

Антонюк М. З., Ліснічук А. М., Онук Л. Л., Шпильчин В. В.,
Пасічник Т. В., Терновська Т. К.

ПЛОЇДНІСТЬ ГЕНОМУ ТА СИСТЕМА СХРЕЩУВАННЯ В ПОПУЛЯЦІЯХ *THINOPYRUM INTERMEDIUM*

Пирій середній, дикорослий родич пшениці, за деякими ознаками становить інтерес для його залучення до інтрогресивної гібридизації з пшеницею. В основу цілеспрямованої роботи в такому напрямку має бути покладено відомості про його біолого-генетичні властивості. Кілька популяцій пирію середнього (*Thinopyrum intermedium*), зібраних у м. Кременець, вивчено за кількістю хромосом, генетичним контролем компонентів глютенінового спектра та системою схрещування. Рослини виявились гексаплоїдними, $2n = 42$ хромосоми. Генетичний контроль компонентів глютенінового спектра здійснюється принаймні трьома генами *Glu*. Кожен з ідентифікованих генів поліморфний, представлений більше ніж двома алелями, деякі з яких є кластерними, деякі – нуль-алелями. Спроцену, трьохалельну модель генетичного контролю електрофоретичного спектра глютенінів було застосовано для визначення системи схрещування пирію середнього. Пирію середньому притаманна змішана система схрещування з імовірністю самозапилення 0,50–0,81. Ця біологічна властивість є позитивною щодо перспектив залучення виду до віддаленої гібридизації.

Ключові слова: *Thinopyrum intermedium*, система схрещування, глютеніни, частоти генів у популяції.

Пирій середній (*Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth & D.R. Dewey) має ознаки, які бажано передати культурним злакам: зимостійкість, соле- і посухостійкість, підвищений вміст білка і клейковини в зерні, стійкість до захворювань. Пирій має також меншу вимогливість до родючості ґрунтів у порівнянні з пшеницею. Крім того, його колос надзвичайно, у порівнянні з пшеницею, що культивується, багатоколосковий, а колоски багатоквіткові. Ці ознаки давно привернули увагу до пирію середнього як до цікавого компонента для схрещування з пшеницею з метою створення інтрогресивних ліній пшениці з агрономічно цінними ознаками [1–5]. Неповні (часткові) амфідиплоїди пшениці м'якої з видом *Thinopyrum intermedium* є потенційно перспективними для поліпшення генетичного пулу пшениць, що культивуються. Наприклад, створено амфіплоїди, які мають стійкість до вірусу мозаїки пшениці, до кліща пшениці [6,7], до вірусу жовтої карликовості ячменю [8]. *Thinopyrum intermedium* має відмінну стійкість до *Fusarium*. Серед рослин виду є носії генів стійкості до бурої іржі та стеблової іржі, які вже були перенесені до геному пшениці. Нещодавно створено амфіплоїди, які мають стійкість до борошнистої роси [9].

Коли рослинний вид залучається до будь-яких генетичних досліджень, а інтрогресивна гібридизація є одним із напрямів таких

досліджень, насамперед потрібно встановити систему схрещування, властиву виду, який залучається до досліджень. Без цієї інформації не можна правильно планувати експеримент, як і аналізувати його результати. Інформації про систему схрещування виду *Thinopyrum intermedium* в літературі немає. У статті наведено результати визначення плоїдності геному та системи схрещування пирію середнього (*Thinopyrum intermedium*) на основі аналізу його природних популяцій з різних місцезростань за алелями генів *Glu*.

Матеріали та методи

Відбір рослин пирію середнього проведено в місті Кременець 3 серпня 2016 р. Було зібрано по 100 рослин із 6 популяцій з різних місць зростання, які відрізнялися за умовами освітлення та вологості ґрунту (рис. 1).

Всі розрахунки з перевірки алельності генів було виконано лише для популяції 1, яка виявилась найбільш представленою такими рослинами, для яких було можливим отримати спектри для чотирьох зернівок, без чого не можна генотипувати за генами, що кодують глютеніни. Таких рослин у популяції 1 було 50, у популяціях 3, 4 та 5 – значно менше. Популяції 2 та 6 було виключено з розгляду, оскільки із зернівок не вдалося виділити запасні білки.

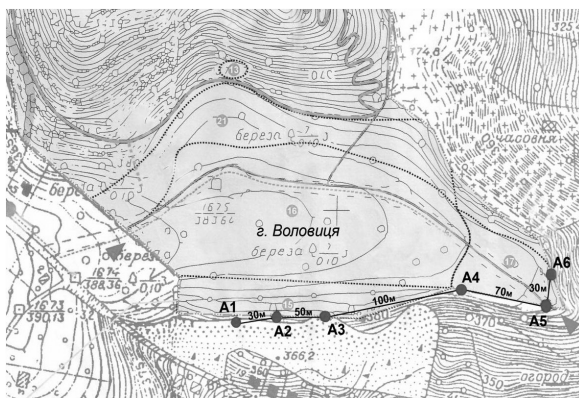


Рис. 1. Схема розташування досліджуваних популяцій пирію

Для отримання маркерного спектра, з рухливістю компонентів якого порівнювали рухливість компонентів спектра пирію, використовували зернівку пшениці сорту Аврора.

Екстракцію проводили протягом 1,5 год та витримували після цього на киплячій водянній бані протягом 3 хв. Склад екстрагуючого буфера: гліцерин – 11 мл, SDS – 2 г або 10 %, 1 М трис-НCl (рН = 6.8) – 8 мл, Н₂О до 95 мл, бетамеркаптоетанол – 5 мл, бромфеноловий синій. Розділення проводили в поліакриламідному гелі в присутності SDS за Леммлі (Laemmli, 1970, цит. за: [11]). Оптимальною для розділення глютенінів є концентрація гелю 12,5 %. Електрофоретичне розділення проводили у вертикальних гелях. Для зручності роботи з гелями їх «пришивали» до скла, обробляючи його розчином складу: 1 мл оцтової кислоти, 10 мл етилового спирту, 50 мкл 3-methoxycryloxypropyltrimetoxysilane (bind-silane). Склад розділяючого гелю: 30 % р-н акриламід – 12,5 мл, 1 % р-н бісакриламід – 3,1 мл, 1 М р-н трис-НCl (8.7) – 7,5 мл, 10 % р-н SDS – 0,3 мл, Н₂О – 6,5 мл, 10 % р-н персульфату амонію – 100 мкл, ТЕМЕД – 10 мкл на 30 мл гелю. Склад концентруючого гелю: 30 % р-н акриламід – 1,67 мл, 1 % р-н бісакриламід – 1,3 мл, 1 М р-н трис-НCl (рН = 6.8) – 1,25 мл, 10 % р-н SDS – 0,1 мл, Н₂О – 5,6 мл, 10 % р-н персульфату амонію – 50 мкл, ТЕМЕД – 5 мкл на 10 мл гелю. Розчин персульфату амонію та ТЕМЕД додаються безпосередньо перед заливанням гелю. Склад електродного буфера: 1×: Трис (рН = 8.3) – 3,6 г, гліцин – 17,28 г, SDS – 1,2 г, Н₂О – до 1200 мл. Наносили по 11 мкл білкового екстракту в кожен слот.

Електрофорез проводили від «-» до «+» і завершували після проходження фронту бромфенолового синього. Умови: 300 В, 30 МА – до входження фронту барвника в розділяючий гель, далі 300 В, 60 МА – до кінця (розрахунок на дві пластинки гелю). Після закінчення електрофорезу

скло з гелем фіксували протягом ночі у фарбі такого складу: кумасі діамантовий блакитний – 200 мг, етиловий спирт – 170 мл, оцтова кислота (крижана) – 60 мл, трихлороцтова кислота (100 %) – 60 мл, Н₂О – до 1 л. Надлишки фарби відмивали проточною водою з додаванням невеликої кількості оцтової кислоти. Гелі висушували та аналізували.

Кількість хромосом визначали в меристемі первинних корінців паростків на чавлених тимчасових препаратах за методом Waninge [12]. Забарвлення ядер здійснювали реактивом Шиффа. Пошук мітотичних пластинок за збільшенням 10 ок. х 10 об., підрахунок хромосом за збільшенням 10 ок. х 40 об.

Результати та обговорення

Хромосомні числа у злаків прийнято встановлювати на тимчасових чавлених препаратах зафіксованих клітин з меристемами первинних корінців за методикою Waninge [12]. Було зафіксовано корінці з п'яти паростків з кожної з шести вивчених популяцій та проглянуто препарати, забарвлені за Фьольгеном. Частота метафазних пластинок на препарат не перевищувала три – п'ять, причому такі пластинки були не на всіх препаратах. Хромосоми були мало скорочені, розташовувались близько одна до одної. Отже, методика, розроблена для пшеничних рослин, не є оптимальною для пирію. Хоча хромосоми були довгими і пластинки через це мали поганий розподіл хромосом, вдалося встановити, що кількість хромосом тяжіє до 42, тобто рівень плоідності виду становить 6. Кращі зі знайдених пластинок наведено на рис. 2.

Система схрещування рослинного виду може бути визначена за результатами встановлення частот генів та генотипів у популяції [10]. Під час роботи з глютеніновими спектрами основою для встановлення частот алелів глютенінових

генів є формула $p_i = \frac{2 - \sqrt{4 - 4g_i}}{2}$, де p_i – частка

i -го компонента спектра, а g_i – частка спектрів з цим компонентом у вибірці [13]. Частота може

визначатися як $r_i = \sqrt{\frac{R}{2N}}$, де R – кількість спек-

трів без компонента, що його частка становить p , N – загальна кількість спектрів. Отже, r_i – частота нуль-алеля. Похибка частки p_i розрахо-

вується за формулою $S_{pi} = \sqrt{\frac{pr}{N}}$, а частки r_i –

за формулою $s_{ri} = \sqrt{\frac{1-r^2}{2N}}$.

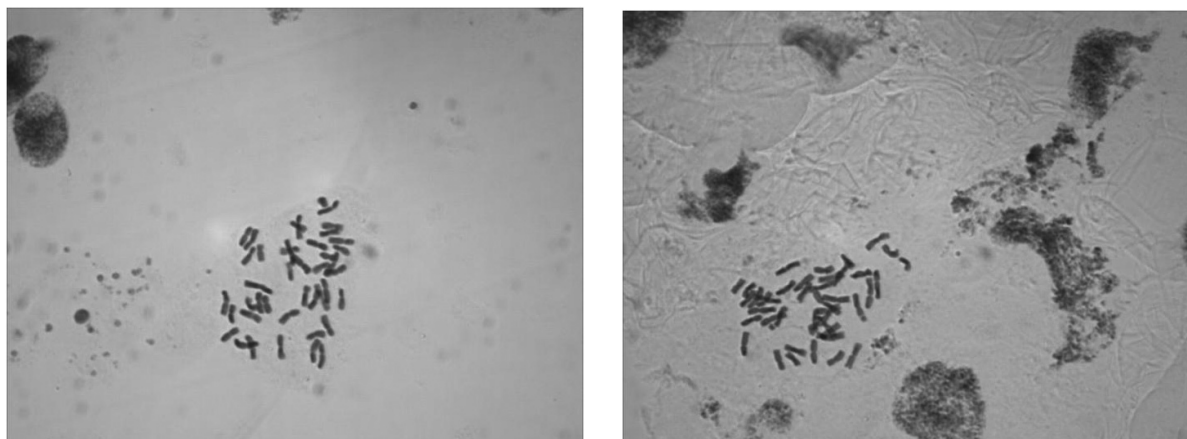


Рис. 2. Метафазні пластинки з чавленого препарату корінця паростка пирію *Thinopyrum intermedium*. $2n = 42$. Збільшення 400X

На початковому етапі роботи, перед аналізом електрофоретичних спектрів, немає інформації, які з компонентів спектра контролюються алелями одного гена (алельні гени, розташовані в одному локусі), які є продуктами різних генів, розташованих у різних локусах. Тому встановлення алельного складу генів є першим завданням при спробі визначення системи схрещування. Її можна встановити лише за можливості відрізнити гомозиготи від гетерозигот, тобто за умов кодомінування хоча б двох із множини алелів, якими представлений кожен даний ген у популяції. Вихідним для розрахунків є біном $(p + r)$, де p є частотою алеля a_1 , який продукує розглянутий компонент електрофоретичного спектра, а $r = 1 - p$ – частота відсутності цього компонента. Такий алель називається алелем a_0 . Відповідний компонент у спектрі з'являється, якщо рослина має алель a_1 у будь-якій дозі, тобто це випадок повного домінування.

Якщо ген представлений у популяції трьома алелями, два з яких продукують індивідуальні компоненти спектра, а третій є нуль-алелем, частоти трьох алелів розраховували за Бернштейном [10], виходячи з полінома $(p + q + r)^2$ за алгоритмом, наведеним у табл. 1, на прикладі компонентів 1 та 2 популяції 1. Фенотипний клас з двома компонентами спектра (h із табл. 1) потрібно враховувати, коли один з алелів гена є кластерним. Кластерний алель може контролювати появу на спектрі принаймні двох компонентів одночасно, як це видно з наведеного в табл. 2 прикладу для алеля a_3 (u). При чотирьох алелях частки генотипів та алелів визначали за алгоритмом [13].

Встановити, чи є гени, що кодуєть індивідуальні компоненти спектра, алельними, чи вони належать різним генам, можна за результатами вивчення розподілу попарних сполучень їх у популяції, базуючись на частотах компонентів

Таблиця 1. Алгоритм розрахунку частот алелів p , q та r для трьохалельного гена *Glu*

Алелі та їхні частки	a_1 (p)	a_2 (q)	a_0 (r)		
Компонент на спектрі	1	2	0		
Генотипи зигот	$a_1a_1 + a_1a_0$	$a_2a_2 + a_2a_0$	a_0a_0	a_1a_2	Сума
Компонент на спектрі	1	2	0	1 + 2	
Частки генотипів	$p^2 + 2pr$	$q^2 + 2qr$	r^2		1
Емпіричний обсяг фенотипового класу та його літерне позначення	30 d	87 e	36 f	47 h	200 g

Таблиця 2. Алгоритм розрахунку частот алелів p , q та r для трьохалельного гена *Glu*, коли один алель є кластерним

Алелі та їхні частки	a_1 (p)	a_2 (q)	a_3 (u)	a_0 (r)	
Компонент на спектрі	1	2	1 + 2	0	
Генотипи зигот	$a_1a_1 + a_1a_0$	$a_2a_2 + a_2a_0$	a_1a_2	a_0a_0	Сума
Компонент на спектрі	1	2	1 + 2	0	
Частки генотипів	$p^2 + 2pr$	$q^2 + 2qr$	$u^2 + 2ur + 2up + 2uq + 2pq$	r^2	1
Емпіричний обсяг фенотипового класу	30 d	87 e	36 h	47 f	200 g

спектрів (табл. 3) та переводячи частоти в кількості варіантів через їхнє множення на обсяг вибірки. Вихідним завжди є припущення про контроль компонентів, що вивчаються, алелями різних генів. Використовували алгоритм перевірки нульової гіпотези, наведений у праці [13]. При порівнянні розподілів варіантів за фенотиповими класами, які формуються двома генами з алелями p (контролює компонент спектра) та r (нуль-алель), формуються 4 фенотипові класи (табл. 2), які можна розрізнити за результатами оцінки спектрів.

Для перевірки гіпотез про генетичний контроль компонентів електрофоретичних спектрів використовували метод χ^2 [14] для порівняння багатопільних таблиць, який дозволяє мати в таблиці до 20 % значень, менших за 5, що є актуальним

у нашій роботі (табл. 4). Якщо значення χ^2 не перевищує табличне значення критерію для рівня значущості 0,01 та відповідної кількості ступенів свободи, $df = k - 1$, де k – кількість фенотипових класів, вважали, що розглянуті компоненти спектра контролюються алелями, що належать різним генам та комбінуються вільно. Коли значення χ^2 перевищувало відповідне табличне, гіпотезу про незалежність генів, що контролюють розглянуті компоненти, відкидали. У такому випадку перевіряли гіпотезу про те, що контроль компонентів спектра здійснюється одним геном із більше ніж двома алелями (табл. 4).

За результатами порівняння розподілів, немає серед генів таких, що комбінуються незалежно, тобто є різними (табл. 5, А). У двох випадках із 15 порівнянь (комбінування компонентів 4 та 5

Таблиця 3. Частоти компонентів електрофоретичного спектра глютенінів у популяціях пирію

Номер компонента	Частоти p_i компонентів у популяціях			
	1*	3	4	5
1	0,18±0,027	0,18±0,029	0,22±0,044	0,39±0,039
2	0,38±0,034	0,33±0,035	0,19±0,041	0,15±0,029
3	0,33±0,033	0,13±0,025	0,27±0,047	0,28±0,036
4	0,11±0,022	0,09±0,021	0,09±0,031	0,10±0,023
5	0,28±0,032	0,44±0,037	0,034±0,05	0,18±0,031
6	0,11±0,022	0,08±0,02	0,15±0,038	0,09±0,022

* Всі наведені у статті розрахунки виконано із залученням частот генів *Glu*, встановлених для популяції 1.

Таблиця 4. Зразки формування фенотипових класів у спектрах глютенінів за умов різної кількості алелів у гені *Glu*

Фенотиповий клас	Розрахований обсяг	Обсяг, що спостерігається	Значення χ^2 -квадрата та рівень значущості
Ген має два алелі			
12	10	23	14,7
1	6	6	$p < 0,01$
2	21	18	
0	13	3	
Ген має три алелі			
0	4	1	17,82
1	6	0	$0,01 < p < 0,05$
2	8	7	
3	6	2	
12	7	5	
13	5	6	
23	7	11	
123	6	18	
Чотири алелі, один із них кластерний			
0	4	1	11,82
1	5	0	$p > 0,05$
2	6	7	
3	45	2	
12	8	5	
13	6	6	
23	9	11	
123	8	18	

і 4 та б) фактичне значення χ^2 не дає змоги ні спростувати нульову гіпотезу, ні прийняти її. З вихідних даних видно, що невідповідність фактичних та очікуваних обсягів фенотипних класів виникає переважно за рахунок нестачі спектрів зі сполученням одного компонента спектра з будь-яким іншим.

Як альтернативу розглядали дві гіпотези в порядку їхнього ускладнення. Перша: нестача класу зі сполученням двох компонентів спектра (у статті наведено результати розрахунків для сполучення лише компонента 1 з будь-яким іншим, табл. 5, Б) свідчить про алельність генів, які контролюють вказані компоненти. У такому випадку перевіряли комбінування двох різних генів, але не з двома, а з трьома алелями, один з яких є нуль-алелем, а кожен з інших кодує свій компонент

спектра. Таке припущення підтверджується одночасною нестачею класу з відсутніми обома компонентами спектра. У цьому випадку один із компонентів спектра завжди є спільним для двох генів, які перевіряються. Якщо величина χ^2 давала змогу прийняти цю гіпотезу, вважали, що комбінуються два різних гени по три алелі в кожному. Один із них є нуль-алелем, другий є таким, що контролює один і той самий компонент спектра з боку двох різних генів, а третій алель є таким, що контролює різні компоненти спектра.

Якщо перша альтернативна гіпотеза спростувалася, перевіряли другу. Вона полягала в тому, що один з алелів є кластерним та контролює появу на спектрі двох компонентів одночасно. Про таку ситуацію в контролі компонентів спектра переконливо свідчить надлишок рослин

Таблиця 5. Величини χ^2 під час перевірки гіпотези про генетичний контроль порівнюваних компонентів спектра неалельними генами

Компоненти, сполучення яких перевіряється	Значення χ^2 -квадрата та рівень значущості	Компоненти, сполучення яких перевіряється	Значення χ^2 -квадрата та рівень значущості
А. Два двоалельні гени			
1 та 2	14,70, $p < 0,01$	2 та 6	29,62, $p < 0,01$
1 та 3	14,52, $p < 0,01$	3 та 4	25,95, $p < 0,01$
1 та 4	18,78, $p < 0,01$	3 та 5	21,66, $p < 0,01$
1 та 5	13,76, $p < 0,01$	3 та 6	22,90, $p < 0,01$
1 та 6	14,06, $p < 0,01$	4 та 5	10,53, $0,05 > p > 0,01$
2 та 3	27,91, $p < 0,01$	4 та 6	8,81, $0,05 > p > 0,01$
2 та 4	33,24, $p < 0,01$	5 та 6	34,954, $p < 0,01$
2 та 5	28,93, $p < 0,01$	–	–
Б. Два трьохалельні гени			
(0, 1, 2) та 3	17,82, $0,01 < p < 0,05$	(0, 1, 3) та 5	20,41, $p < 0,01$
(0, 1, 2) та 4	14,79, $0,01 < p < 0,05$	(0, 1, 3) та 6	28,12, $p < 0,01$
(0, 1, 2) та 5	16,38, $0,01 < p < 0,05$	(0, 1, 4) та 5	13,32, $p < 0,05$
(0, 1, 2) та 6	25,40, $p < 0,01$	(0, 1, 4) та 6	17,62, $0,01 < p < 0,05$
(0, 1, 3) та 4	13,30, $p < 0,05$	(0, 1, 5) та 6	26,23, $p < 0,01$
В. Два гени з чотирма алелями, один з яких є кластерним			
(0, 1, 2, 3) та 1-2	11,82, $p > 0,05$	(0, 1, 3, 5) та 1-3	14,26, $0,01 < p < 0,05$
(0, 1, 2, 4) та 1-2	9,37, $p > 0,05$	(0, 1, 3, 6) та 1-3	19,98, $p < 0,01$
(0, 1, 2, 5) та 1-2	11,60, $p > 0,05$	(0, 1, 4, 6) та 1-4	10,79, $p > 0,05$
(0, 1, 2, 6) та 1-2	17,57, $0,01 < p < 0,05$	(0, 1, 5, 6) та 1-5	21,02, $p < 0,01$

Таблиця 6. Частоти алелів генів, що контролюють компоненти спектра 1–6 за умов трьохалельності генів

Частоти алелів генів, що кодують вказані компоненти спектра								
компоненти спектра	12	13	14	15	16	23	24	25
p^*	0,1389	0,1409	0,1593	0,1402	0,1497	0,3162	0,3414	0,3350
q	0,3414	0,2957	0,0881	0,2362	0,0782	0,2632	0,0698	0,2265
r	0,5193	0,5629	0,7524	0,6230	0,7718	0,4236	0,5883	0,4392
Частоти алелів генів, що кодують вказані компоненти спектра								
компоненти спектра	26	34	35	36	45	46	56	
p	0,4080	0,3072	0,2654	0,3136	0,0742	0,0899	0,2174	
q	0,2165	0,0883	0,2057	0,0893	0,2389	0,0807	0,0478	
r	0,3752	0,5788	0,5274	0,5970	0,6865	0,8228	0,7337	

* p – кодує перший компонент спектра із вказаної пари, q – кодує другий компонент спектра із вказаної пари, r – нуль-алель.

Таблиця 7. Частоти алелів генів, що контролюють компоненти спектра 1–6 за умов трьохалельності генів

Частоти алелів генів, що кодують вказані компоненти спектра								
компоненти спектра	12	13	14	15	16	23	24	25
<i>u</i> *	0,0457	0,0435	0,0241	0,0443	0,0343	0,0799	0,0458	0,0549
<i>p</i>	0,1357	0,1379	0,1574	0,1372	0,1472	0,2997	0,3337	0,3246
<i>q</i>	0,3338	0,2894	0,0871	0,2312	0,0769	0,2531	0,0682	0,2205
<i>r</i>	0,4848	0,5292	0,7314	0,5874	0,7416	0,3674	0,5523	0,4000
Частоти алелів генів, що кодують вказані компоненти спектра								
компоненти спектра	26	34	35	36	45	46	56	
<i>u</i>	0,0359	0,0257	0,0774	0,0229	0,0413	0,0252	0,0648	
<i>p</i>	0,4155	0,3072	0,2555	0,3100	0,0726	0,0888	0,2106	
<i>q</i>	0,2205	0,0883	0,1980	0,0883	0,2341	0,0860	0,0463	
<i>r</i>	0,3965	0,5788	0,4690	0,5788	0,6519	0,8000	0,6782	

* *u* – кластерний алель, кодує два компоненти спектра, *p* – кодує перший компонент спектра із вказаної пари, *q* – кодує другий компонент спектра із вказаної пари, *r* – нуль-алель.

у класі зі сполученням двох компонентів. Якщо жодний з елементів кластера не кодує компонент спектра, такий алель є нуль-алелем. Коли один елемент кластера дає білковий продукт, а другий не дає, маємо один компонент на спектрі. Під час перевірки цієї гіпотези кількість алелів зростає до чотирьох (табл. 5, В).

Першу альтернативну гіпотезу перевірили для всіх сполучень компонентів. Частки трьох алелів одного гена визначали за алгоритмом Бернштейна (табл. 6).

Після встановлення часток алелів за умов трьохалельності генів вивчили відповідність розповсюдження в популяції часток генотипів, що складаються з різних алелів, полінома $(p + q + r)^2$ на основі розрахованих часток алелів (табл. 6). Кількість фенотипних класів зростає до 8, $df = 7$. Якщо між фактичними та розрахованими обсягами фенотипових класів розбіжностей немає, гіпотеза про контроль двох компонентів спектра одним геном із трьома алелями приймається.

З табл. 5, Б видно, що виявляються три гени, які можна було б розглядати як трьохалельні: ген з алелями 1, 3, 0 незалежно комбінується з геном з алелями 1, 4, 0. Так само останній ген комбінується з геном з алелями 1, 5, 0. Однак гени 1, 3, 0 та 1, 5, 0 не комбінуються незалежно, отже, умова трьохалельності хоча б для одного з них не є оптимальною. Для всіх інших сполучень пар компонентів гіпотеза про трьохалельний склад гена не проходить. У всіх випадках маємо надлишок у генотипному класі зі сполученням двох компонентів. Тому дослідження алельного складу генів слід продовжити із залученням другої альтернативної гіпотези. Частоти алелів за умов чотирьохалельності генів, один з яких кластерний, наведено в табл. 7.

Після визначення частот алелів чотирьохалельних генів перевірили гіпотезу про незалежне комбінування двох пар різних генів з чотирма

алелями в кожному, причому один із них – кластерний (табл. 5, В). Кількість фенотипних класів залишається такою самою, як у попередній гіпотезі про трьохалельність генів.

Розгляд результатів перевірки комбінування гена з алелями 1-2, 1, 2, 0 зі всіма іншими генами, які як один з алелів мають той, що кодує компонент 1, дає змогу припустити, що незалежних генів може бути чотири: один ген із вже наведеним алельним складом, другий ген з алелями 1-3, 1, 3, 0, третій ген з алелями 1-4, 1, 4, 0 та четвертий ген з алелями 1-5, 1, 5, 0. Проте немає незалежного комбінування між гіпотетичними генами 1-3 та 1-5. Це дає змогу вважати, що компонент 3 чи 5, чи обидва входять до складу гена (генів) із більш складною структурою за кількістю алелів чи складом кластерного алеля.

На вибірці з п'ятдесяти рослин не можна надалі ускладнювати модель про алельний склад генів. Тому остаточним на цьому етапі дослідження є висновок, що компоненти глютенінового спектра контролюються трьома незалежними генами: *Glu-Thi1-2* з алелями 1-2, 1, 2, 0, *Glu-Thi1-4* з алелями 1-4, 1, 4, 0 та *Glu-Thi1-3-5*, який може кодувати не два продукти спектра, а принаймні три – 1, 3 та 5. Участь трьох генів у формуванні електрофоретичного спектра глютенінів добре узгоджується з гексаплоїдною природою пирію середнього, яка впливає з його кількості хромосом 42.

Гіпотеза про незалежне попарне комбінування генів з чотирма алелями, один з яких є кластерним, не може бути прийнятою і у всіх випадках, коли одним із компонентів спектра є 6. Без проведення додаткових досліджень цей компонент не можна використовувати в подальших розрахунках, оскільки не встановлено його генетичний контроль. Отримана інформація щодо кількості генів, які кодують компоненти глютенінового спектра, та їхнього алельного складу

може бути використана для визначення системи схрещування, властивої виду.

Система схрещування особин залежить від біологічних властивостей виду. Це може бути самозапилення, коли жіночі та чоловічі гамети, що утворюють зиготу, належать одній і тій самій рослині. Тоді система схрещування характеризується як самозапіднення. Це може бути ауткросинг, коли зигота формується з гамет, які були сформовані різними рослинами. Така система схрещування характеризується як перехресне запліднення. Ауткросинг буває облігатний, тобто самозапіднення не відбувається ніколи, і це закладено генетично в біологічних властивостях виду. Ауткросинг буває факультативним. У такому випадку поряд із перехресним заплідненням можливо і самозапіднення. Така система схрещування називається змішаною.

Якщо рослинний вид залучається до генетичних досліджень, однією з перших його властивостей, яку слід визначити для правильної постановки експерименту та адекватного аналізу результатів, є система схрещування. Достовірної інформації про систему схрещування у *Thynopyrum intermedium* у літературі немає. Отже, її визначення є необхідним перед тим, як на цьому виді виконуватимуться генетичні дослідження.

Систему схрещування вивчають шляхом дослідження частот генів (алелів), що контролюють певну ознаку, та генотипів, які трапляються в окремій популяції виду. Для цього передовсім потрібно встановити генетичний контроль ознаки, що вивчається. Для визначення систем схрещування придатні лише такі ознаки, що контролюються алелями з кодомінуванням або проміжним домінуванням, тому що гетерозигота за фенотипом обов'язково має відрізнятися від обох гомозигот. Гени, що контролюють біохімічні ознаки, зокрема запасні білки, здебільшого задовольняють цю вимогу, якщо окремі алелі генів оцінювати за рухливістю білкового продукту при електрофорезі в поліакриламідному гелі.

Система схрещування відбивається безпосередньо на частотах генотипів у популяції. Якщо виду властива змішана система схрещування, при одних і тих самих частотах алелів частоти генотипів відрізнятимуться залежно від того, з якою частотою відбувається самозапіднення. Імовірність самозапіднення в популяції зі змішаною системою схрещування визначають за формулою

$$F = \frac{H_0 - H}{H_0},$$

де F є показником інбридингу в популяції [10].

Інбридинг не є синонімом самозапіднення, цей термін означає підвищену частоту об'єднання гамет загального походження. Тому F та ω – різні показники, хоча й пов'язані один з одним функціонально.

Для визначення системи схрещування потрібно, використовуючи встановлені за результатом оцінки вибірки особин із популяції частоти алелів певного гена, розрахувати теоретичну кількість гетерозигот за даним геном. Теоретична кількість гетерозигот, розрахована на підставі частот алелів цього гена, встановлених для даної популяції, порівнюється з кількістю фактичною, встановленою за результатами оцінки всіх рослин вибірки, і на підставі цього порівняння розраховується величина F за формулою

$$F = \frac{H_0 - H}{H_0},$$

де H є величиною гетерозиготності, що спостерігається при оцінці генотипу рослин вибірки, а H_0 – величина гетерозиготності, розрахована як $2pq$ на основі встановлених у дослідженні частот кодомінантних алелів p та q [10].

Наведені результати встановлення частот генів та генотипів у популяції 1 показують, що сполучення генів 12, 13, 14 та 15 формально можна описати за трьохалельною моделлю, ігноруючи наявність кластерного, четвертого алеля (табл. 5, Б). Таке спрощення моделі у порівнянні з доведеною нами чотирихалельною моделлю для двох генів із трьох, *Glu-Thi1-2* та *Glu-Thi1-4*, і ще більш складною моделлю для гена *Glu-Thi1-3-5* потрібно для того, щоб визначити систему схрещування пирію. Справді, при визначенні частот алелів за цими генами частота кластерного алеля u встановлена як 0,0457, 0,0435, 0,0241 та 0,0443, відповідно (табл. 7). Частота алеля, менша за 0,05, дає змогу виключити його з переліку алелів поліморфного гена, якщо прийняти рівень значущості 0,05 для вибірки, з якою працюємо [10]. Обсяг нашої вибірки, 50 рослин, не дає змоги прийняти в розрахунках більш жорсткий рівень значущості.

Спираючись на частоти алелів вказаних генів, розраховали теоретичні кількості гетерозигот $2pq$ для генів з алелями 1 (p) та 2 (q), 1 (p) та 3 (q), 1 (p) та 5 (q) за алелями з кодомінуванням (табл. 8). Емпіричну кількість визначали як відношення обсягу відповідного генотипного класу до обсягу вибірки, який становить 50. Ген з алелями 1 та 4 довелося виключити, оскільки гетерозигот із таким сполученням у популяції знайдено не було.

Таблиця 8. Результати визначення системи схрещування за частотами генів та генотипів у популяції пірію середнього

Показники	Гени з алелями		
	1 та 2	1 та 3	1 та 5
<i>p</i>	0,1357	0,1379	0,1372
<i>q</i>	0,3338	0,2894	0,2312
<i>r</i>	0,4848	0,5292	0,5874
$2pq (H_0)$	0,0906	0,0798	0,0634
<i>H</i>	0,06	0,06	0,02
<i>F</i>	0,34	0,25	0,6847
ω	0,50	0,40	0,81

Отримані величини ω показують, що рослинам вивченої популяції пірію середнього притаманна змішана система схрещування і ймовірність самозапилення коливається від 0,50 до 0,81 залежно від гена, за яким визначали гетерозиготність.

Висновки

Рослини пірію середнього з популяції 1–6 містять 42 хромосоми, тобто є гексаплоїдними. Компоненти глютенінового спектра пірію середнього кодуються принаймні трьома генами з кількістю алелів три–чотири, один з яких є кластерним, а інший – нуль-алелем. Спрощену, трьохалельну модель за генами, що кодують компоненти спектра 1 та 2, 1 та 3, 1 та 5, можна застосовувати для визначення системи схрещування пірію середнього, оскільки вони формують гетерозиготу, яка відрізняється від гомозигот на фенотипному рівні. Пірію середньому притаманна змішана система схрещування з імовірністю самозапилення 0,50–0,81.

Список літератури

- Li GK, Liu C, Li Ch-H, Zhao J-M, Zhou L, et al. Introgression of a novel *Thinopyrum intermedium* St-chromosome-specific HMW-GS gene into wheat. *Mol Breeding*. 2013;31:843–53.
- Rodomi O, Braun H-J, Jose C. Wheat genetic resources enhancement by the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2008;55:1095–140.
- Li G, Wang H, Lang T, Li J. New molecular markers and cytogenetic probes enable chromosome identification of wheat-*Thinopyrum intermedium* introgression lines for improving protein and gluten contents. *Planta*. 2016;244(4). DOI: 10.1007/s00425-016-2554-y
- Danilova TV, Zhang G, Liu W, Friebe B. Homoeologous recombination-based transfer and molecular cytogenetic mapping of a wheat streak mosaic virus and Triticum mosaic virus resistance gene *Wsm3* from *Thinopyrum intermedium* to wheat. *Theor Appl Genet*. 2016;130(3). DOI: 10.1007/s00122-016-2834-8
- Houyang K, Li D, Tang L, Diao Ch. Cytogenetic study and stripe rust response of the derivatives from a wheat-*Thinopyrum intermedium* – *Psathyrostachys huashanica* trigenic hybrid. *Genome*. 2016;60(5). DOI: 10.1139/gen-2016-0135
- Li H, Conner R, Qin Ch. Promising genetic resources for resistance to wheat streak mosaic virus and the wheat curl mite in wheat-*Thinopyrum* partial amphiploids and their derivatives. *Genet Res Crop Evol*. 2004;51:827–35.
- Ayala L, Henry M, González-de-León D. A diagnostic molecular marker allowing the study of *Th. intermedium*-derived resistance to BYDV in bread wheat segregating populations. *Theor Appl Genet*. 2001;102:942–9.
- Ayala-Navarrete L, Thompson N, Ohm H. Molecular markers show a complex mosaic pattern of wheat-*Thinopyrum intermedium* translocations carrying resistance to YDV. *Theor Appl Genet*. 2010;121:961–70.
- He R, Chang Zh, Yang Z. Inheritance and mapping of powdery mildew resistance gene *Pm43* introgressed from *Thinopyrum intermedium* into wheat. *Theor Appl Genet*. 2009;118:1173–80.
- Ли Ч. Введение в популяционную генетику. Москва: МИР; 1978, 554 с.
- Герус ДЕ, Агафонов АВ. Генетическое разнообразие в природных популяциях *Elymus fibrosis* (*Triticeae: Poaceae*) по запасным белкам эндосперма. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2011;15(3):531–9.
- Waninge J. A modified method of counting chromosomes in root tip cells of wheat. *Euphytica*. 1965;14:249–50.
- Martynenko VS, Yegorova TV, Ternovskaya TK. Genetic analysis of a cross-pollinated species, *Secale cereale* L., for the character with polymorphic genetic basis. *Tsitol Genet*. 2004;38(3):29–37.
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. ЮА Данилова. Москва: Практика; 1999, 459 с.

M. Antonyuk, A. Lisnichuk, L. Onuk, V. Shpylchyn, T. Pasichnyk, T. Ternovska

GENOME PLOIDY AND MATING SYSTEM IN THE POPULATION OF *THINOPYRUM INTERMEDIUM*

Aim. *Thinopyrum intermedium*, a wild wheat relative, for some reasons is of interest for its involvement to the introgressive hybridization with wheat. The basis for the purposeful work in this direction should be the information about the biological and genetic properties of the species, including the mating system. The mating system can be identified based on the genotyping of plants in populations for a polymorphic gene with codominant inheritance. Gene *Glu* was used as such a codominant gene. **Methods.** Cytological (determination of the chromosome number in metaphases of mitosis), electrophoresis of glutenin storage proteins, comparative analysis of electrophoretic spectra, and the population genetic methods for calculating the frequencies of genes and genotypes. **Results.** Plants were hexaploid, with $2n = 42$ chromosomes. In a sample of fifty plants, a genetic control of components of the glutenin spectra has been established. They are controlled by three independent genes: *Glu-Thi1-2* with four alleles 1-2 (cluster), 1, 2, 0, *Glu-Thi1-4* with

four alleles 1-4 (cluster), 1, 4, 0, and the three-allele gene *Glu-Thi1-3-5*. The participation of the three genes in the formation of the electrophoretic spectrum of glutenins is consistent with the hexaploid nature of *Thinopyrum intermedium*, which follows from the established number of 42 chromosomes. The information about the genetic control of glutenins is the basis for determining the mating system of this species. A simplified three-allele model of genetic control of glutenins' electrophoretic spectra was used for determination of the mating system of *Thinopyrum intermedium*. **Conclusions.** Plants of the studied *Thinopyrum intermedium* population have a mixed mating system and the probability of self-pollination ranging from 0,50 to 0,81, depending on the *Glu* gene, which is used for determination of heterozygosity of the plants. This biological characteristic is positive for prospective use of this species for wide hybridization.

Keywords: *Thinopyrum intermedium*, polymorphism, mating system, glutenins, gene frequency in the population.

Матеріал надійшов 17.05.2019