АНТОНЮК М.З., ШТЕФЮК Т.В., ТЕРНОВСЬКА Т.К.
Національний університет «Києво-Могилянська Академія» *МОН України,*
Україна, 04070, Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: *m_antonyuk@yahoo.com*

ПОЛІМОРФІЗМ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ МЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЗА АЛЕЛЯМИ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ

Мікросателітні локуси (SSR) є одним з найзручніших молекулярно-генетичних інструментів, придатних для дослідження генетичних розбіжностей, можливості яких обмежуються лише спроможністю їх пов'язування з поліморфним на даному матеріалі SSR-локусом [1]. Дослідити стійкі до борошнистої роси інтрогресивні лінії м'якої пшениці на предмет можливості маркерування гена стійкості мікросателітним локусом є справою наскільки звичною сьогодні, настільки ж і необхідною. Наявність молекулярного маркера гена не тільки полегшує його передачу на тло сучасного комерційно успішного генотипу пшениці, а і сприяє оптимізації фундаментальних досліджень з залученням відповідного рослинного матеріалу. Роботи в цьому напрямку завжди починаються з дослідження алельного поліморфізму мікросателітних локусів, адже саме від його наявності залежить доцільність наступного кроку – створення картуючої популяції. Кожна з досліджуваних ліній є похідним одного з геномно-заміщених амфидиплоїдів з геномною формулою AABBXX, де AABB є тетраплоїдним компонентом м'якої пшениці сорту Аврора, а XX – геномом *Aegilops speltoides* у Авродесу (AABBSS), *Ae. sharonensis* у Аврозису ($AABBS^{sh}S^{sh}$) та *Ae. umbellulata* у Авролати (AABBUU) [2]. Лінії було створено від схрещування сорту Аврора з одним із амфідиплоїдів [3], тому на початку дослідження припускали, що за будь-яким з досліджених мікросателітних локусів лінія буде відповідати генотипу або Аврори, або амфідиплоїда.

Матеріали і методи

Геномна ДНК сорту Аврора, геномно-заміщених амфідиплоїдів Авродес, Аврозис, Авролата, 18 ліній — похідних Авродесу, 3 ліній — похідних Аврозису, 12 ліній — похідних Авролати було ампліфіковано з праймерами до мікросателітних локусів, специфічних до хромосоми 3D *Triticum aestivum* (табл. 1). Лінії гексаплоїдні, цитологично стабильні, стійкі до борошнистої роси [3]. Виділення ДНК з листя та етіольованих паростків досліджуваних рослин поводили за модифікованою на основі буферу CTAB. Реакційна ПЛР-суміш об'ємом 30 мкл містила 250 нМ кожного праймера, 50 нг ДНК, по 0,2 мМ кожного дезокситрифосфату, 1,5 мМ $MgCl_2$, 1,2 u Taq-полімерази (Fermentas, Литва) у рекомендованому виробником буфері. Умови проходження ампліфікації (30 циклів, ампліфікатор Applied Biosystem 2700: початкова денатурація – 94°C, 5 хв; денатурація – 94°C, 30 с; гібридизація – 60°C та 48°C, 30 с; елонгація – 72°C, 30 с; кінцева елонгація – 72°C, 10 хв. Продукти ампліфікації у суміші 10-12 мкл ампліфікату з буфером нанесення (99% формаміду, 0,025 М ЕДТА, pH 8,0, бромфеноловий синій, ксиленціанол)розділяли у 6%-ому ПААГ за денатуруючих умов із додаванням 6М сечовини. Гель фарбували за допомогою нітрату срібла.

Результати та обговорення

Геномно-заміщенні амфідиплоїди та отримані за їхньою участю лінії, як і сама м'яка пшениця, є самозапилювачами. Процес формування геномів інтрогресивних ліній теоретично взагалі не передбачав між хромосомної рекомбінації генетичного матеріалу через характерну структуру геномно-заміщенних амфідиплоїдів. Будь-який з них відрізнявся від генотипу Аврора лише одним із трьох субгеномів (рис. 1). У гібриди F_1 від схрещування амфідиплоїда з пшеницею кон'югували та могли рекомбінувати хромосоми лише субгеномів A та B, однакові у компонентів схрещування. Хромосоми третього субгеному, наприклад S^{sh} від Аврозиса та D від Аврори, не кон'югують через відсутність гомології, тому рекомбінація внаслідок кросинговеру між ними відбуватися не може. Тому стабілізація інтрогресивних ліній не вимагає тривалих

самозапилень, і 42-хромосомна лінія є гомозиготною, якщо формує 21 бівалент у мейозі, тобто не є подвійним моносоміком. Те, що з хромосомами субгеному D не кон'югують S^{sh}- та U-хромосоми було показано раніше, в той же час у гібриді AABBSD спостерігали формування мультивалентів [2].

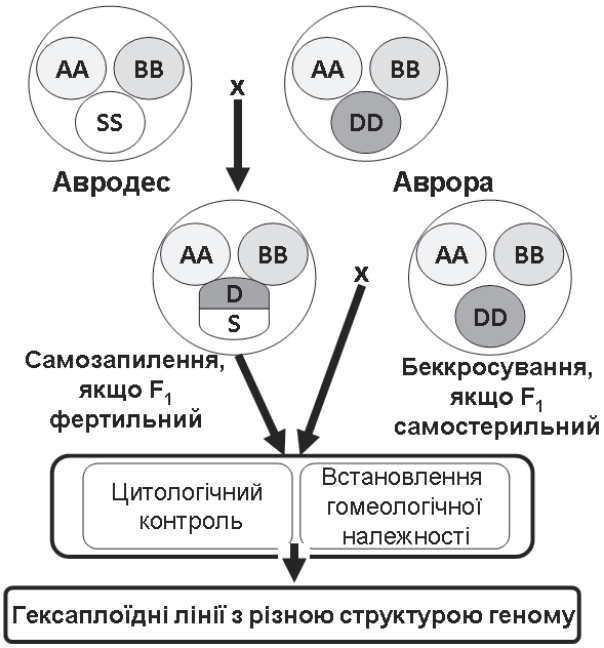

Рис. 1. Шлях створення інтрогресивних ліній з застосуванням геномно-заміщених амфідиплоїдів на прикладі ліній *T. aestivum / Ae. speltoides*.
Цитологічний контроль включає визначення кількості хромосом у мітозах первинних корінців паростків рослин та встановлення конфігурації максимальної асоціацій хромосом у М1 МКП ліній та гібридів від їхнього схрещування з Авророю. Гомеологічну належність чужинного хроматину встановлювали за допомогою біохімічних генів, специфічних до певних хромосом геному пшениці.

Отже, інтрогресивні лінії мають бути гомозиготними незважаючи на те, скільки інтрогресій вони мають у своєму геномі. Тому вони мають демонструвати лише один алель за кожним з вивчених мікросателітних локусів: властивий або Аврорі, або геномно-заміщеному амфідиплоїду. Насправді крім вказаних варіантів генотипів спостерігали нові алелі, не властиві жодній з батьківських форм, а також генотипи, гетерозиготні за алелями мікросателітів (табл. 1). Порядок розташування мікросателітних локусів хромосоми 3D зліва направо у таблиці відповідає їхній локалізації на хромосомі від термінального кінця короткого плеча до термінального кінця довгого плеча (рис. 2). Найближчими до центромери є локуси *Xcfd201*-3DS та *Xcfd223*-3DS. За цими локусами жоден з геномно-заміщених амфідиплоїдів не відрізняється від Аврори і крім кількох випадків відсутності ампліфікації (0-алель) в лініях 33-2, 166, 212-2 та 2599 всі лінії демонстрували одноманітність. Не відрізнялись від очікуваного генотипи ліній за локусами *Xcfd141*-3DS та *Xcfd9*-3DL. Кожна з них була подібно або до Аврори, або до відповідної гоеномно-заміщенної форми. За локусами *Xcfd152*-3DS, *Xcfd55*-3DS, *Xcfd64*-3DS, *Xcfd34*-3DS, *Xcfd211*-3DL, *Xwmc552*-3DL та *Xgdm72*-3DL розташованими на хромосомі дистально від центромери, всі лінії демонструють певні відмінності хромосоми 3D від цієї хромосоми у Аврори, хоча жодна з них не повторює спектр Аврозису за всіма вивченими мікросателітними локусами (табл. 1). Кожна з досліджених ліній є стійкою до борошнистої роси, хоча сорт Аврора вражається нею з балом 4–3. Це є підставою вважати, що лінії мають чужинний хроматин, отриманий, скоріше за все, від хромосом третьої гомеологічної групи [4]. Судячи з результатів мікросателітного аналізу, жодна лінія не є хромосомно-заміщеною за хромосомою 3D і це підтверджує результати попередніх досліджень [5]. Цілком легитимним та таким, що диктується закономірностями цитологічного процесу, який призводить до утворення інтрогресивних ліній є припущення про наявність чужинних транслокацій у геномі ліній. Результати мікросателітного аналізу для з'ясовування геномної структури, перебудованої за рахунок транс локації в тій чи іншій лінії, застосовувати складно.

Порівняння алелів мікросателітних локусів,

які властиві одному з компонентів схрещування для утворення ініціального гібриду F_1 далеко не завжди дає можливості стверджувати однозначно наявність чужинного сегмента на пшеничній хромосомі. Так, для ліній 4, 1112 можна припустити, що дистальна частина короткого плеча заміщена чужинним фрагментом. Те саме — для довгого плеча ліній 4, 39, 83, 1112. Всі ці лінії – похідні Авродеса, що його гібрид з Авророю формує мультиваленти. У цьому випадку можливі не лише транслокації, а й міжхромосомні рекомбінації хроматину.

Таблиця 1. Алельний поліморфізм інтрогресивних ліній за мікросателітними локусами, специфічними до хромосоми 3D

Амфідиплоїди та лінії, що від них походять	SSR-локуси локалізовані на 3DS							SSR-локуси локалізовані на 3DL			
	Xcfd152-3DS	*Xcfd55*-3DS	*Xcfd141*-3DS	*Xcfd64*-3DS	*Xcfd34*-3DS	*Xcfd201*-3DS	*1Xcfd223*-3DS	*Xcfd9*-3DL	*Xcfd211*-3DL	*Xwmc552*-3DL	*Xgdm72*-3DL
Авродес	0[1)]	0	0	1	2	1	1	0	2	0	0
3	H1	H1-1	1	H1-1	1	1	1	1	1	H1	1
3-1	H2	0	1	1	1	1	1	0	2	H1	1
4	0	0	0	1	0	1	1	0	2	0	0
7	1	H2	0	H2	2	1	1	1	1	1	H1
12-1	1	H1	1	1	H1	1	1	0	1	H1	1
25	1	0	1	H2	1	1	1	0	2	H1	0
33-2	1	1	1	1	0	1	0	1	1	H1	1
38	H2	0	0	1	H1	1	1	1	2	0	1
39	0	1	0	1	0	1	1	0	2	0	0
53	1	1	1	1	2	1	1	1	2	H1	1
55	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	H2
70	1	1	1	1	H2	1	1	1	1	1	1
83	H2	0	0	1	2	1	1	1	1	0	0
1105-1	1	H2	0	H3	1	1	1	1	2	1	1
1092	0	H2	1	H3	2	1	1	1	2	H1	1
1106	1	H2	1	H3	H1	1	1	1	2	1	0
1112	0	0	0	H3	2	1	1	1	2	0	0
1114	H3-1	H1-1	1	1	0	1	1	1	H1	H2-1	1
Аврозис	0	1	0	2	0	1	1	—	2	0	0
113	1	H1	1	1-2	H1-1	1	1	—	1-2	1	1
141	H1-1	1	1	1	1	1	1	—	1-2	1	H1
143	H2	H2	1	1	1	1	1	—	1	1	1
Авролата	0	1	1	0	0	1	1	0	2	2	0
166	H1	H1	1	1	1	0	1	1	1	H1	H1
190	1	1	1	1	H1	1	1	1	H1	1	H1
206	1	H1-1	1	H1	H1	1	1	1	2	1	1
207	H1	1	1	1	H2	1	1	1	1	H1	1
212-2	H2	H1	1	1	0	0	1	1	H1	1	1
215	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	H2
216-3	1	H1	1	1	H1	1	1	1	1	H2	1
217	1	1	1	H2	1	1	1	1	2	1	H2
221-1	1	H1	1	1	0	1	1	0	1	H2	1
221-2	1	H1	1	1	H1	1	1	0	1	H3	1
254	H1	0	1	H1	H3	1	1	1	2	H2	H2
2599	H2	H1	1	1	0	0	1		1	1	1

Примітки: 0 — ампліфікація не відбулася, 1 — алель, притаманний Аврорі, 2 — алель, притаманний геномно-заміщеному амфідиплоїду, Н — новий алель.

У всіх інших випадках, коли лінії демонструють наявність мікросателітного алеля, властивого геномно-заміщеному амфідиплоїду, такі алелі чергуються з алелями Аврори (лінії 25, 38, 39, 1105-1, 215, 217), і це змушує піддати сумніву наявність транслокації, хоча дві останні лінії – це похідні Авролати і рекомбінації тут ми не очікували. Найбільш цікавою особливістю таблиці 1 є наявність великої кількості алелів, позначених літерою «Н» — новий. Їх не було лише у чотирьох локусів, згаданих вище, з 11 вивчених. Порівняння ліній різного походження, а також різних мікросателітів з тих 7, за якими було виявлено нові алелі, показало, що статистично процес утворення нових алелів не характеризується специфічністю, пов'язаною з джерелом чужинного хроматину, плечем хромосоми (табл. 2). Щодо мікросателітного локуса, то три з чотирьох локусів, в яких нових алелів не було, є проксимальними до центромери. Чинником виникнення нових алелів мікросателітних локусів можуть бути внутрішньохромосомні перебудови у геномі гібридних рослин, які фіксувалися під час стабілізації інтрогресиних ліній пшениці. Тому результати мікросателітного аналізу мають обмежене значення для доказу факту інтрогресії цілої хромосоми, її плеча або частини плеча без даних цитологічного аналізу.

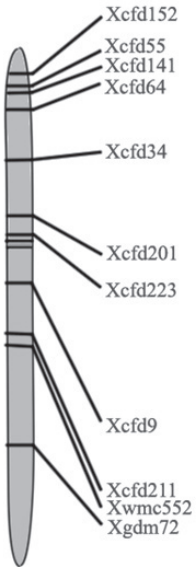

Рис. 2. Розташування вивчених мікросателітних локусів на хромосомі 3D.

Таблиця 2. Рівень алельної мінливості за мікросателітними локусами у залежності від походження інтрогресивних ліній та положенні локусів на хромосомі

Характеритика алелів	Кількість ліній з певними алелями						
	Xcfd15 2-3DS	*Xcfd55*-3DS	*Xcfd64*-3DS	*Xcfd34*-3DS	*Xcfd21* 1-3DL	*Xwmc5* 52-3DL	*Xgdm7* 2-3DL
Лінії — похідні Авродеса							
батьківський	14	11	11	10	17	10	17
Новий	4	7	7	8	1	8	1
Лінії — похідні Авролати							
батьківський	8	4	9	6	10	6	7
Новий	4	8	3	6	2	6	5

По дві ліній, які виглядають гетерозиготами за 1–3 мікросателітними локусами, було знайдено серед похідних Авродеса та Аврозиса та одна — Авролати. Пояснити це явище важко. Раніше, на матеріалі вивчення генетичного поліморфізму за геном *β-AmyD1*, ми висловлювали припущення, що гетерозиготність пояснюється виникненням гетерогенних дуплікацій за рахунок внутрішньохромосомних перебудов під час становлення рослинних ліній. Однак при вивченні поліморфізму за геном *βAmyA1* було показано, що алелі змінюються скоріше за все в процесі гаметогенезу, що може бути пов'язано з дією транспозонів [6].

Висновки

Інтрогресивні лінії м'якої пшениці, стійкі до борошнистої роси через наявність чужинного хроматину 3-ї гомологічної групи хромосом *Triticinae* продемонстрували алельний поліморфізм за мікросателітними локусами, специфічними до хромосоми 3D. Поліморфізм виходить за межі, встановлені генотипами, які брали участь у створенні гібридів F_1, від яких походять

інтрогресивні лінії. Наявність лише батьківських локусів властива локусам з проксимальною до центромери локалізацією. Локусам з дистальною локалізацією притаманна мінливість, яка спричинює появу нових у порівнянні з батьківськими генотипами алелів мікросателітних локусів. Рівень алельної мінливості за вивченими мікросателітними локусами хромосом 3-ої гомеологічної групи пшеницевих виявився однаковим для трьох досліджених груп інтрогресивних ліній, що мали інтрогресії від *Ae. speltoites, Ae. sharonensis, Ae. umbellulata.* Оскільки алельний поліморфізм серед ліній виходить за межі батьківських форм ініціальних гібридів, він не може бути поясненим лише прямою інтрогресією чужинного хроматину до геному м'якої пшениці. Результати аналізу можна використовувати для скринування популяцій, що розщеплюються, від схрещування ліній, стійких до борошнистої роси, з генотипом Аврора для ідентифікації мікросателітного маркера гену стійкості хоча б в межах чужинного фрагменту хроматину.

Література

1. Kalia R.K., Rai M.K., Kalia S. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants // Euphytica. – 2011. – Vol. 177. – P. 309–334.
2. Жиров Е.Г., Терновская Т.К. Геномная инженерия у пшеницы // Вестник с.-х. науки. – 1984. – №10. – С. 58–66.
3. Антонюк М.З., Терновська Т.К. Створення чужинно-заміщених ліній м'якої пшениці методом "змішування" хромосом у межах одного субгеному // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. Том 2. – Київ: Логос, 2001. – С. 368–375.
4. Антонюк М. З., Бодильова М.В., Єфіменко Т.С. Поліморфізм за SSR-локусами 3D хромосоми серед генотипів пшениці - реципієнтів чужинного гена стійкості до борошнистої роси (*Pm*) // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2010 – Т. 8, №1 – С. 10 – 17.
5. Antonyuk M.Z., Bodylyova M.V., Ternovskaya T.K. Genome structure of introgressive lines *Triticum aestivum/Aegilops sharonensis* // Cytology and Genetics. – 2009. – Vol. 43, №6. – С. 58-67.
6. Антонюк М.З., Шпильчин В.В., Терновська Т.К. Перманентна генетична мінливість у інтрогресивних ліній та амфідиплоїдів *Triticeae* // Цитология и генетика. – 2013. – Vol. 47., №4 (у друці).

ANTONYUK M.Z., SHTEFYUK T.V., TERNOVSKA T.K.
National University of Kyiv-Mohyla Akademy, MONMS Ukraine
Ukraine, 04070, Kyiv, G. Skovorody str., 2, e-mail: *m_antonyuk@yahoo.com*

COMMON WHEAT INTROGRESSIVE LINE POLYMORPHISM FOR MICROSATELLITE LOCUS ALLELES

Aims. Evaluation of possibilities to use microsatellite loci as potential molecular markers of alien chromatin in the genomes of wheat introgressive lines, which contain genetic material from *Ae. speltoites, Ae. sharonensis, Ae. umbellulata* and are resistant to powdery mildew. Evaluation of acceptability of SSR analysis for specification of introgressive lines genome structure. ***Methods.*** PCR of genome DNA of wheat genotypes for identification of microsatellite loci specific to 3D chromosome. ***Results.*** The identified polymorphisms of SSR loci were represented by new polymorphic variants, which are different from parental genotypes used for F1 development and by heterozygotes. Microsatellite loci located more distal to centromere were shown to be more polymorphic. ***Conclusions***. Polymorphism of SSR loci limits the potential of their use for investigation of introgressive lines genome structure. Microsatellites can be used for screening segregating populations taking into consideration the possibility of new allele appearance.

Key words: wheat, introgressive lines, powdery mildew, microsatellites.