

ДИСКРИМІНАЦІЯ МУТАЦІЙ *iw2* ТА *iw3*, ЩО ВИКЛИКАЮТЬ ЗМІНУ ФЕНОТИПУ ЗА ВОСКОВОЮ ОСУГОЮ, ЗА ДОПОМОГОЮ IRAP- ТА REMAP-ТЕХНОЛОГІЙ

Раніше було встановлено, що зміна прояву ознаки наявність/відсутність воскової осуги пов'язана з мутаціями у двох генах: мутація $Iw3 \rightarrow iw3$ призводить до перетворення морфотипу «зелена рослина» на морфотип «зелений колос – блакитне листя», мутація $Iw2 \rightarrow iw2$ – до перетворення морфотипу «зелений колос – блакитне листя» на морфотип «блакитна рослина». Метою дослідження було з'ясувати, яка саме мутація – $Iw3 \rightarrow iw3$ чи $Iw2 \rightarrow iw2$ – є критичною для зміни фенотипу амфідиплоїда Авротіка «зелений колос – блакитне листя» на «блакитна рослина». Щоб з'ясувати, чи має хромосома 1В (ген $Iw3$) якийсь стосунок до перетворення морфотипу «зелений колос – блакитне листя» на морфотип «блакитна рослина», здійснили пошук поліморфізму в зразках гібридів F_1 від схрещування рослин Авротіка 2 (Авротіка 2 зелена \times Авротіка 2 блакитна) та рослинах вихідного компонента схрещування Авротіка. Аналіз провели, використовуючи методику із застосуванням молекулярних маркерів IRAP та REMAP, а також модифікацію методу REMAP. Результати ампліфікації ДНК рослин Авротіка та її гібридів F_1 з сортом Аврора з праймерами, підібраними для реалізації методів IRAP та REMAP, дали змогу зіставити поліморфізм, наявний у спектрах ампліконів, з різницею в градації ознаки наявність/відсутність воскової осуги. Встановлено, що хромосома 1В (ген $Iw3$) не задіяна в перетворенні морфотипу «зелений колос – блакитне листя» на морфотип «блакитна рослина».

Ключові слова: пшеничний амфідиплоїд, воскова осуга, фенотипна мінливість, IRAP, REMAP.

Наявність зовнішнього захисного шару кутикулярних восків на поверхні рослин відіграє важливу роль у формуванні стійкості до різних стресів. Наявність кутикули забезпечує захист від механічних пошкоджень шкідниками, підвищуючи стійкість до вірусів, бактеріальних агентів, мікроскопічних грибів. Еволюційно кутикула є одним з ароморфозів, набутих рослинами при переході з водного середовища існування, тому основною функцією рослинної кутикули є запобігання випаровуванню води з поверхні епідерми для підтримки тургору клітин в умовах недостатнього зволоження. За цим принципом з кутикулою асоційована стійкість до температурних змін: кутикулярні воски трапляються як серед ксерофітів, що ростуть за надмірної сонячної радіації, так і серед кріофітів, що зазнають впливу низьких температур [1]. Усі типи восків синтезуються в клітинах епідермісу, транспортуються в позаклітинний простір і осідають на кутикулі. Синтез восків та їх експорт перебувають під жорстким контролем, що залежить від умов навколишнього середовища [1].

Синтез довголанцюгових жирних кислот, попередників восків, та асоційовані з ним шляхи збігаються у вищих рослин і контролюються

подібними молекулярними механізмами. У кукурудзи (*Zea mays* L.) гени восків *GLOSSY1* (*GL1*), *GL2*, *GL4* та *GL8* є ортологами генів арабідопсису (*Arabidopsis thaliana* L.) *ECERIFERUM3* (*CER3*), *CER2*, *CER6* та β -кетואцил-*CoA* редуктази 1 (*KCR1*), відповідно [2]. Транскрипційний фактор (ТФ) *GL15* у кукурудзи контролює зміну складу восків при переході від молодого до дорослого листа, а ТФ *OCL1* з родини HD-ZIP IV регулює біосинтез кутикулярного воску шляхом активації жирної ацил-*CoA*-редуктази та гіпотетичного воскового транспортера [3].

Ячмінь (*Hordeum vulgare* L.) та пшениця м'яка (*Triticum aestivum* L.), на додаток до згаданих шляхів, використовують паралельний шлях біосинтезу для отримання хентріаконтану-14,16-діону (також відомий як β -дикетон) та його похідних. У пшениці шляхи синтезу довголанцюгових жирних кислот активні протягом вегетативної фази, а під час репродуктивної переважає β -дикетонний шлях. Вважається, що β -дикетон синтезується з використанням C14 та C16 жирних кислот як попередників [4].

У пшениці м'якої (*T. aestivum*, геном AABBDD) відомо дві ортологічні серії генів, які кодують інгібітори восків (*Iw*) та два гени – активатори синтезу

восків (*W*). Експресія саме цих генів лежить в основі варіації ознаки наявність/відсутність воскової осуги. Гени *Iw1* та *Iw2* функціонують як інгібітори локусів *W1* і *W2*, а також можуть інгібувати інші гени, залучені до синтезу восків. Гени *W1* та *Iw1* розташовуються на хромосомі 2BS на відстані 2 сМ. Гени *W2* та *Iw2* локалізовані на хромосомі 2DS, локус *W2* розташований поблизу центромери [5]. У пшениці твердої (*T. turgidum subsp. durum*, геном AABB) у дистальному відділі плеча хромосом 1BS ідентифіковано третій інгібітор воску, ген *Iw3* [6].

Втрата функціональних алелів *W* генів або наявність домінантних алелів генів *Iw*, епістатичних до генів серії *W*, спричиняє виснаження β -дикетонів та появу фенотипу, який характеризується відсутністю осуги. У той час як ліквідація β -дикетонів під впливом *Iw1* та *Iw2* компенсується збільшенням синтезу альдегідів та первинних спиртів, *Iw3* інгібує β -дикетони та зменшує кількість первинних спиртів, але збільшує кількість альдегідів і алканів кутикули [7].

Майже всі сорти м'якої пшениці, що мають осугу, несуть домінантні алелі *W1* і *W2* і не мають генів *Iw1* та *Iw2*. Це вважається підставою для твердження, що донор D-геному м'якої пшениці *Aegilops tauschii* мав рецесивний алель *iw2*.

Локус *Iw2* в основному визначає в *Aegilops tauschii* внутрішньовидові варіації осуги, й рослини з проявом ознаки мають генотип *W2W2iw2iw2* [8]. Ген *Iw3*, як і інші члени ортологічних серій *Iw* (інгібіторів воскової осуги), є епістатичним до членів серії *W* (активаторів воскової осуги), що було підтверджено раніше при схрещуванні різних за ознакою наявність/відсутність воскової осуги морфотипів Авротіки один з одним та з сортом Аврора [9]. У статті наведено результати вивчення контрастних за ознакою наявність/відсутність воскової осуги фенотипів Авротіки з використанням ДНК-маркування за технологіями REMAP, IRAP з метою з'ясувати, яка саме мутація, *Iw3*→*iw3* чи *Iw2*→*iw2*, є критичною для зміни фенотипу амфідиплоїда Авротіка «зелений колос – блакитне листя» на «блакитна рослина».

Матеріали та методи

Авротіка – гексаплоїдний геномно-заміщений амфідиплоїд з геномом AABBTT, де AABB є тетраплоїдним компонентом пшениці м'якої сорту Аврора, а TT – геном диплоїдного егілопсу *Aegilops mutica* [10]. Матеріалом для дослідження слугували два її морфотипи, контрастні за ознакою наявність/відсутність воскової осуги,

гібриди F_1 від схрещування рослин морфотипу Авротіки із зеленим колосом (без осуги) та блакитним листям (з осугою), а також рослини наступної генерації тієї самої лінії Авротіки, які не мали розщеплюватися за досліджуваною ознакою, тому що були гомозиготними за своїм походженням. Оцінку рослин компонентів схрещування та F_1 за ознакою інтересу проводили візуально на рослинах, вирощених у польових умовах, на онтогенетичній фазі колосіння в травні 2017 р. Пізніше, на стадії воскової стиглості, від індивідуальних рослин досліджуваних популяцій добирали листя та зберігали їх у рідкому азоті для подальшого виділення з них ДНК.

Метод дослідження полягав у визначенні поліморфізму ДНК, виділеної з контрастних за фенотипом зразків, методами IRAP (Inter Retrotransposone Amplified Polymorphism) та REMAP (Retrotransposone Microsatellite Amplified Polymorphism). Перший варіант передбачає проведення полімеразно-ланцюгової реакції з праймерами, що є компліментарними до довгих термінальних повторів LTR ретротранспозонів. Ці послідовності є висококонсервативними і тому зручними для пошуку поліморфізму в геномах [11,12]. Застосування REMAP передбачає використання праймерів до фрагмента LTR ретротранспозона та мікросателітного повтору [11,13].

Виділення ДНК проводили з листків з використанням ЦТАБ буфера. Вміст ДНК визначали на приладі СФ-2000, концентрацію – за формулою: $C = D_{260} * K * x$, де D_{260} – показник поглинання нуклеїнових кислот; K – коефіцієнт (50 для ДНК); x – розведення.

Зразки для проведення реакції ампліфікації загальним об'ємом 20 мкл готували на льодяній бані. Компоненти суміші: буфер 2,5 мкл, dNTPs 2,5 мкл, $MgCl_2$ (25 мМ) 1,5 мкл, Taq Pol (5u/мкл) 0,2 мкл, праймер R 2 мкл, праймер L 2 мкл, dH_2O 9,3 мкл. Реакція ПЛР проводилася в ампліфікаторі Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler. Умови проведення ампліфікації: 94 °C (94 °C – 30 с денатурація – 56 °C – 60 с аннелінг – 72 °C – 120 с елонгація) 30 циклів, 72 °C – 600 с (10 хв).

Серед використаних у роботі праймерів до мікросателітних послідовностей WMC702 є специфічним до 2В хромосоми, WMC419 та WMC156 – до 1В хромосоми пшениці м'якої (табл. 1). Усі інші мікросателітні послідовності, підібрані для роботи, є розкиданими по геному пшениці і застосовувалися для збільшення кількості компонентів у спектрах ампліконів. Щодо транспозонів було підібрано праймери до їхніх довгих термінальних повторів (табл. 2).

Таблиця 1. Характеристика використаних праймерів до мікросателітних послідовностей

Назва праймера	Послідовності	Tm
(CT)9G	CTC TCT CTC TCT CTC TCT G	65,2
(CA)9G	CAC ACA CAC ACA CAC ACA G	52,5
WMC419F	GTT TCG GAT AAA ACC GGA GTG C	60,3
WMC419R	ACT ACT TGT GGG TTA TCA CCA GCC	60,3
WMC156F	GCC TCT AGG GAG AAA ACT AAC A	62,7
WMC156R	TCA AGA TCA TAT CCT CCC CAA C	62,7
WMC702F	GAA TCA CAT CGA ATG GAT CTC A	61
WMC702R	GAG GCC TTT TTC GAT ATT CTG C	61

Таблиця 2. Характеристика використаних праймерів до довгих термінальних повторів ретротранспозонів

Назва праймера	Послідовності	Tm
Nikita	CGC ATT TGT TCA AGC CTA AAC C	58,4
Nikita old	CGC TCC AGC GGT ACT GCC	62,8
LTR6149	CTCGCTCGCCCACTACATCAACCGCGTTTATT	70,8
LTR6150	CTGGTTCGGCCCATGTCTATGTATCCACACATGTA	70,6
COPIAR	TTG AAC CCC TTT TGA TGT AT	51,1
COPIAF	GAT GCT CCT TGC CTA TGC TA	57,3
Sabrina	GCA AGC TTC CGT TTC CGC	58,2
5'LTR1	TTGCCTCTAGGGCATAATTCCAACA	61,3
5'LTR2	ATCATCCCTCTAGGGCATAATTC	59,3
3'LTR	TGTTTCCCATGCGACGTTCCCCAACA	66,4
Sukkula	GAT AGG GTC GCA TCT TGG GCG TGA C	67,9
REMAPCAn	TTCGCCCTGGGCATAATTCCAACA	56

Продукти розділяли в 1,2–1,3 % агарозному гелі різних об'ємів (80, 100 та 270 мл) з додаванням 20 мкл (0,5 мг/мл) етидій броміду (40 мкл для гелю об'ємом 270 мл). Для отримання гелю агарозу розчиняли в однократному SB (sodium-borate) буфері. Гель-електрофорез проходив за напруги 60 V перші півгодини та 100 V до закінчення. Зразки змішували з буфером нанесення (бромфеноловий синій, ксилен ціанол та гліцерин). Використовували по 2,5 мкл маркерного розчину (M17 Sibenzyme®). Результати оцінювали за рахунок флуоресценції етидій броміду, що інтеркалював між основами ДНК.

Результати та обговорення

ДНК для аналізу було виділено з 8 рослин компонента схрещування, який є морфотипом Авротіки із зеленим колосом та блакитним листям, та 14 рослин гібридів F₁. Як впливає з даних про генетичний контроль ознаки наявності/відсутності воскової осуги, фенотип рослин F₁ від схрещування морфотипу Авротіки «зелений колос – блакитне листя» (домінантна ознака) з сортом Аврора, вкритим восковою осугою, тобто блакитним (рецесивна ознака), має збігатися з фенотипом Авротіки. Реально спостерігали розщеплення: 4 рослини із зеленим колосом

і блакитним листям та 10 блакитних рослин. Це підтверджує раніше встановлений факт успадкування ознаки наявності/відсутності воскової осуги з певними відхиленнями від очікуваного за законами Менделя спадкування моногенної ознаки [14]. Крім того, серед рослин компонента схрещування Авротіки спостерігали розщеплення на рослини вихідного морфотипу (зелений колос та блакитне листя) та повністю блакитні, як Аврора, рослини Авротіки. Отже, як було припущено раніше [14], у геномі рослин Авротіки відбуваються якісь молекулярні події, результатом яких є зміна прояву ознаки наявності/відсутності воскової осуги з доміантною (зелений колос та блакитне листя) на рецесивну (повністю блакитна рослина). За даними [15], зміна прояву ознаки пов'язана з мутаціями у двох генах: мутація у *Iw3*→*iw3* призводить до перетворення морфотипу «зелена рослина» на морфотип «зелений колос – блакитне листя», мутація *Iw2*→*iw2* – до перетворення морфотипу «зелений колос – блакитне листя» на морфотип «блакитна рослина».

Для з'ясування питання щодо того, чи має хромосома 1В (ген *Iw3*) якийсь стосунок до перетворення морфотипу «зелений колос – блакитне листя» на морфотип «блакитна рослина», здійснили пошук поліморфізмів у зразках гібридів F₁ від схрещування рослин Авротіки 2 (Авротіка 2

Таблиця 3. Використані праймери та їхні комбінації

№	Комбінація	№	Комбінація
1	Nikita x Nikita	15	Sukkula x Sukkula
2	Nikita x Reverse TY1	16	Sukkula x (CA)9G
3	Nikita x Reverse TY2	17	Sukkula x (CT)9G
4	Nikita x WMC 419F	18	Sukkula x REMAPCAn
5	Nikita x WMC 156F	19	Sukkula x WMC 419F
6	Nikita x REMAPCAn	20	Sabrina x Sabrina
7	Nikita x WMC702F	21	Sabrina x WMC 419F
8	Nikita old x Nikita old	22	Reverse TY1 x Reverse TY1
9	Nikita old x WMC 419F	23	Reverse TY2 x Reverse TY2
10	Nikita old x WMC 156F	24	Copia F x Copia R
11	Nikita old x (CA)9G	25	WMC 702F x WMC 702 R
12	Nikita old x (CT)9G	26	WMC 419F x WMC 419R
13	LTR 6150 x LTR 6150	27	REMAPCAn x REMAPCAn
14	LTR 6149 x LTR 6149		

Таблиця 4. Характеристика спектрів, отриманих із ПЛР за методом IRAP

Комбінації праймерів	Максимальна кількість компонентів	Розмір, п. н.	Кількість поліморфних компонентів
Sukkula x Sukkula	13	2481-366	0
Sukkula x REMAPCAn	18	3009-366	4
Sukkula x WMC419F	11	2481-366	0
WMC419F x WMC419R	3	< 366	0
Sukkula x (CA)9G	17	1650-366	1

зелена x Авротіка 2 блакитна) та рослинах вихідного компонента схрещування Авротіки. Аналіз провели, використовуючи методику із застосуванням молекулярних маркерів IRAP та REMAP, а також модифікацію методу REMAP. Перевернені 27 комбінацій праймерів (табл. 3) дали продукти ампліфікації лише для 5 із них (табл. 4).

При проведенні ПЛР із праймерами, специфічними до 1В хромосоми пшениці, було отримано мономорфні компоненти, незалежно від поліморфізму за ознакою наявності/відсутності осуги серед зразків (табл. 4). Це підтверджує отримані раніше висновки [15], що хромосома 1В не задіяна в перетворенні морфотипу «зелений колос – блакитне листя» на морфотип «блакитна рослина». Очікуваний розмір компонентів становив 141 п. н. для мікросателітного локусу *Xwmc419-1B* (рис. 1) та 211 п. н. для локусу *Xwmc156-1B*, що вказує на ефективність використання мікросателітів *Xwmc419-1B* та *Xwmc156-1B* як маркерних для хромосоми 1В.

Рослинний матеріал було проскринено методом IRAP із використанням праймерів до довгих термінальних повторів ретротранспозонів Sukkula та REMAPCAn у таких комбінаціях: Sukkula x Sukkula, Sukkula x REMAPCAn (табл. 4). Для зразків із Sukkula x Sukkula у спектрах ампліфікації отримали 13 компонентів. Поліморфних для ДНК компонентів схрещування та ДНК контрастних фенотипів серед рослин F_1 не було.

При ампліфікації Sukkula x REMAPCAn загальна кількість компонентів становила 18. Поліморфізм спостерігали для чотирьох із них з розміром приблизно 790 п. н. та 669–621 п. н. (табл. 4, рис. 2). У деяких зразках компонента розміром 790 п. н. не було, тоді як в інших спостерігали 1–3 компоненти. Подібний поліморфізм спостерігали і для компонентів розміром 669–621 п. н. (рис. 2). Поліморфізм за вказаними компонентами не залежить від варіювання осуги серед зразків і трапляється як серед блакитних, так і серед рослин із зеленим колосом. Отже, наявний поліморфізм за IRAP спектрами не пов'язаний з мутацією *Iw2*→*iw2*, яка, за даними [15], призводить до перетворення морфотипу «зелений колос – блакитне листя» на морфотип «блакитна рослина». Хоча раніше було показано, що для 2D хромосоми пшениці при використанні REMAPCAn спостерігається поліморфізм за компонентами спектра, що вказує на активність цього ретротранспозона в геномі Авротіки [9]. Отже, активність цього транспозона реєструється для гена *Iw2* хромосоми 2D та не виявляється для гена *Iw3* хромосоми 1В.

Продукти ампліфікації, одержані при комбінації праймерів для методу REMAP, або не демонстрували поліморфізму у спектрах узагалі (комбінації Sukkula x WMC419F та WMC419F x WMC419R), або поліморфним виявлявся лише один компонент (Sukkula x (CA)9G). В останньому випадку,

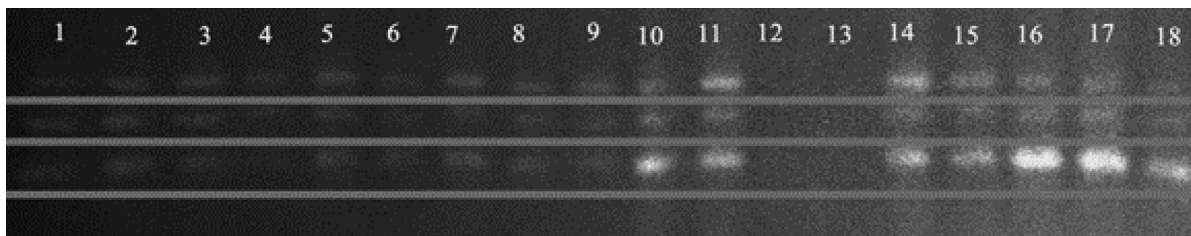


Рис. 1. Розподіл продуктів ПЛР при використанні праймера до мікросателітного локусу *Xwmc419-1B*.
1–4, 5–8, 9–12 – блакитні рослини, 13–14, 17–18 – рослини із зеленим колосом

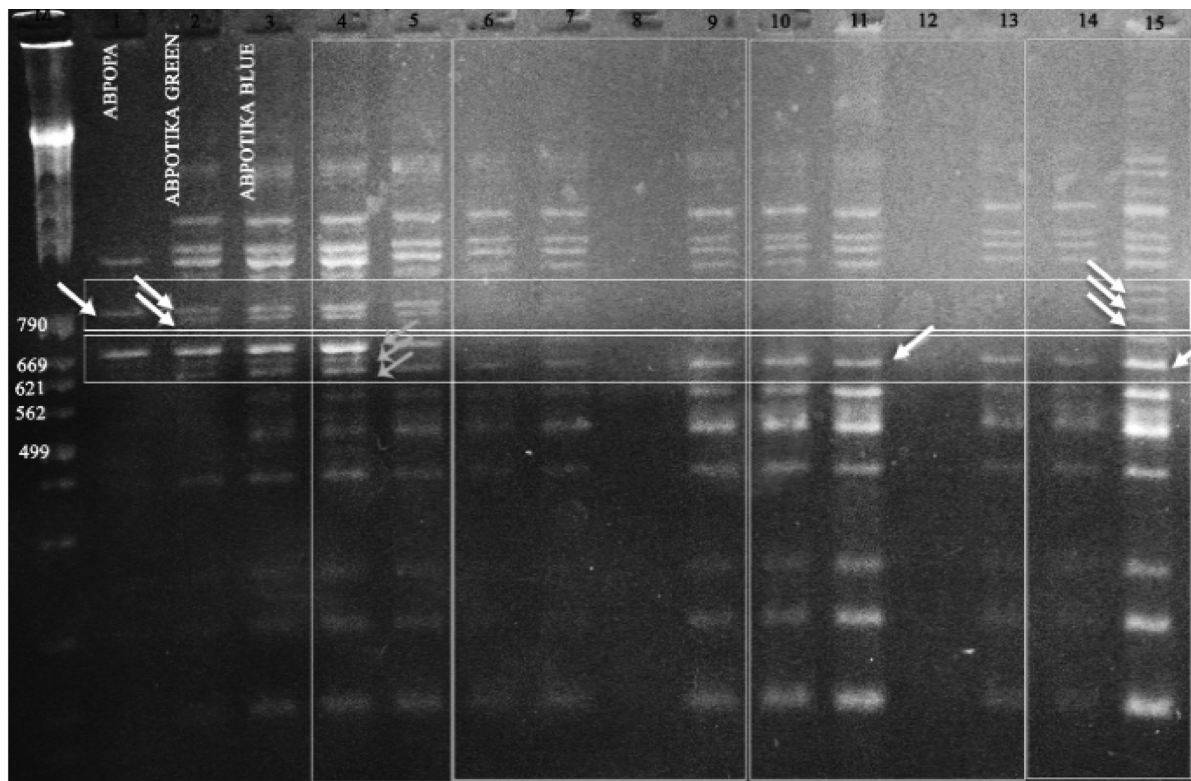


Рис. 2. Розподіл продуктів ПЛР за методом IRAP із комбінацією *Sukkula* x *REMAPCAn*.

На рис. 2–4 прямокутники відокремлюють матеріал, отриманий з однієї рослини.
Компоненти, для яких спостерігали поліморфізми, вказано стрілками. 1 – Аврора; 2 – Авротіка green;
3 – Авротіка blue; 4–5, 10–13, 16–15 – рослини із зеленим колосом та стеблом і листям з осугою;
6–9 – рослини з осугою; М – маркер молекулярних розмірів

як і для пари *Sukkula* x *REMAPCAn*, поліморфізм у спектрах ампліфікації ніяк не був пов'язаний із фенотипом рослин, з яких виділяли ДНК (табл. 4, рис. 3). Для комбінації *Sukkula* x (CA)9G отримали близько 17 компонентів, але один із них, розміром близько 1446 п. н., був наявний лише у зразках 13–16, 20–21 та 26–28 (рис. 3). У попередніх дослідженнях, що використовували *Sukkula* в поєднанні з мікросателітними праймерами, специфічними до 2D хромосоми пшениці, було показано відсутність поліморфізмів, а кількість компонентів коливалася від 10 до 16 [9].

У методі *REMAP* при ампліфікації з використанням праймерів до ретротранспозона *Sukkula* та до фланкуючих ділянок *SSR*

мікросателітних локусів, специфічних до 1В хромосоми (*Xwmc419*), не було помічено наявності поліморфних компонентів, у всіх зразках їх було 11 (рис. 4). Отже, як і можна було очікувати, ампліфікація із застосуванням праймерів мікросателітних локусів, специфічних до хромосоми 1В пшениці, не демонструє жодного зв'язку з фенотипним варіюванням серед рослин F_1 та Авротіки за ознакою інтересу. Це підтверджує висунуте раніше припущення [15], що зміна прояву ознаки в напрямку «зелений колос – блакитне листя» → «блакитна рослина» відбувається в результаті мутації *Iw2* → *iw2*, гена, розташованого на хромосомі 2D, і не пов'язана з мутацією розташованого в хромосомі 1В гена *Iw3* до *iw3*.

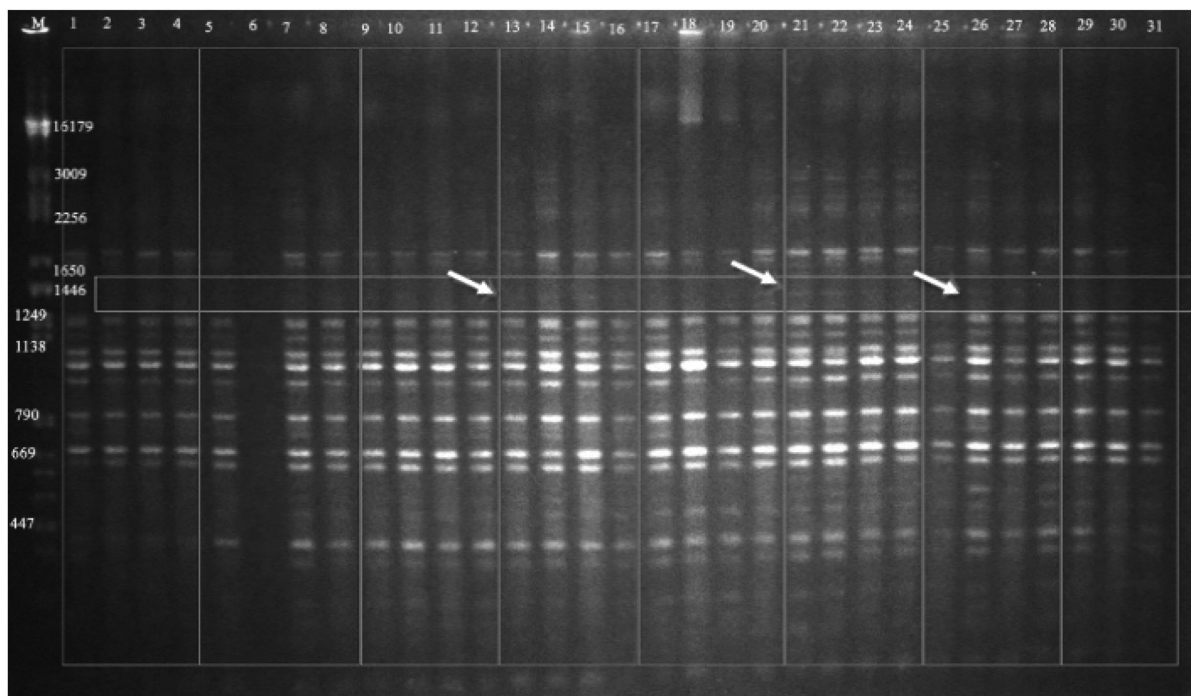


Рис. 3. Розподіл продуктів ПЛР, отриманих методом REMAP із комбінацією *Sukkula* x (CA)9G.
 1–4, 9–12, 13–16, 21–24, 25–28 – рослини із зеленим колосом та стеблом і листям з осугою;
 5–8, 17–20, 29–31 – рослини з осугою; М – маркер молекулярних розмірів

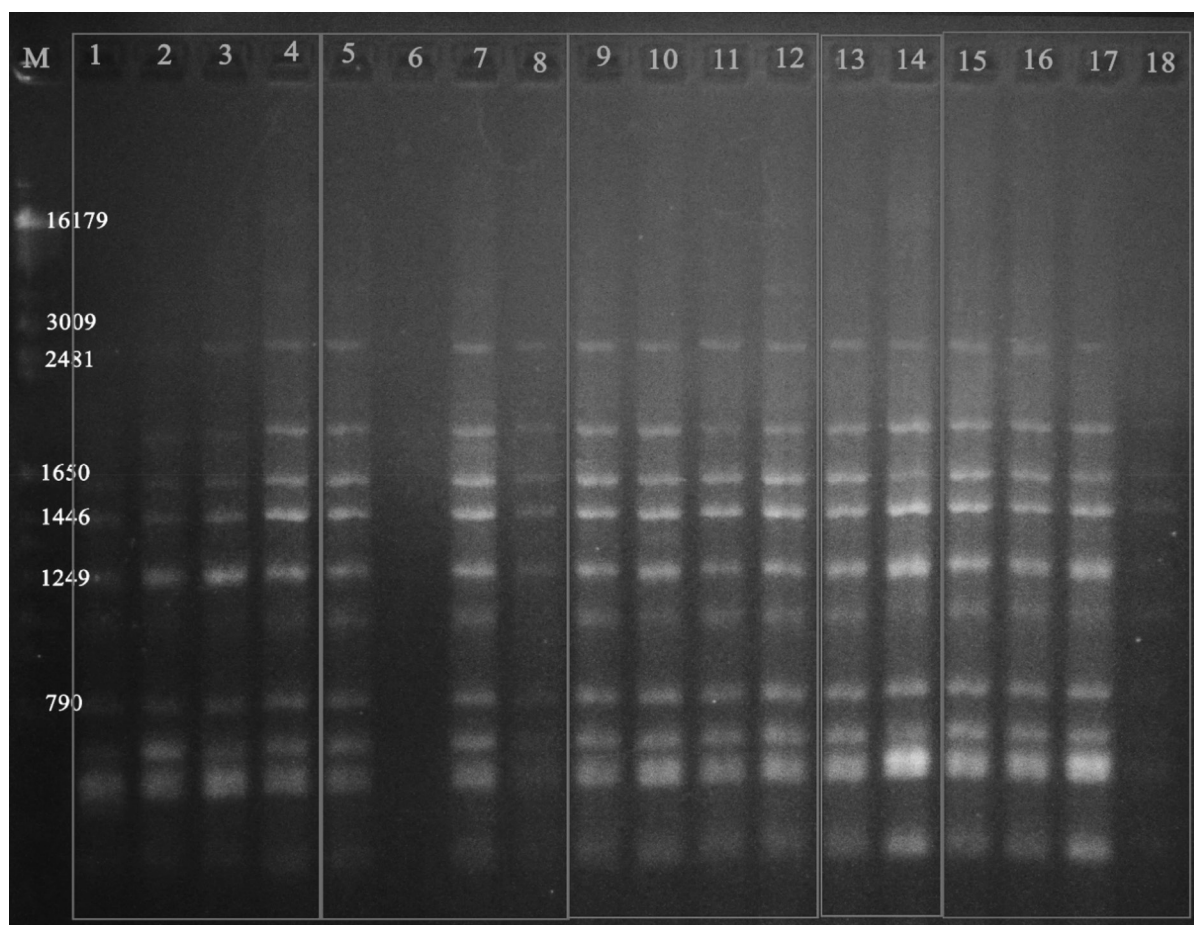


Рис. 4. Розподіл продуктів ПЛР, отриманих методом REMAP із комбінацією *Sukkula* x WMC419F.
 1–4, 5–8, 15–18 – рослини із зеленим колосом та стеблом і листям з осугою; 9–12, 13–14 – рослини з осугою;
 М – маркер молекулярних розмірів

З одержаних результатів можна зробити висновок про внесок ретротранспозона REMAPCAn у реорганізацію геному Авротики поряд із відсутністю активної транспозиції для ретротранспозонів родини *Sukula*. Раніше для ячменю було показано, що, попри великий відсоток копій ретротранспозонів родини *Nikita* та *Sukula*, вони не характеризуються високою активністю в стабільних геномах, хоча їхня кількість може варіювати в процесі онтогенезу [16]. Однак при аллоплоїдизації спостерігається активація ретротранспозонів на тлі зниження метилювання *LTR* ділянок. Такі дані було отримано для гібридів *Triticum turgidum* ssp. *durum* та *Aegilops tauschii* [17]. Тому, навіть якщо «геномний шок» у геномі Авротики не стимулював транспозицію зазначених вище

транспозонів, цілком можлива активація інших, як і показано для REMAPCAn.

Висновки

Хромосома 1В (ген *Iw3*) не задіяна в перетворенні морфотипу «зелений колос – блакитне листя» на морфотип «блакитна рослина». Зміна прояву ознаки в напрямку «зелений колос – блакитне листя» → «блакитна рослина» відбувається в результаті мутації *Iw2*→*iw2*, гена, розташованого на хромосомі 2D. Виявлений поліморфізм за IRAP спектрами не пов'язаний з мутацією *Iw2*→*iw2*, яка призводить до перетворення морфотипу «зелений колос – блакитне листя» на морфотип «блакитна рослина». Активність транспозона REMAPCAn реєструється для гена *Iw2* хромосоми 2D та не виявляється для гена *Iw3* хромосоми 1В.

Список літератури

- Rose JKC, editor. The Plant Cell Wall. Germany: Blackwell Publishing Ltd; 2006. Chapter 2, The fine structure of the plant cuticle; p. 11–110.
- Liu S, Dietrich CR, Schnable PS. DLA-based strategies for cloning insertion mutants: cloning the *gl4* locus of maize using Mu transposon tagged alleles. *Genetics*. 2009;183(4):1215–25.
- Maher C, Javelle M, Klein-Cosson C, Vernoud V, Rogowsky PM. Genome-wide characterization of the HD-ZIP IV transcription factor family in maize: preferential expression in the epidermis. *Plant Physiol*. 2011;157(2):790–803.
- Zhang Z, Wei W, Zhu H, Bi C, Trick HN. W3 is a new wax locus that is essential for biosynthesis of β -Diketone, development of Glaucousness, and Reduction of Cuticle Permeability in Common Wheat. *PLoS One*. 2015;10(10):1–21.
- Simmonds JR, Fish LJ, Leverington-Waite MA, Wang Y, Howell PJ, Snape W. Mapping of a gene (*Vir*) for a non-glaucous, viridescence phenotype in bread wheat derived from *Triticum dicoccoides*, and its association with yield variation. *Euph*. 2008;159(3):333–41.
- Wang J, Li W, Wang W. Fine mapping and metabolic and physiological characterization of the glume glaucousness inhibitor locus *Iw3* derived from wild wheat. *Theor Appl Genet*. 2014;127(4):831–41.
- Zhang Z, Wang W, Li W. Genetic interactions underlying the biosynthesis and inhibition of β -Diketones in wheat and their impact on glaucousness and cuticle permeability. *Plant Physiol*. 2013;163(1):5–20.
- Nishijima R, Iehisa JCM, Matsuoka Y, Takumi S. The cuticular wax inhibitor locus *Iw2* in wild diploid wheat *Aegilops tauschii*: phenotypic survey, genetic analysis, and implications for the evolution of common wheat. 2014;14:1–14.
- Шпильчин ВВ, Михайлик СЮ, Терновська ТК. Активність транспозона як чинник втрати функції гена *Iw2* (*T*) у нащадків штучних амфідиплоїдів *Triticinae*. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016;(19):51–4.
- Жиров ЕГ. Геномы пшеницы: исследование и перестройка [автореферат диссертации доктора наук]. Киев: Институт физиологии растений и генетики; 1989. 32 с.
- Kalendar R, Schulman AH. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2478–84.
- Abdollahi Mandoulakani B, Yaniv E, Kalendar R, Raats D, Bariana HS, Bihanta MR, Schulman AH. Development of IRAP- and REMAP-derived SCAR markers for marker-assisted selection of the stripe rust resistance gene *Yr15* derived from wild emmer wheat. *Theor Appl Genet*. 2015;128(2):211–9.
- Branco CJS, Vieira EA, Malone G, Kopp MM, Malone E, Bernardes A, et al. IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice. *J Appl Genet*. 2007;48(2):107–13.
- Шпильчин ВВ, Терновська ТК. Зміна прояву ознаки воскова осуга у генераціях амфідиплоїдів підтриби *Triticinae*. Наукові записки НаУКМА. Біологія та екологія. 2011;(119):3–7.
- Shpylychyn VV, Antonyuk MZ, Ternovska TK. Genetic analysis of artificial *Triticinae* amphidiploid Aurotica based on the glaucousness trait. *Cytol Genet*. 2014;48(5):308–17.
- Bayram E, Yilmaz S, Hamat-mecbur H, Kartal-alacam G, Gozukirmizi N. Nikita retrotransposon movements in callus cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Omics*. 2012;5(3):211–5.
- Kraitshtein Z, Yaakov B, Khasdan V, Kashkush K. Genetic and Epigenetic Dynamics of a Retrotransposon After Allopolyploidization of Wheat. *Genetics*. 2010;186(3):801–12.

N. Tytenko, V. Shpylychyn

DISCRIMINATION OF MUTATIONS *iw2* AND *iw3* WHICH CAUSE CHANGES IN GLAUCCOUS PHENOTYPE USING IRAP AND REMAP METHODS

Aim. Previously, it was found that a change in the manifestation of glaucousness trait is associated with mutations in two genes: the mutation in *Iw3*→*iw3* results in the transformation of the morphotype “green plant” to the morphotype “green spike, blue leaves”, and the mutation *Iw2*→*iw2* results in the transformation of the morphotype “green spike, blue leaves” to the morphotype “blue plant”. The aim of the study was to

find out which mutation, $Iw3 \rightarrow iw3$ or $Iw2 \rightarrow iw2$, is crucial for the change of the amphidiploid Aurotica phenotype from “green spike, blue leaves” to the “blue plant”. **Methods.** Visual assessment of plants, PCR analysis using IRAP and REMAP methods. **Results.** In order to determine whether chromosome 1B (gene *Iw3*) has any relation to the transformation of the morphotype “green spike, blue leaves” to the morphotype “blue plant”, polymorphisms detection in F_1 hybrids from the crossing of Aurotica 2 plants (Autotika 2 green x Autotika 2 blue) and plants Aurotica 2, which were used to obtain F_1 hybrids, and in the next generation from self-fertilization segregation for two phenotypes: “green” and “green spike, blue leaves” was observed. The analysis was carried out using IRAP and REMAP methods, as well as the modification of the REMAP method. In REMAP modification of the method sequence of SSR locus with a known chromosome localization was used as the second primer. Results of DNA amplification of Aurotica plants and Aurora x Aurotica F_1 hybrids using IRAP and REMAP primers allowed to compare the polymorphism available in the spectra of the amplicons, with a difference in the gradation of the glaucousness trait. **Conclusions.** Chromosome 1B (*Iw3* gene) is not involved in transformation of morphotype “green spike blue leaves” into morphotype “blue plant”. Change in manifestation of the trait from “green spike blue leaves” to “blue plant” is the result of mutation gene $Iw2 \rightarrow iw2$, localized on chromosome 2D. Identified polymorphism for IRAP spectra was not linked with mutation $Iw2 \rightarrow iw2$, which results in the transformation of morphotype “green spike blue leaves” to morphotype “blue plant”. REMAPCA transposone activity was identified in observation of gene *Iw2* on 2D chromosome, and it was not identified for gene *Iw3* on chromosome 1B.

Keywords: wheat amphidiploid, glaucousness, phenotypic variability, IRAP, REMAP.

Матеріал надійшов 17.05.2019