

АНТОНЮК М.З.[✉], ЄФІМЕНКО Т.С., НАВАЛІХІНА А.Г., ТЕРНОВСЬКА Т.К.

Національний університет «Києво-Могилянська академія» МОН України,
Україна, 04070, м. Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: m_antonyuk@yahoo.com

[✉]m_antonyuk@yahoo.com, (066) 735-29-06

МОДЕЛЮВАННЯ СПІВВІДНОШЕНЬ ФЕНОТИПНИХ КЛАСІВ ДЛЯ ОЗНАКИ КОЛІР СТИГЛОЇ ЛУСКИ У ГІБРИДАХ ПШЕНИЦІ ІНТРОГРЕСИВНОГО ПОХОДЖЕННЯ

Забезпечений антоціановими пігментами колір стиглої колоскової луски пшениці завжди був важливою таксономічною ознакою, яка згодом набула статусу ще й морфологічного маркера, зручного для використання в генетичному аналізі [1, 2]. Колоскова луска пшениці може класифікуватися як «біла», хоча насправді це забарвлення виглядає як солом'яно-жовте, та «забарвлена» – червона (найбільш звичайна), коричнева, сіра та чорна. Червоне і чорне забарвлення луски у пшениці домінує над білим забарвленням луски [3]. *Rg* гени, що контролюють забарвлення луски у пшениці, локалізовані на коротких плечах хромосом першої гомеологічної групи (1A, 1B та 1D) [4]. Різні алелі *Rg* генів визначають чорне забарвлення луски у диплоїдної та тетраплоїдної пшениці та чорне, червоне (коричневе) і сіре забарвлення луски у гексаплоїдної пшениці [3]. Забарвлення луски контролюється серією гомеолокусів *Rg-A1*, *Rg-B1* та *Rg-D1*. На час їхньої ідентифікації та хромосомної локалізації ці гени називалися *Bg* (black glume) (цит. за [1], *Rg1* та *Rg2* (red glume), відповідно [4]. Один з алелів гена *Rg-D1* (*Rg2*) визначає сірий колір луски [5]. Інший алель гена *Bg*, локалізованого у хромосомі 1A, це *Rg3* (цит. за [1].

Для встановлення аallelності генів, що беруть участь у контролі кольору стиглої луски у пшениці, прийнято використовувати результати порівняння різних її видів [1, 3], а також споріднених дикорослих диплоїдних видів [2, 4]. У тому числі оцінці піддаються популяції, що розщеплюються, отримані від схрещування видів, хоча і однакових за геномною формулою, але не перевірених щодо бівалентної кон'югації хромосом у мейозі гібридів F_1 [6].

У статті наведено результати вивчення інтрогресивних ліній м'якої пшениці, контрастних

за кольором луски, та гібридів між ними та м'якою пшеницею. Показано, що модель успадкування ознаки, коли фенотип, альтернативний такому м'якої пшениці, виник як наслідок інтрогресивного походження лінії, має враховувати наслідки особливостей перебігу мейозу, що характеризують F_1 за участю таких ліній, а також можливий мейотичний драйв.

Матеріали і методи

Гексаплоїдні лінії м'якої пшениці, що відрізнялися за забарвленням колоскової луски від рекурентного батька (Аврора, червона луска) та характеризувалися або темно-коричневою (похідні Аврозису, Авролати та Авродесу), або чорною лускою (похідні тільки Авролати) [7], цитологічно стабільні. Для порівняння геномної структури компонентів схрещування стосовно наявності великих чужинних включень, які можуть вплинути на перебіг мейозу, вивчали метафазу мейозу 1 МКП F_1 усіх комбінацій схрещування. Було отримано та оцінено за кольором стиглої луски гібриди F_1 та F_2 13 комбінацій схрещування з виділенням таких градацій ознаки: 1 – луска червона, 3 – світло-коричнева, 3 – темно-коричнева, 4 – чорна (табл. 1).

Результати та обговорення

Колір стиглої луски рослин F_1 у всіх комбінаціях схрещування, що включали контрастні за градацією ознаки ліній, був темнішим, ніж у лінії з більш світлим забарвленням, та світлішим, ніж у лінії з більш темним забарвленням. Отже, алель темного забарвлення луски не домінує повністю над алелем червоного забарвлення. Градація ознаки «4», чорний, відрізнялася від градацій «2» та «3» якістю відтінку. Градації «2» та «3» – різним ступенем насиченості

коричневого кольору. Крім того, завжди є небезпека сплутати градації «1» та «2», а також «2» та «3».

Розщеплення у комбінаціях 12 (3) х Аврора (1) та 17 (3) х Аврора (1), у яких брали участь лінії – похідні Авродесу, відповідає моногенному з напівдомінуванням між алелями ($\chi^2=3,84$ та $\chi^2=0,09$ відповідно $p>0,05$). Те, що колір луски контролюється одним напівдомінантним геном, підтверджується даними розщеплення у беккросній популяції від схрещування з Авророю лінії 12, $\chi^2=0,00$ (табл. 1).

Обидві лінії утворюють гібрид з Авророю з бівалентною кон'югацією хромосом у мейозі.

Відомо, що гени ортологічної серії *Rg* локалізуються на хромосомах 1-ої гомеологічної групи пшеницевих. Судячи з даних оцінки вказаних ліній за гліадиновими спектрами [7, 8], ген, що розщеплюється у цих комбінаціях схрещування, є саме *Rg* геном. Таке саме розщеплення спостерігали у комбінації 53(2) х 19(1) ($\chi^2=3,28$). Авродес характеризується коричневою лускою, і можна припустити, що лінії 12, 17, 53, а також 7, про яку йдеться далі, мають алель гена *Rg* у складі чужинної ділянки хромосоми 1S, отриманої від Авродесу.

Таблиця 1. Розщеплення рослин F_2 за ознакою колір стиглої колоскової луски

Комбінація схрещування	Кількість рослин із градацією				Комбінація схрещування	Кількість рослин з градацією			
	1	2	3	4		1	2	3	4
12 (3) х Аврора (1)*	20	22	15	0	206(4) х 142 (1)	23	25	32	40
[12 (3)хАврора]х12	19	19	0	0	207(4) х 142 (1)	14	21	21	25
17 (3) х Аврора (1)	15	33	16	0	211(4) х 215(1)	11	32	22	25
53(2) х 19(1)	34	70	0	0	206 (4) х 211(4)	4	2	9	51
217 (3) х Аврора (1)	53	48	11	0	226(1) х 237(4)	28	0	0	67
177 (1) х 221/1 (3)	30	26	7	0	207(4) х 7(3)	6	7	21	27
196(3) х 143(1)	25	36	25	0	189 (4) х 221/1 (2)	26	29	4	37

Примітка.*У дужках вказано градацію прояву ознаки.

Більш складну для аналізу картину спостерігали у розщепленнях, де одна з ліній була похідною Авролати. Хоча сама Авролата за кольором стиглої луски від Авродеса майже не відрізняється, серед отриманих за її участю інтрогресивних ліній виявилось чимало з чорною лускою (градація 4), яких не було серед ліній іншого походження. Хоча були і лінії з градацією 3. В F_2 від у комбінації 217 (3) х Аврора (1) для моногібридної моделі спостерігається значний надлишок рослин із світлим забарвленням луски та нестача таких з темним ($\chi^2=33,79$, $p<0,001$). Лінія 217 має пару хромосом, які не утворюють бівалент у гібриді з Авророю. Це пара або чужинних, або значно перебудованих щодо гомологу Аврори хромосом. Якщо чужинний ген *Rg*, що контролює темне забарвлення луски лінії 217, розташований саме у цій хромосомі, це може бути причиною деформації розщеплення проти очікуваного при моногенному контролі ознаки, адже замість бівалента у $M1$ утворюються два уніваленти і не всі гамети будуть еуплоїдними. Тоді змінюються частоти генотипів, що формуються за умов функціону-

вання гамет із різною кількістю хромосом, на базі чого можна поррахувати очікувані обсяги фенотипних класів із різними градаціями забарвлення (табл. 2).

За умов однакової життєздатності всіх гамет та зигот очікувані частки рослин із червоними та темними лусками з градаціями 2 та 3 становлять 0,5625, 0,375 та 0,0625 відповідно, тобто 63, 42 та 7 для вибірки 112 рослин. Це не відрізняється від емпіричного розподілу за фенотипними класами: 53, 48 та 11 ($\chi^2=4,73$, $p>0,05$). Звідси можна припустити, що ознака контролюється одним геном, розташованим у такій хромосомі темнозабарвленої лінії, яка не кон'югує з гом(е)ологом Аврори.

Відомо, що пшениця через свою алополіплоїдну природу досить толерантна до втрати окремих хромосом та набуття зайвих проти 42. Проте такі гамети та зиготи все ж поступаються життєздатністю у порівнянні з еуплоїдними аналогами. На великому експериментальному матеріалі, моносоміках за різними хромосомами, Сірсом [9], було показано, що кількість нулісоміків серед нащадків із рецесивним феноти-

пом рослин F_2 від схрещування пшениці з чужинно-заміщеною лінією (як в нашому випадку) складала від 1 до 7 % залежно від заміщеної хромосом, а середній відсоток за всіма вивченими хромосомами він оцінив як 5 %. З таблиці 2 видно, що теоретично, якщо 20-хромосомні гамети беруть участь у заплідненні так же часто, як еуплоїдні, і всі зиготи мають однакову життєздатність, утворюється 31 % нулісоміків. Тобто, беручи до уваги експериментальні дані Сірса, ми помиляємося у шість разів, коли користуємося результатами розрахунків, приклад яких наведено у таблиці 2. Джерел такої помилки

два: не всі гамети мають однакову імовірність взяти участь у заплідненні; не всі утворені зиготи мають однакову імовірність дійти у онтогенезі до стадії оцінки (зрілості). У таблиці 3 наведені розрахунки, що показують, які теоретичні розподіли слід очікувати, якщо у заплідненні беруть участь не всі гамети, що теоретично можуть утворюватися. Фактичне розщеплення 53(1), 48(2) та 11(3) краще відповідає теоретичному, розрахованому з першої решітки ($\chi^2=4,67$, $p>0,05$), хоча наш досвід роботи з гібридами свідчить, що друга умова другої решітки більш реалістична.

Таблиця 2. Очікувані частоти генотипних та фенотипних класів серед F_2 гібриду 217 x Аврора

Частота гамет вказаного складу	D (0,19)	U (0,19)	DU (0,06)	0 (0,56)
0,19(20 +D)*	0,0361	0,0361	0,0114	0,1064
0,19 (20+U)	0,0361	0,0361	0,0114	0,1064
0,06 (20+D+U)	0,0114	0,0114	0,0036	0,0336
0,56 (20)	0,1064	0,1064	0,0336	0,3136
	0,5625 – світлі луски, градація 1			
	0,375, градація 2			
	0,0625, градація 3			

Примітки: *20 хромосом, які утворюють біваленти з гомологами у рослині F_1 та хромосома геному D, яка не мала гомолога у гібриді F_1 , її партнером була чужинна (або значно перебудована) хромосома U, і вони унівалентні.

Таблиця 3. Очікувані частоти генотипних та фенотипних класів серед F_2 за умов участі у заплідненні всіх жіночих та лише еуплоїдних (перша решітка) та 21-22-хромосомних чоловічих гамет (друга решітка) чоловічих гамет

Частота гамет вказаного складу	D (0,50)	U (0,50)
0,19(20 +D)	0,095	0,095
0,19 (20+U)	0,095	0,095
0,06 (20+D+U)	0,03	0,03
0,56 (20)	0,28	0,28
	0,375 – світлі луски, градація 1	
	0,5, градація 2	
	0,125, градація 3	

Частота гамет вказаного складу	D (0,43)	U (0,43)	DU (0,14)
0,19(20 +D)	0,0817	0,0817	0,0266
0,19 (20+U)	0,0817	0,0817	0,0266
0,06 (20+D+U)	0,0258	0,0258	0,0084
0,56 (20)	0,2408	0,2408	0,0784
	0,33225 – світлі луски, градація 1		
	0,535, градація 2		
	0,1425, градація 3		

Спираючись на таблиці 2 та 3 (друга решітка), можна розрахувати та перевірити три додаткові ситуації: 1) нулісоміки (у таблиці їхня частота 0,3136) нежиттєздатні усі, тоді теоретичний розподіл 41 (1) + 61 (2) + 10 (3), $\chi^2=6,68$, $0,05 > p > 0,01$; 2) життєздатна тільки половина нулісоміків, 54 (1) + 50 (2) + 8 (3), $\chi^2=0,96$, $p > 0,05$; 3) життєздатні дві третини нулісоміків, 57 (1) + 47 (2) + 8 (3), $\chi^2=1,66$, $p > 0,05$).

Два останніх результати однаково добрі, хоча така кількість нулісоміків навряд чи дійде до етапу оцінки (зріла рослина). Фертильність гібридів F_1 та F_2 , завжди оцінюється як відношення кількості зернин із колоса до кількості колосків, мається на увазі, що колосок м'якої пшениці у середньому має дати 3 зерна. Отже, при повній фертильності це відношення має бути 3. Якщо воно менше, це означає, що не всі жіночі гамети дали початок зиготі, або не всі зиготи виявилися життєздатними. Крім того, кількість рослин, які оцінюються в полі, завжди менша кількості висіяних зернин. Показник фертильності при самозапиленні рослин F_1 гібрида 217 x Аврора був 2,08, тобто кожна третя квітка не утворила насіння. Кількісно це збігається з теоретичною часткою нулісоміків, 0,3136. Єдиним висновком, який можна зробити на отриманих даних, – ознака контролюється одним геном, а відхилення співвідношення розщеплення від теоретично очікуваного до моногенного спричинюється різною життєздатністю гамет та зигот із кількістю хромосом, яка відхиляється від еуплоїдних чисел 21 та 42 відповідно.

Аналогічні результати отримали, вивчаючи розщеплення у F_2 комбінації 177(1) x 221/1(3). Можна було б прийняти модель контролю ознаки одним геном, розташованим у хромосомі, яка не кон'югує зі своїм гомологом ($\chi^2=4,58$, $p > 0,05$) і нулісоміки не життєздатні. Але результат виявляється кращим, коли припускаємо, що або не всі спермії беруть участь у заплідненні ($\chi^2=2,78$, $p > 0,05$), або половина нулісоміків не доживає до зрілості ($\chi^2=1,31$, $p > 0,05$).

У F_2 комбінації 196 (3) x 143 (1) спостерігали розщеплення 1(1):2(2):1(3) ($\chi^2=2,28$, $p > 0,05$), хоча у метафазі мейозу 1 гібрида F_1 було 4 облігатних уніваленти та 2 відкритих біваленти. Рослини характеризувалися зниженою фертильністю. Те, що фактичне розщеплення не відрізнялося від моногенного, може свідчити про те, що ген, критичний для забарв-

лення луски лінії 193, розташований у хромосомі, яка утворює бівалент з гомологом лінії 143.

Картина успадкування ускладнюється у комбінаціях, де один із компонентів схрещування мав чорну луску (табл. 1). F_1 класифікували як чорні, хоча насиченість кольору поступалася батьківським лініям. Серед F_2 , крім чорних та червоних, були рослини зі світло- та темно-коричневою лускою. Таке розщеплення не можна було пояснити моногенною моделлю. Було припущено, що у розщепленні беруть участь два гени: *Rg*, хромосоми 1-ої групи, забезпечує у гомозиготі темно-коричневий колір, у гетерозиготі світло-коричневий, як це було показано при аналізі похідних Авродесу; інший ген (позначимо як *Bg2*, black glume), локалізація якого не відома, забезпечує чорний колір луски у гомозиготі у похідних Авролати. Адекватну модель вдалося побудувати для комбінацій 206 x 142, 207 x 142, 211 x 215. Усі три фенотипні розщеплення у F_2 виявилися однаковими при попарному порівнянні їх методом багатопільного хі-квадрата з урахуванням поправки Бонферроні, тому були об'єднані: 48(1) + 78(2) + 75(3) + 90(4).

Тестувалася модель дигібридного розщеплення за генами, які комбінуються незалежно і розташовані в хромосомах, представлених гомеологами, що не формують біваленти. В мейозі гібридів F_1 від вказаних схрещувань спостерігали від 2 до 6 облігатних унівалентів залежно від комбінації, модель будували з урахуванням чотирьох унівалентів. Припустили, що жіночі гамети функціонують 20 – 22-хромосомні, а чоловічі лише 21-хромосомні. Після нормалізації частот гамет та зигот з урахуванням згаданих умов моделі та формування фенотипів класів, виходячи з припущень про фенотипний прояв різних сполучень генів *Rg* та *Bg2*, які ми зробили, спираючись на наявні фенотипні розщеплення та багаторічні спостереження за забарвленням стиглої луски в інтрогресивних лініях пшениці, було отримано теоретичне співвідношення для фенотипних класів, максимально наближене до того, що спостерігалось.

Не важко зрозуміти, що запропонована модель описує картину успадкування тільки у загальних рисах. По-перше, реально існуючий пул гамет за своїми частотами може відрізнятися від розрахованого через різну функціональну здатність різних гамет. По-друге, буде йти певний добір проти зигот із незбалансованим хромосомним набором. По-третє, і це дуже важли-

во, безпомилково вказати градацію рослини F_2 за кольором луски в тих комбінаціях, де беруть участь лінії з градацією «4», – завдання нереальне, якщо тільки не отримати та не оцінити родини нащадків F_3 . Отже, отримані результати свідчать лише про те, що розщеплення відбувається не за одним, а принаймні за двома генами чужинного походження, які комбінують незалежно та беруть участь у контролі ознаки колір стиглої луски. Отже, картину успадкування чужинного генетичного матеріалу у гібридах за участю інтрогресивних ліній можна описати лише приблизною моделлю, і результати гібридологічного аналізу не можуть надати остаточних доказів про генетичний контроль ознаки.

Крім уже наведених причин відхилення емпіричного розщеплення від очікуваного при схрещуванні інтрогресивних ліній, нам здається важливим феномен мейотичного драйву, який визначають як будь-яку зміну нормального перебігу мейозу, в результаті чого гетерозиготний за двома альтернативними генетичним станами організм продукує ефективний гаметний пул з ексцесом одного з двох альтернативних типів [10]. Механізми та наслідки драйву обговорюються активно [11]. У нашому випадку такою альтернативою є наявність чи відсутність у гаметі чужинного хроматину. Принаймні розщеплення у комбінації 206 x 211, де луски обох ліній чорні, не можна пояснити чимось іншим. У всіх вивчених нами фенотипних розподілах в емпіричних класах червоноколосих рослин завжди

був надлишок у порівнянні з очікуваною частотою. На наш погляд, це прямо вказує на втрату чужинного хроматину при формуванні гамет гібридними рослинами як на характерну рису гібридних популяцій, створених за участю інтрогресивних ліній.

Висновки

Гамети з незбалансованими хромосомними наборами утворюються через порушення у перебігу мейозу гібрида F_1 , не всі хромосоми якого утворюють біваленти. Якщо критичний ген знаходиться у хромосомі, яка не кон'югує з гом(е)ологом партнера за схрещуванням, гібриди F_1 за участю інтрогресивних ліній формують такий пул гамет та зигот, частоти яких відрізняються від теоретично очікуваних при схрещуванні чистих ліній. Лінії 12, 17, 53 та 217 відрізняються від генотипу Аврори за одним геном забарвлення луски. Проте у геномах ліній 12, 17 та 53 ген чужинного походження, що викликає темне забарвлення луски, входить до складу хромосоми, яка кон'югує з гом(е)ологом Аврори, а в лінії 217 ген розташований у хромосомі, яка не кон'югує з гом(е)ологом Аврори. Лінія 221/1 з забарвленою лускою відрізняється від лінії 177 з незабарвленою лускою одним геном, і він має бути розташованим у складі цілої чужинної хромосоми або великої транслокації, що сприяє утворенню в мейозі двох унівалентів замість бівалента.

Література

1. Khlestkina E.K., Pshenichnikova T.A., Röder M.S. Comparative mapping of genes for glume colouration and pubescence in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theoretical and Applied Genetics. – 2006. – V. 113. – P. 801–807.
2. Антонюк М.З., Терновская Т.К. Признаки морфологии растений как маркеры гомеологических групп хромосом *Triticeae* // Цитология и генетика. – 1997. – Т. 31, N 4. – С. 105–112.
3. Khlestkina E.K., Röder M.S., Börner A. Mapping genes controlling anthocyanin pigmentation on the glume and pericarp in tetraploid wheat (*Triticum durum* L.) // Euphytica. – 2010. – V. 171. – P. 65–69.
4. McIntosh R.A. Catalogue of gene symbols for wheat [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbol>.
5. Khlestkina E.K., Salina E.A., Pshenichnikova T.A. Glume coloration in wheat: allelism test, consensus mapping and its association with specific microsatellite allele // Cereal Research Communication. – 2009. – V. 37, № 1. – P. 37–43.
6. Dyck P.L., Kerber E.R. Inheritance in hexaploid wheat leaf rust resistance derived from *Aegilops squarrosa* // Can. J. Genet. Cytol. – 1970. – V. 12. – P. 175–180.
7. Михайлик С.Ю., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Генетична варіабільність інтрогресивних ліній м'якої пшениці за генами *Gli* // Наукові записки НаУКМА. – 2011. – Біологія та екологія. – Т. 119. – С. 8–14.
8. Кириєнко А.В., Михайлик С.Ю., Антонюк М.З. Поліморфізм за генами *Glu* та *Gli* інтрогресивних ліній м'якої пшениці, стабільних за ознаками морфології колоса // Наукові записки НаУКМА. – 2015. – Біологія та екологія. – Т. 171. – С. 17–24.
9. Sears E.R. The aneuploids of common wheat // Missouri Agricultural Experiment Station Research Bulletin. University Archives of the University of Missouri, Columbia, MO. – 1954. – V. 572.
10. Zimmering S., Sandler L., Nicoletti B. Mechanisms of meiotic drive // Annual Review of Genetics. – 1970. – V. 4. – P. 409–436.
11. Lindholm A.K., Dier K.A., Firman L. The ecology and evolutionary dynamics of meiotic drive // Trends Ecol. Evol. – 2016. – V. 31 (4). – P. 315–326.

ANTONYUK M.Z., IEFIMENKO T.S., NAVALIKHINA A.G., TERNOVSKA T.K.

National University of "Kyiv-Mohyla Academy",

Ukraine, 04070, Kyiv, Skovorody str., 2, e-mail: m_antonyuk@yahoo.com

MODELING RATIOS OF PHENOTYPIC CLASSES IN WHEAT HYBRIDS OF INTROGRESSIVE ORIGIN FOR GLUME COLOR TRAIT

Aim. Develop inheritance model for glume color in hybrid generations considering introgressive origin of crossing components. **Methods.** Phenotypic assessment of the trait, cytological study of chromosome conjugation in meiosis, methods determining statistical significance of the results. **Results.** Twelve cross combinations of wheat introgressive with one another and with recurrent genotype Aurora were studied. Selected for the crosses introgressive lines had contrasting glume color trait. Characteristics of wheat introgressive lines and its hybrids which would be important in hybrid analysis for the development of the inheritance model were identified. Genetic analysis of the introgressive lines was done as for the number of glume color genes for which lines differed from one another and from the Aurora genotype. **Conclusions.** In case the critical gene is localized in a chromosome that do not conjugate with hom(e)olog of the cross partner, F₁ hybrids developed with introgressive lines form gametes and zygotes with frequencies differing from theoretically expected for the cross of homozygous lines.

Keywords: wheat introgression lines, *Aegilops*, glume colour, aneuploidy gametes and zygotes, meiotic drive.