обсяги класів теоретичного розподілу менші за 5 не дали змогу застосувати метод χ².

леними. Загальна кількість фенотипних класів у сумісному розщепленні за алелями мікросателітного локусу та двома генами остистості – дев'ять. Тому значення $Ig(\theta)$ розраховували за формулою

$$P = \frac{N!}{n_1!n_2!n_3!n_4!n_5!n_6!n_7!n_8!n_9!} \times a^{n_1!} b^{n_2!} c^{n_3!} d^{n_4!} e^{n_5!} f^{n_6!} g^{n_7!} h^{n_8!} i^{n_9!},$$

де величини $n_1 \dots n_9$ є обсягами фенотипних класів (табл. 5), а величини $a \dots i$ – частками кожного фенотипного класу залежно від величини θ . Оскільки ми працювали з популяціями F₃, величина θ

у розрахунку величин $a \dots i$ враховувалась двічі. 1) Гібриди F₁ формують чотири типи гамет з частотами 0,5 θ для рекомбінантних та 0,5(1- θ) для нерекомбінантних. 2) Частоти гамет, які формують рослини F₂, встановлюються для кожного генотипного класу окремо з уведенням однієї і тієї самої величини θ для вираховування величини рекомбінації між досліджуваними генами. Рослини F₂ у пшениці самозапилюються, тому частоти зигот від об'єднання різних гамет, що утворюються з різною частотою, яка залежить від величини θ ,

Таблиця 5. Результати пошуку зчеплення між локусом *Xbarc178* та геном B_n у F_3 комбінації MI x Леукурум

| I | Теоретичні частоти класів при | | Генотип за мікросателітом* | Фенотип за остистістю | II | Обсяг класів | |
|---|-------------------------------|-----------------|---|-----------------------|-------|--------------|-----------------------------|
| | $\Theta = 0,5$ | $\Theta = 0,25$ | | | | Емпіричних | Теорет. при $\Theta = 0,25$ |
| a | 0,087891 | 0,01631 | CC | Безості | n_1 | 2 | 1,29 |
| b | 0,199219 | 0,227851 | CC | Остеп. відр. | n_2 | 18 | 18,00 |
| c | 0,087891 | 0,130839 | CC | Остисті | n_3 | 6 | 10,34 |
| d | 0,058594 | 0,03526 | Cc | Безості | n_4 | 6 | 2,79 |
| e | 0,132813 | 0,142146 | Cc | Остеп. відр. | n_5 | 15 | 11,23 |
| f | 0,058594 | 0,072594 | Cc | Остисті | n_6 | 7 | 5,73 |
| g | 0,087891 | 0,182804 | cc | Безості | n_7 | 13 | 14,44 |
| h | 0,199219 | 0,161253 | cc | Остеп. відр. | n_8 | 12 | 12,74 |
| i | 0,087891 | 0,030942 | cc | Остисті | n_9 | 0 | 2,44 |
| | 1 | 1 | | | | 79 | 79 |
| Z=3,43 ($p < 0,01$) при $\theta = 0,25$ | | | $\chi^2 = 7,91$ (після об'єднання класів), $p > 0,05$ | | | | |

П р и м і т к и: I – частки фенотипних класів; * – С – алель мікросателітного локусу, властивий генотипу Леукурум, с – генотипу MI; II – обсяги фенотипних класів.

розраховуються для кожного генотипного класу, і обсяги фенотипних класів у F_3 утворюються на основі частот однакових зигот, які формуються різними рослинами F_2 з різною частотою. Розрахунки закладено у алгоритмі і у статті не наводяться. Величина θ шукається у межах від 0 (повне зчеплення між генами) до 0,5 (вільне комбінування генів).

Знайдену величину рекомбінації між локусом *Xbarc178* та геном B_n $\Theta = 0,25$ за допомогою функції Козамбі перевели в одиниці карти, 27,5сМ. Отже, генотип остистого сорту твердій пшениці Леукурум у хромосомі 6В несе домінантний промотор остистості, позначений нами як B_n , оскільки ми вважаємо його алельним генів $B2$ м'якої пшениці. Зважаючи на те, що відстань між генами встановлювалась на популяції F_3 , рослини якої утворилися після двох подій мейозу, відстань між генами може виявитися дещо іншою при аналізі рослин F_2 чи аналізуючого беккросу, які формуються після проходження гібридами одного мейозу.

Висновки

Вивчення кількох генотипів твердій пшениці (*T. durum* Desf.) за ознакою утворення остей на колосі та за алелями мікросателітних локусів, розташованих на хромосомі 4A, 5A, 6B, та гібридів F_3 від двох гібридних комбінацій дало змогу підтвердити гіпотезу про моногенну та дигенну різницю між генотипами MI та Рубрум і MI та Леукурум, відповідно, щодо генів, які беруть участь у розвитку ознаки остистість колосу. Встановлено зчеплення гена $B2$ з мікросателітним локусаом *Xbarc178* на відстані 27,5 сМ.

Перелік літератури

1. Li W. L., Nelson J. C., Chu, C. Y. et al. Chromosomal locations and genetic relationships of tiller and spike characters in wheat // *Euphytica*. – 2002. – Vol. 125. – P. 357–366.
2. Sourdille P., Cadalen T., Gay G. et al. Molecular and physical mapping of genes affecting awing on wheat // *Plant Breeding*. – 2002. – Vol. 121. – P. 320–324.
3. Goud J. V., Sadananda A. R. Two new awn promoter genes in bread wheat // *Genetics*. – 1978. – Vol. 43. – P. 12–16.

4. Mokhtarzadeh A. Utilization of F_1 monosomics for genetic analyses involving awn expression, glume color, seed setting, and seed abortion in crosses of tetraploid and hexaploid wheats // *Theor. Appl. Gen.* – 1975. – Vol. 46. – P. 1–5.
5. Терновська Т.К., Вдовиченко Ж.В. Зависимость результатов генетического анализа самоопыляющихся видов злаков от природы картирующей популяции // *Цитология и генетика.* – 2003. – Т. 37. – № 3. – С. 67–79.
6. Paillard S. Schnurbusch T., Winzeler M. et al. An integrative genetic linkage map of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Gen.* – 2003. – Vol. 107, № 7. – P. 1235–1242.
7. Somers D.J., Isaac P., Edwards K. A high-density wheat microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Gen.* – 2004. – Vol. 109. – P. 1105–1114.
8. Guyomarc'h H., Sourdil P., Edwards K.J. Studies of the transferability of microsatellites derived from *Triticum tauschii* to hexaploid wheat and to diploid related species using amplification, hybridization and sequence comparisons // *Theor. Appl. Gen.* – 2002. – Vol. 105, № 5. – P. 736–744.
9. www.wheat.pw.usda.gov
10. Benbouza H., Jacquemin J.-M., Baudoin J.-P. et al. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels // *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* – 2006. – Vol. 10 – P. 77 – 81.
11. Прокопик Д.О., Терновська Т.К. Генетичний контроль остистості у твердій пшениці // Фактори експериментальної еволюції організмів. — Зб. наукових праць. — Т. 6. — Київ: Логос, 2009. — С. 216–221.
12. Гершензон С.М. Основы современной генетики. — Киев: Наукова думка, 1983. — 556 с.
13. Терновська Т.К., Антонюк М.З., Вдовиченко Ж.В. Генетичний аналіз інтрогресивних ліній м'якої пшениці за остистістю колоса // Наукові записки Тернопільського педуніверситету, серія: біологія. – 2007. – 4 (34). – С. 80–83.
14. <http://udel.edu/~mcdonald/statintro.html>. pp. 70-75 in: McDonald, J.H. 2009. Handbook of Biological Statistics (2nd ed.). Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland.
15. Dizier M., Babron M., Clerget-Darpoux F. Conclusions of LOD-score analysis for family data generated under two-locus models // *Am. J. Hum. Genet.* – 1996. – Vol. 58. – P. 1338–1346.

Представлено О.В. Дубровною.
Надійшла 15.03.2010.

SSR-МАРКИРОВАНИЕ ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В КОНТРОЛЕ ОСТИСТОСТИ У ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM DURUM* DESF.)

Д.А. Прокопик, Т.К. Терновская

Национальный университет “Киево-Могилянская академия”
Украина, 04070, г. Киев, ул. Г. Сковороды, 2
e-mail: tern@ukma.kiev.ua

Выполнен генетический анализ остистых и безостых образцов твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) по признаку остистость колоса и микросателлитным локусам, специфичным для хромосом 4A, 5A и 6B пшеницы. Показано, что доминантный промотор остистости B_n , наличие которого в геноме твердой пшеницы предполагалось нами по результатам предыдущего исследования, расположен на хромосоме 6B, поскольку оказался сцепленным на расстоянии 27,5 сМ с микросателлитным локусом *Xbarc178*, локализованным на этой хромосоме.

Ключевые слова: твердая пшеница, остистость, генетический анализ, метод Lod scores, микросателлиты.

SSR MARKER DEVELOPMENT FOR THE GENES, CONTROLLING AWNEDNESS IN DURUM WHEAT (*TRITICUM DURUM* DESF.)

D.A. Prokopyk, T.K. Ternovskaya

National University of “Kyiv-Mohyla Academy”
Ukraine, 04070, Kiev, G. Skovoroda st., 2
e-mail: tern@ukma.kiev.ua

The genetic analysis of awned and awnless durum wheat (*Triticum durum* Desf.) genotypes after the traits awned spike and microsatellite loci, specific to 4A, 5A, and 6B chromosomes, was performed. It has been shown that dominant awn promoter B_n , which presence in awned durum wheat genotypes has been supposed in our previous studies, is located on 6B chromosome because it is linked with microsatellite locus *Xbarc178*, located on this chromosome, at a distance 27,5 cM.

Key words: durum wheat, awnedness, genetic analysis, Lod scores method, microsatellites.