

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Національний університет «Києво-Могилянська академія»

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Єфіменко Тетяна Сергіївна

УДК 631.523:581.13

ДИСЕРТАЦІЯ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ СТІЙКОСТІ ДО
ХОЛОДОВОГО СТРЕСУ В ГЕНОМНО-ЗАМІЩЕНОЇ ФОРМИ
ПШЕНИЦІ

03.00.15. «Генетика»

біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
(доктора філософії)

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Єфіменко Т.С.

Науковий керівник
Антонюк Максим Зиновійович
кандидат біологічних наук
старший науковий співробітник

Київ – 2017

АНОТАЦІЯ

Єфіменко Т.С. Молекулярно-генетичні механізми стійкості до холодового стресу в геномно-заміщеної форми пшениці. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.15 «Генетика».

Місце виконання роботи: Національний університет «Києво-Могилянська академія», Міністерство освіти і науки України.

Захист відбудеться у спеціалізованій вченій раді К 26.202.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України, Київ, 2017.

В дисертаційному дослідженні показано зв'язок архітектури кореневої системи геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка з його підвищеною стійкістю до низьких температур. Амфідиплоїд Авротіка містить у своєму геномі тетракомпонент (AABB) геному сорту пшениці Аврора (AABBDD) і TT геном диплоїдного виду *Aegilops mutica* (Boissier). Було створено інтрогресивні лінії, що походять від схрещування Авротіка x Аврора та наступного самозапилення. Під час створення інтрогресивних ліній, перевіряли кількість хромосом в первинних корінцях паростків (аналіз метафазних пластинок) для поколінь F₃, F₄ та F₅, та добирали рослини з такою кількістю хромосом, від яких потім можна було отримати 42-хромосомні інтрогресивні лінії.

Наявність генетичного матеріалу T геному *Aegilops mutica* в геномах інтрогресивних ліній було підтверджено методом дот-блот гібридизації з використанням геномної ДНК *Ae. mutica* як зонда; для більшості ліній було отримано позитивний сигнал. Оцінка рослин інтрогресивних ліній за деякими ознаками морфології колоса (остистість, форма та щільність колоса, колір зрілого колоса, опушення колосової луски, форма луски тощо) та вегетативної частини рослини (опушення зеленої рослини, воскова осуга), а також за ознакою стійкості до борошнистої роси також вказує на наявність чужинного

генетичного матеріалу в їхніх геномах – більшість ліній відрізняються від сорту Аврора за декількома ознаками морфології та мають стійкість до борошнистої роси, яка, за нашими припущеннями, пов'язана з генами стійкості з Т геному.

Для встановлення наявності інтрогресій у складі хромосом 5 гомеологічної групи, де за даними літератури локалізовані основні гени, що відповідають за морозостійкість пшениці, було використано мікросателітний аналіз за тими SSR локусами, які вважаються специфічними до хромосом цієї групи. Спочатку було встановлено, праймери до яких мікросателітних локусів утворюють поліморфні продукти для Аврори та Авротіки, і далі за цими SSR локусами було проаналізовано рослини поколінь F_4 та F_5 (з використанням більшої кількості мікросателітних локусів). Продукти ампліфікації розділяли у поліакриламідному гелі за денатуруючих умов. З ДНК деяких ліній утворювався продукт ампліфікації, що не відрізнявся за електрофоретичною рухливістю від такого, що утворювався з ДНК Аврори. З ДНК інших ліній утворювався продукт ампліфікації, що не відрізнявся від продукту Авротіки, а з ДНК третьої групи ліній утворювався продукт, що був відмінним від продуктів обох батьківських форм (як Аврори, так і Авротіки). Утворення таких продуктів ампліфікації, не властивих жодному з генотипів ініціального схрещування Авротіка х Аврора, може пояснюватися утворенням нових алелів через підвищений рівень мутацій в ділянках SSR локусів. За наявністю алелів мікросателітних локусів, характерних для Авротіки, можна було припустити заміщення цілих хромосом 5-ої групи Аврори на хромосому 5Т Авротіки, або плечей цих хромосом, або формування «мозаїчних» хромосом, в яких чергуються ділянки хроматину Аврори та Авротіки. Утворення таких хромосом можливе через часткову рекомбінацію хромосом Т і D геномів.

Для порівняння зимостійкості Аврори та Авротіки спочатку використовували непрямі методи: визначення вмісту вільного проліна, визначення електричної провідності (витікання електролітів), проте, за нашими результатами, характеристики Аврори за цими методами були кращими, ніж Авротіки – Аврора накопичувала більшу кількість вільного проліна від час

періоду холодового загартовування, ніж Авротіка, а також Аврора мала менші показники електричної провідності, ніж Авротіка (витікала менша кількість електролітів після заморожування, що може вказувати на менший ступінь пошкоджень мембрани). Було зроблено висновок, що в основі кращої зимостійкості Авротіки, порівняно з Авророю, лежать інші механізми, відмінні від накопичення вільного проліна та меншого витікання електролітів.

Під час підготовки паростків Аврори та Авротіки до експерименту з лабораторного заморожування (в спеціальному рідинному термостаті з поступовим зниженням температури) було помічено, що при вирощуванні за низьких позитивних температур (4°C), Авротіка формує міцнішу, краще розвинену кореневу систему у порівнянні з такою Аврори. Це спостереження доло змогу припустити, що особливості кореневої системи Авротіки можуть мати зв'язок з її кращою зимостійкістю, і це було перевірено на наступному етапі дослідження. Щодо експерименту з лабораторного заморожування, то за його результатами Авротіка показала краще відростання, ніж Аврора.

Для вивчення розвитку кореневої системи були обрані інтрогресивні лінії, вивчені за структурою геному щодо хромосом 5-ої гомеологічної групи, оскільки показано участь хромосом цієї гомеологічної групи у формуванні ознаки морозостійкості. Розвиток кореневої системи вивчали на рослинах, вирощених у пакетах з ґрунтовою сумішшю, та рослинах, вирощених у польових умовах. Вимірювали такі характеристики кореневої системи: кількість коренів, максимальна довжина кореня, об'єм кореневої системи (визначали за об'ємом рідини, яку витісняє коренева система при зануренні у посудину з рідиною).

При порівнянні характеристик кореневої системи Аврори та Авротіки не було виявлено різниці за ознаками довжина найдовшого кореня та кількість коренів, але спостерігалася різниця за ознакою об'єму витісненої рідини. Було припущено, що Авротіка утворює більшу кількість бічних розгалужень коренів, або корені мають більшу товщину. За отриманими результатами, формування більш розвиненої кореневої системи, що оцінювалося за обсягом витісненої

рідини, статистично значуще пов'язано з наявністю маркерів (алелів SSR-локусів) хромосоми 5T замість маркерів хромосоми 5A. Це може вказувати на можливий зв'язок з хромосомою 5A пшениці генів, які беруть участь у формуванні кореневої системи пшениці.

Рослини, що вирощували в полі, оцінювали також за кущистістю (кількість продуктивних стебел) та успішністю зимування (кількість рослин, які після зими перейшли до стадії колосіння). Було показано, що Аврора відрізняється від Авротіки за співвідношенням об'єм коренів (за витісненою рідиною)/кущистість у менший бік удвічі. Лінії, які характеризуються високим відношенням об'єм коренів/кущистість, всі, крім однієї, показали більш високий відсоток рослин, що вижили, порівняно з показником Аврори. Отримані результати дали змогу припустити, що стійкість рослин ліній до зимових стресових умов пов'язана з об'ємом кореневої системи відносно продуктивної кущистості та збільшується разом зі зменшенням відношення кількості продуктивних стебел до об'єму кореневої системи.

Для пошуку генів-кандидатів, що можуть впливати на формування кореневої системи, аналізували продукти ампліфікації, що утворюють ДНК Аврори та Авротіки з праймерами до таких генів: *AGL21* та *AGL14* (гени MADS box транскрипційних факторів, що впливають на накопичення ауксина в корені), *BRI* – ген рецептора брасиностероїдів (фітогормони, які задіяні у регуляції розвитку коренів). Було перевірено також *CBF-A14* – ген транскрипційного фактора родини CBF (C-repeat Binding Factor) – один з основних транскрипційних регуляторів морозостійкості. Між ДНК Аврори та Авротіки не було виявлено поліморфізму за спектрами продуктів ампліфікації з праймерами до генів *TaAGL14*, *BRI* та *CBF-A14*, тому інтрогресивні лінії не аналізувалися з цими праймерами.

AGL21 кодує MADS box транскрипційний фактор, який позитивно регулює накопичення ауксину в примордіях бічних коренів через регуляцію біосинтезу ауксину, який стимулює ініціація і ріст бічних коренів. Показано наявність поліморфізму для продуктів ампліфікації, утворених з праймерами до

другої частини гена *TaAGL21*. Ці праймери були використані для утворення продуктів ампліфікації з ДНК ліній – похідних Авротіки та аналізу продуктів ампліфікації щодо того, чи вони є схожі за масою на продукт Авротіки, чи на продукт Аврори. При порівнянні результатів з оцінкою зимостійкості показано, що лінії з алелем гена *TaAGL21*, властивим Авротіці, за успішністю у перенесенні зимових стресів перевищують лінії, яким властивий алель Аврори за цим геном.

Рослини для вимірювання характеристик кореневої системи вирощували в поліетиленових пакетах з ґрунтовою сумішшю в 2015 році за умов природного загартовування (поступове зниження температури восени), та в 2016 році в кімнаті контрольованого клімату за оптимальної температури (20°C) без холодowego загартовування щоб встановити чи залежить розвиток кореневої системи від наявності/відсутності загартовування рослин і чи пов'язаний цей процес з алелем гена *TaAGL21*, властивим лініям. За отриманими результатами можна припустити, що природне загартовування сприяє формуванню більш розвиненої кореневої системи через збільшення довжини коренів за наявності алеля «2» гена *AGL21*, в той час як без загартовування краще розвивається коренева система у рослин з алелем «1» гена *AGL21*. За кількістю коренів рослини, вирощені у 2016 році, не відрізнялись від таких, вирощених у 2015 році, можливо, що вираз цієї ознаки не залежить від загартовування. Для ознаки об'єм кореневої системи (визначений за об'ємом витісненої рідини) варіювання навколо групового середнього значення генотипних середніх в різні роки є однаковим для зразків з алелем «1» гена *AGL21* та різним для зразків з алелем «2». В 2015 році (за умов загартовування) більш розвинену коренева система (більший об'єм витісненої рідини) мала Авротіка, а в 2016 році (без загартовування) Аврора утворювала більшу кореневу систему порівняно з Авротікою. Отже, за умов низьких температур, Авротіка формує краще розвинену кореневу систему, що може бути пов'язано з алелем «2» гена *ALG1*, що, в свою чергу, має позитивний зв'язок із зимостійкістю.

Наукова новизна. Вперше створено набір гексаплоїдних інтрогресивних ліній з залученням генетичного матеріалу виду *Aegilops mutica*, який досі у віддаленій гібридизації практично не використовується.

Показано, що обмежена самофертильність гібридів ранніх генерацій є природним фактором добору рослин зі збалансованими хромосомними наборами, що робить етап визначення кількостей хромосом у окремих рослин зайвим.

В роботі вперше показано, що одним з можливих механізмів підвищення зимостійкості Авротіки у порівнянні з Авророю є формування у неї більш розвиненої кореневої системи, якщо оцінювати її як відношення обсягу коренів, який припадає на один наземний пагін.

Встановлено, що лінії, які мають заміщення мікросателітних маркерів, специфічних до хромосом 5-ої гомеологічної групи пшениці, на маркери хромосоми 5T, характеризуються більш високим відношенням об'єм коренів/кількість пагонів та кращою зимостійкістю у порівнянні з Авророю.

Вперше встановлено, що за умов загартовування краще зимують лінії з властивим Авротіці алелем гена *TaAGL21*, що кодує транскрипційний фактор, ефектор синтезу ауксину, який є промотором утворення бічних коренів.

Практична значущість. Створені інтрогресивні лінії Аврора/Авротіка можна використовувати як джерело корисних ознак для покращення м'якої пшениці, серед яких підвищена зимостійкість, стійкість до борошнистої роси та листової іржі. Лінії можна використовувати для створення картуючих популяцій, придатних для генетичного аналізу геному пшениці за всіма ознаками морфології та фізіології, за якими Авротіка відрізняється від сортів м'якої пшениці. При спробі використати лінії для покращення зимостійкості пшениці скринування гібридних популяцій за геном *TaAGL21* можна використовуватися для добору рослин з потенційною здатністю формувати таку архітектуру кореневої системи, яка буде забезпечувати кращу перезимівлю рослин через збереження коренів та краще забезпечення наземної маси водою та мінеральними речовинами.

Ключові слова: інтрогресивні лінії, *Aegilops mutica* (*Amblyopyrum muticum*), *Triticum aestivum*, зимостійкість, коренева система, мікросателітні локуси, транскрипційні фактори, ауксин.

Список публікацій:

1. Iefimenko T.S., Fedak Yu.G., Antonyuk M.Z., Ternovska T.K. Microsatellite analysis of homoeologous chromosome group 5 of introgressive wheat lines *Triticum aestivum*/*Amblyopyrum muticum*. Cytology and Genetics. 2015; 49 (3): 45-54.
2. Єфіменко Т.С., Антонюк М.З. Молекулярні механізми стійкості рослин до низьких температур. Наукові записки НаУКМА. Біологія та екологія. 2014; Т.158: 3-12.
3. Iefimenko T.S., Fedak G., Antonyuk M.Z., Ternovska T.K. Introgressive wheat lines *Triticum aestivum*/*Amblyopyrum muticum* analysis as to the structure of the homeologous group 5 chromosomes. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць, т. 16. Київ: Логос, 2015: 83–86.
4. Єфіменко Т.С., Терновська Т.К. Генетичний контроль формування архітектури кореневої системи рослин та її зв'язок із зимостійкістю. Наукові записки НаУКМА, 2015, Том 171: 10-17.
5. Єфіменко Т.С., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Характеристика кореневої системи інтрогресивних ліній пшениці з генетичним матеріалом від *Amblyopyrum muticum*. Наукові записки. 2016; Т.184: 10-16.
6. Єфіменко Т.С., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Поліморфізм інтрогресивних ліній *Triticum aestivum* / *Amblyopyrum muticum* за геном *AGL21*, промотором розвитку коренів. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. 2016; Т. 19: 25-28.
7. Єфіменко Т.С., Антонюк М.З. , Мартиненко В.С. Створення чужинно-заміщених та чужинно-доданих ліній *Triticum aestivum* / *Aegilops mutica*.

Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць, т. 12. Київ: Логос, 2013: 114–118.

8. Єфіменко Т.С., Федак Ю., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Порівняння хромосом 5-ї гомеологічної групи Аврори та Авротіки з використанням специфічних мікросателітів. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць, т. 14. Київ: Логос, 2014: 58–52.

9. Iefimenko T.S., Antonyuk M.Z., Ternovska T.K. Development of introgressive lines *Triticum aestivum* / *Aegilops mutica* resistant to powdery mildew by the method of chromosome mixing. Disease Risk and Food Security. Proceedings of the 13th International Cereal Rust and Powdery Mildews Conference. Istanbul, 28 Aug. – 1 Sep., 2012: 154–155.

10. Antonyuk M., Iefimenko T.S., Martynenko V.S., Ternovska T.K. Development of introgressive wheat lines with *Aegilops mutica* chromosomes. The 12th International Wheat Genetics Symposium. Japan, Yokohama, 8–13 September, 2013. Abstracts: 1–6.

11. Антонюк М.З., Єфіменко Т.С., Мартиненко В.С., Терновська Т.К. Створення ліній м'якої пшениці з генетичним матеріалом від *Aegilops mutica*. Abstracts of the International Scientific Conference “Breeding and Genetics of Agrocltural Crops: Traditions and Prospects”. October 17-19th, 2012, Odesa, Ukraine: 123–124.

12. Єфіменко Т.С. Створення інтрогресивних ліній м'якої пшениці *Triticum aestivum*/*Aegilops mutica*. Збірник тез IX Міжнародної наукової конференції "Молодь та поступ біології". 16–19 квітня 2013: 155.

13. Єфіменко Т.С., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Мікросателітний аналіз ліній м'якої пшениці *Triticum aestivum*/*Aegilops mutica* щодо присутності чужинного генетичного матеріалу у складі хромосом 5 гомеологічної групи. Матеріали VI Міжнародної конференції молодих вчених «Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція», присвяченої 150-річчю від дня народження

видатного ботаніка В.І. Липського. (Одеса, 13-17 травня 2013). – Одеса: Печатний до, 2013. – 364 с.

SUMMARY

Iefimenko T.S. Molecular-genetic mechanisms of cold stress tolerance in wheat genome substitution form. – Manuscript.

A dissertation submitted to acquire the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 03.00.15 – genetics. – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2017.

The work on dissertation was conducted in the National University of “Kyiv-Mohyla Academy” Ministry of Education and Science of Ukraine.

The dissertation is devoted to the investigation of mechanisms of higher winter hardiness of the amphidiploid Aurotica, which combines in its genome AABB tetracomponent of common wheat cultivar Aurora and TT genome of the diploid wild wheat relative *Aegilops mutica* (*Amblyopyrum muticum*). Introgressive lines *Triticum aestivum* / *Aegilops mutica* were developed by crossing Aurotica x Aurora and the following self-pollination of the hybrids, which was possible due to the recombination between the chromosomes of D and T genomes. Chromosome numbers were determined in hybrid generations F₃, F₄ and F₅, and only 40-43-chromosome F₄ plants were chosen to form F₅ generation in order to get 42-chromosome euploids introgressive lines. Changes in chromosome plates of the hybrid plants were observed: presence of telocentric chromosomes, dicentric chromosomes and number of satellite chromosomes differing from Aurora and Aurotica. These changes could be evidence of chromosome rearrangements in the genomes of hybrid plants possibly caused by introgression of alien genetic material.

Presence of T genome genetic material in the genomes of the introgressive lines was confirmed by dot blot hybridization with genome DNA of *Aegilops mutica* as probe; most lines demonstrated positive hybridization signals. Additionally, morphological traits assessment also gave evidence on the presence of alien genetic material (from T genome) in the genomes of the lines: all lines differed from Aurora at least for some traits that have been assessed (traits of the spike – like glume color, glume hairiness and others; and vegetative part of the plant – hairiness,

glaucousness). Most introgressive lines also were resistant to powdery mildew, which should be due to resistance genes from T genome, as we assumed.

In order to indentify introgressions in chromosomes of homeological group 5, which according to the literature contains main genes for freezing tolerance, microsatellite analysis was conducted with SSR loci specific for this group of chromosomes. Firstly, SSR loci with polymorphism between Aurora and Aurotica were selected, and then primers to these loci were used for analysis of F₄ and F₅ plants. PCR products were separated in denaturing polyacrylamide gel with urea. Some introgressive lines produced products with the same electrophoretic mobility as Aurora; other lines produced products the same as Aurotica, some introgressive lines produced amplification products differing both from Aurora and Aurotica. These “new” alleles could have appeared as a result of mutations in SSR loci. According to the results of the SSR analysis, it could be assumed that some wheat chromosomes of homeological group 5 were replaced by the chromosomes of T genome; other chromosomes had replaced arms or smaller translocations, which could form “mosaic” chromosomes with alleles at some SSR loci specific to Aurora, and at other SSR loci – alleles specific to Aurotica. It was shown that lines with alleles of SSR loci on 5A chromosome specific to Aurotica were characterized by better winter field survival.

According to the results of free proline quantification and determination of electric conductivity (electrolyte leakage through the membranes damaged by the freezing stress), it was demonstrated that Aurotica accumulated less free proline during the period of cold acclimation and was characterized by the higher electric conductivity (greater electrolyte leakage), compared to Aurora. These results indicated that higher winter hardiness of Aurotica was provided by different molecular mechanisms than free proline accumulation and changes in membranes that prevent electrolyte leakage after freezing stress.

In the experiments of laboratory freezing of Aurora and Aurotica seedlings (crowns) and the following survival assessment, Aurotica demonstrated better survival. During the preparation for the freezing experiments, when seedlings were

excavated from the soil after cold acclimation, a useful observation was made that Aurotica formed more developed (stronger) root system compared to Aurora, when grown at low positive temperature (4°C, cold acclimation conditions). Based on this observation, on the following stage of the investigation root system characteristics were studied for Aurotica, Aurora and introgressive lines.

For the root system study those introgressive lines were selected, that were previously studied for the presence of introgressions in their chromosomes of homeological group 5 (SSR analysis). Plants for the following root system investigation were grown in paper boxes in laboratory and also in the field. Such root system characteristics as maximum root length, root number and root volume (determined as volume of liquid supplanted by the roots) were determined. For the traits of root number and maximum root length no difference was found for Aurora and Aurotica. It was assumed that Aurotica forms more lateral roots or/and thicker roots compared to Aurora. Difference between Aurora and Aurotica was identified for root volume (determined as volume of supplanted liquid). Root system with higher volume was statistically significantly correlated with the presence of SSR alleles specific to Aurotica (T genome) instead of 5A specific alleles. This could be evidence that genes participating in the control of root development could be localized on 5A chromosome.

Plants grown in the field were also assessed for the number of productive shoots and winter hardiness (number of plants that survived winter in the field). It was shown that Aurora has twice lesser ratio root system volume (determined as volume of supplanted by roots liquid) to number of productive shoots. Introgressive lines with higher correlation of root volume to the number of productive shoots were characterized by better field survival compared to Aurora. According to these results, conclusion was made that plants' winter tolerance is related to the ratio of root system volume to the number of productive shoots.

In order to find candidate genes for increased winter hardiness of Aurotica, amplification products produced with Aurora's and Aurotica's DNA with primers to genes *AGL21* and *AGL14* (genes of MADS box transcription factors which influence

auxin accumulation in roots), *BRI* (gene of brassinosteroid receptor), *CBF-A14* (gene of a transcription factor of the CBF family: C-repeat Binding Factors; these are among the main transcriptional regulators of freezing tolerance) were analyzed. No polymorphism was identified for amplification products obtained with Aurora's and Aurotica's DNA with primers to genes *TaAGL14*, *BRI* та *CBF-A14*, for this reason introgressive lines were not analyzed using these primers.

AGL21 encodes a MADS box transcription factor, which positively regulates auxin accumulation in lateral root primordia by the regulation of auxin biosynthesis. Auxin is one of the main plant hormones regulating root development. Polymorphism between Aurora and Aurotica was shown for amplification products obtained with primers to the second part of the *TaAGL21* gene. These primers were used to obtain PCR products with DNA of the introgressive lines, and analysis was conducted if these products are the same as Aurora's or Aurotica's. Comparing the results with winter survival assessment, it was demonstrated that lines with *TaAGL21* specific to Aurotica were characterized by better winter field survival.

Plants for root system assessment were grown in cardboard boxes in 2015 in conditions of cold acclimation (gradual temperature decrease in autumn), and in 2016 without acclimation (in the room with controlled climate, 20°C) in order to determine if root system development depend on cold acclimation process and on specific allele of *TaAGL21* gene. According to the obtained results, cold acclimation process contributes to the formation of more developed root system with longer roots in case of the presence of Aurotica specific *TaAGL21* allele. On the other hand, without acclimation better developed root system forms in plants with Aurora allele of *TaAGL21*. For the root number there was no difference between plants grown in 2015 and 2016; therefore, it could be concluded that these trait did not depend on cold acclimation process. For the trait of root volume (determined as volume of supplanted liquid), Aurotica formed more developed root system in 2015 (with cold acclimation), whereas Aurora formed root system with greater volume in 2016 (no cold acclimation). Therefore, in cold acclimation conditions Aurotica forms better

developed root system than Aurora, which could be related to the presence of specific allele of the *TaAGL21* gene, and its higher winter hardiness.

Scientific novelty of the work is that through the use of genome substitution amphidiploid Aurotica hexaploid introgressive lines with genetic material from *Aegilops mutica*, were developed; and *Ae. mutica* had not been used much for wheat introgressive hybridization. Limited self-fertility of the early generation hybrids was a natural selection factor, which resulted in the survival of plants with balanced chromosome numbers; this made chromosome number determination in particular plants unnecessary. Absence of the morphological wheat type among the progeny of later generations gave evidence that presence of alien chromatin in the genomes of (AABBTT x AABBDD) F₂ plants acted as factor for viability and self-fertility; whereas progeny without alien chromatin were eliminated. One of the possible mechanisms of Aurotica's higher winter tolerance compared to Aurora is development of bigger root system, determined as a volume of roots per one shoot. Introgressive lines with microsatellite alleles specific to the 5T chromosome were characterized by higher ratio root volume / number of shoots, and better winter field survival compared to Aurora. In conditions of cold acclimation, lines with Aurotica allele of *TaAGL21* gene (which positively influences auxin accumulation) develop root system with greater volume.

Practical importance of the work is that developed introgressive lines Aurora/Aurotica could be used as sources of traits for common wheat improvement, such as genes for better winter tolerance, resistance genes for powdery mildew and leaf rust. Introgressive lines could be used for development of mapping populations for wheat genetic analysis for all morphological and physiological traits for which Aurotica differ from common wheat cultivars. In case of using lines for wheat's winter tolerance improvement, gene *TaAGL21* could be used for screening hybrid populations in order to select plants with potential to form root system which would provide better winter field survival of the plants, and better supply of the shoot with necessary mineral compounds from the soil.

Key words: introgressive lines, *Aegilops mutica* (*Amblyopyrum muticum*), *Triticum aestivum*, root system, winter hardiness, SSR, transcription factors, auxin.

Publications:

1. Iefimenko T.S., Fedak Yu.G., Antonyuk M.Z., Ternovska T.K. Microsatellite analysis of homoeologous chromosome group 5 of introgressive wheat lines *Triticum aestivum*/*Amblyopyrum muticum*. *Cytology and Genetics*. 2015; 49 (3): 45-54.
2. Єфіменко Т.С., Антонюк М.З. Молекулярні механізми стійкості рослин до низьких температур. *Наукові записки НаУКМА. Біологія та екологія*. 2014; Т.158: 3-12.
3. Iefimenko T.S., Fedak G., Antonyuk M.Z., Ternovska T.K. Introgressive wheat lines *Triticum aestivum*/*Amblyopyrum muticum* analysis as to the structure of the homeologous group 5 chromosomes. *Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць*, т. 16. Київ: Логос, 2015: 83–86.
4. Єфіменко Т.С., Терновська Т.К. Генетичний контроль формування архітектури кореневої системи рослин та її зв'язок із зимостійкістю. *Наукові записки НаУКМА*, 2015, Том 171: 10-17.
5. Єфіменко Т.С., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Характеристика кореневої системи інтрогресивних ліній пшениці з генетичним матеріалом від *Amblyopyrum muticum*. *Наукові записки*. 2016; Т.184: 10-16.
6. Єфіменко Т.С., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Поліморфізм інтрогресивних ліній *Triticum aestivum* / *Amblyopyrum muticum* за геном *AGL21*, промотором розвитку коренів. *Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць*. 2016; Т. 19: 25-28.
7. Єфіменко Т.С., Антонюк М.З. , Мартиненко В.С. Створення чужинно-заміщених та чужинно-доданих ліній *Triticum aestivum* / *Aegilops mutica*. *Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць*, т. 12. Київ: Логос, 2013: 114–118.

8. Єфіменко Т.С., Федак Ю., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Порівняння хромосом 5-ї гомеологічної групи Аврори та Авротіки з використанням специфічних мікросателітів. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць, т. 14. Київ: Логос, 2014: 58–52.

9. Iefimenko T.S., Antonyuk M.Z., Ternovska T.K. Development of introgressive lines *Triticum aestivum* / *Aegilops mutica* resistant to powdery mildew by the method of chromosome mixing. Disease Risk and Food Security. Proceedings of the 13th International Cereal Rust and Powdery Mildews Conference. Istanbul, 28 Aug. – 1 Sep., 2012: 154–155.

10. Antonyuk M., Iefimenko T.S., Martynenko V.S., Ternovska T.K. Development of introgressive wheat lines with *Aegilops mutica* chromosomes. The 12th International Wheat Genetics Symposium. Japan, Yokohama, 8–13 September, 2013. Abstracts: 1–6.

11. Антонюк М.З., Єфіменко Т.С., Мартиненко В.С., Терновська Т.К. Створення ліній м'якої пшениці з генетичним матеріалом від *Aegilops mutica*. Abstracts of the International Scientific Conference “Breeding and Genetics of Agrocltural Crops: Traditions and Prospects”. October 17-19th, 2012, Odesa, Ukraine: 123–124.

12. Єфіменко Т.С. Створення інтрогресивних ліній м'якої пшениці *Triticum aestivum*/*Aegilops mutica*. Збірник тез IX Міжнародної наукової конференції "Молодь та поступ біології". 16–19 квітня 2013: 155.

13. Єфіменко Т.С., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Мікросателітний аналіз ліній м'якої пшениці *Triticum aestivum*/*Aegilops mutica* щодо присутності чужинного генетичного матеріалу у складі хромосом 5 гомеологічної групи. Матеріали VI Міжнародної конференції молодих вчених «Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція», присвяченої 150-річчю від дня народження видатного ботаніка В.І. Липського. (Одеса, 13-17 травня 2013). – Одеса: Печатний до, 2013. – 364 с.

ЗМІСТ

	Ст.
ВСТУП _____	23
Актуальність теми _____	23
Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами _____	24
Мета і завдання дослідження _____	24
Методи дослідження _____	26
Наукова новизна _____	26
Практична значення _____	27
Особистий внесок здобувача _____	27
Апробація результатів дисертації _____	28
Публікації _____	28
Структура і обсяг роботи _____	28
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ _____	29
1.1. Молекулярні механізми морозостійкості рослин, досліджені на модельних рослинах _____	29
1.1.1. Процес загартовування у рослин _____	29
1.1.2. Сприйняття низької температури рослинами _____	30
1.1.3. CBF транскрипційні фактори у відповіді рослин на холодоровий стрес _____	34
1.1.4. Регуляція експресії <i>CBF</i> генів _____	37
1.1.5. Взаємодія <i>CBF</i> генів і циркадного годинника _____	39
1.1.6. Регульовані холодом гени (Cold Regulated – <i>COR</i> -genes) _____	40
1.1.7. Гени, що відповідають за яровизацію, та їхній зв'язок з морозостійкістю _____	45
1.2. Генетичний контроль морозостійкості та яровизації пшениці _____	46
1.2.1. Основні локуси, що контролюють морозостійкість _____	

у пшениці_____	46
1.2.2. <i>CBF</i> гени пшениці_____	47
1.2.3. Генетичний контроль яровизації у пшениці_____	49
1.3. Методи оцінки морозостійкості рослин_____	50
1.3.1. Тестування морозостійкості рослин в полі_____	51
1.3.2. Прямі методи оцінки морозостійкості_____	52
1.3.3. Непрямі методи оцінки морозостійкості_____	53
1.3.4. Метод визначення вмісту вільного проліну_____	53
1.3.5. Оцінка морозостійкості рослин через визначення електричної провідності (витікання електролітів)_____	56
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ_____	59
2.1. Рослинний матеріал_____	59
2.1.1. Геномно-заміщений амфідиплоїд Авротіка, сорт Аврора, <i>Aegilops mutica</i> _____	59
2.1.2. Створення чужинно-заміщених ліній пшениці_____	60
2.2. Реактиви, розчини, обладнання_____	61
2.3. Методика виділення ДНК_____	63
2.4. Методика полімеразно-ланцюгової реакції та електрофорезу для розділення продуктів ампліфікації_____	63
2.4.1. Полімеразно-ланцюгова реакція_____	64
2.4.2. Вертикальний денатуруючий електрофорез нуклеїнових кислот у поліакриламідному гелі_____	64
2.4.3. Горизонтальний електрофорез у агарозному гелі_____	65
2.4.4. Послідовності праймерів до ділянок генів транскрипційних факторів_____	65
2.5. Встановлення кількості хромосом у корінцях пшениці_____	66
2.5.1. Фіксація матеріалу_____	66
2.5.2. Мацерація та фарбування матеріалу_____	66
2.5.3. Виготовлення препаратів для мікроскопічного	

дослідження_____	67
2.6. Визначення вмісту вільного проліна_____	67
2.7. Дот-блот гібридизація_____	
2.7.1. Фрагментація ДНК, що використовувалася в якості зонда_____	68
2.7.2. Мічення ДНК біотином_____	68
2.7.3. Переосадження міченої ДНК_____	68
2.7.4. Нанесення ДНК на мембрану для блоту_____	69
2.7.5. Пре-гібридизація та гібридизація_____	70
2.7.6. Детекція гібридизації_____	70
2.8. Визначення морозостійкості рослин_____	71
2.8.1. Вирощування рослин для визначення морозостійкості_____	71
2.8.2. Загартовування рослин_____	72
2.8.3. Заморожування рослин_____	72
2.8.4. Визначення електричної провідності_____	72
2.10. Вимірювання характеристик кореневої системи_____	73
2.11. Оцінка рослин за ознаками морфології_____	75
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ_____	77
3.1. Створення інтрогресивних ліній <i>Triticum aestivum/Aegilops mutica</i> _____	77
3.1.1. Отримання розмаїття нащадків від схрещування Авротіки та Аврори_____	77
3.1.2. Вивчення хромосомних наборів в рослинах різних поколінь при створенні ліній <i>Triticum aestivum/Aegilops mutica</i> _____	81
3.1.3. Характеристика ліній <i>Triticum aestivum/Aegilops mutica</i> за ознаками морфології рослин_____	85
3.1.4. Перевірка наявності генетичного матеріалу від виду <i>Aegilops mutica</i> в геномі інтрогресивних ліній пшениці за допомогою методу дот-блот гібридизації_____	100

3.1.5. Мікросателітний аналіз рослин покоління F ₄ _____	102
3.1.6. Порівняння хромосом 5-ї гомеологічної групи Аврори та Авротіки з використанням специфічних до них 102 SSR локусів_____	112
3.1.7. Мікросателітний аналіз рослин покоління F ₅ _____	121
3.1.8. Порівняння результатів мікросателітного аналізу рослин поколінь F ₄ та F ₅ і результатів дот-блот гібридизації_____	137
3.2. Порівняльне вивчення Аврори, Авротіки та інтрогресивних ліній за показниками морозостійкості_____	139
3.2.1. Визначення вмісту вільного проліна в листках загартованих рослин Аврора та Авротіка_____	139
3.2.2. Визначення електричної провідності (витікання електролітів) для Аврори та Авротіки_____	142
3.2.3. Визначення морозостійкості рослин пшениці через відростання після заморожування_____	144
3.3. Архітектоніка кореневої системи Авротіки як можливий чинник її підвищеної зимостійкості_____	147
3.3.1. Характеристика кореневої системи Аврори, Авротіки та інтрогресивних ліній F ₅ _____	149
3.3.1.1. Оцінка кореневої системи рослин, вирощених у пакетах з грунтовою сумішшю у світловій кімнаті у 2015 році після проходження природного загартовування_____	151
3.3.1.2. Оцінка кореневої системи рослин, вирощених у полі за умов проходження природного загартовування_____	159
3.3.3. Спроба ідентифікації генів-кандидатів на участь у формуванні кореневої системи_____	167
3.3.3.1. Аналіз електрофоретичних спектрів Аврори та Авротіки за продуктами ампліфікації, утвореними з праймерами до генів <i>TaAGL14</i> , <i>BRI1</i> , <i>CBF-A14</i> _____	172

3.3.3.2.	Поліморфізм інтрогресивних ліній <i>Triticum aestivum</i> / <i>Amblyopyrum muticum</i> за геном <i>TaAGL21</i> , що бере участь у регуляції розвитку коренів, та їхня зимостійкість_____	173
3.3.4.	Вивчення різниці між Авророю, Авротікою та інтрогресивними лініями за ознаками кореневої системи та поліморфізмом за геном <i>TaAGL21</i> на рослинах, вирощених у пакетах без природного загартовування_____	180
	УЗАГАЛЬНЕННЯ_____	194
	ВИСНОВКИ_____	200
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ_____	202

ВСТУП

Актуальність теми

Низькі температури взимку є одним з головних абіотичних стресів, що спричиняє значні втрати врожаю багатьох сільськогосподарських культур, зокрема м'якої пшениці [121]. М'яка пшениця (*Triticum aestivum* L.), що займає важливе місце в світовому господарстві серед злакових культур, представлена озимими і ярими сортами [181]. Озимі сорти пшениці забезпечують на 30-40% вищі врожаї, ніж ярі сорти, і тому займають більші площі [191]. Озимі сорти пшениці повинні переживати низькі температури взимку, що можуть спричинити значні пошкодження рослин пшениці та призводити до значних втрат врожаю, якщо морозостійкість не є достатньою для певного географічного регіону [191]. Враховуючи все це, існує потреба покращення зимостійкості сортів озимої пшениці.

Особливості будови кореневої системи та її зміни у відповідь на зміну умов зростання є важливими для пристосування рослини до специфічних умов довкілля, до оптимального використання присутньої в ґрунті води і мінеральних речовин, а також до абіотичних стресів [105]. Створення сортів рослин, зокрема пшениці, з оптимальними характеристиками кореневої системи теоретично дозволить отримати кращі врожаї навіть за умов абіотичних стресів (посуха, низькі температури в зимовий період) та, можливо, з використанням меншої кількості добрив [119; 196]. Отже, дослідження характеристик кореневої системи і генів, що контролюють розвиток коренів, є важливим і може мати практичну цінність. Тим не менше, корінь є «захованою половиною» (“hidden half”) рослини, що ускладнює роботу, і загалом процеси розвитку кореня та їх зв'язок з пристосуванням рослини до абіотичних стресів є менше дослідженими порівняно з пагоном [171]. Актуальним є пошук зв'язку характеристик кореневої системи зі стійкістю рослин пшениці до низьких температур взимку, а також генетичного підґрунтя таких особливостей кореневої системи, що пов'язана з кращою зимостійкістю пшениці.

Дикорослі родичі пшениці, що використовуються як джерела генів стійкості до різних хвороб пшениці, також можуть бути використані для збагачення генофонду пшениці генами, що беруть участь у контролі розвитку кореня і можуть забезпечити утворення такої кореневої системи, що зумовить кращу пристосованість рослин пшениці до певних абіотичних стресів. *Amblyopyrum muticum* (*Aegilops mutica*) є диплоїдним дикорослим родичем пшениці, що в природних умовах зростає в Центральній Туреччині та Вірменії [94]. Цей вид має геном Т, який характеризується значним рівнем гомології з D геномом пшениці, і ці два геноми можуть кон'югувати [104; 157]. Порівняно з іншими дикорослими родичами пшениці, *Amblyopyrum muticum* не був особливо залучений до інтрогресивної гібридизації.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Роботу виконано в рамках фундаментальних наукових проектів кафедри біології НаУКМА «Формування геному поліплоїдних злаків за умов штучної інтрогресії чужинного хроматину та у природних умовах» № держреєстрації 0110U001272, «Інтрогресивні процеси у геномі м'якої пшениці та їх застосування для генетичного аналізу *Triticinae*», № держреєстрації 0110U001273, «Підвищення екологічної пластичності м'якої пшениці через індукцію рекомбіногенезу за участю інтрогресивного хроматину», № держреєстрації 0112U003159.

Мета і завдання дослідження

Мета роботи – встановити морфогенетичну природу різниці у зимостійкості між сортом м'якої пшениці Аврора та геномно-заміщеним амфідиплоїдом Авротіка.

Відповідно до мети були поставлені такі завдання:

1. Оцінити різницю у реакції на холодний стрес між сортом Аврора та амфідиплоїдом Авротіка з використанням методів визначення вільного проліну у клітинах, оцінки електричної провідності рідини із вмістом пошкоджених клітин, оцінки успішності відростання паростків після штучного проморожування.

2. Виконати порівняльне вивчення архітектури кореневої системи Авротіки та Аврори у термінах оцінки кількості коренів, довжини найдовшого кореня, об'єму рідини, яку витісняє коренева система при зануренні у посудину з рідиною.

3. Створити інтрогресивні ліній м'якої пшениці, що походять від схрещування сорту Аврора і амфідиплоїда Авротіка. Для цього:

- отримати гібрид (Авротіка х Аврора) F_1 та вивчити його самофертильність за умов ізоляції колосів під час цвітіння;
- популяцію F_2 виростити у природних польових умовах, створюючи тим самим рослини-засновники інтрогресивних ліній, здатних переносити зимовий стрес;
- за допомогою методу визначення кількості хромосом у апікальній меристемі первинних корінців паростків F_3 та F_4 відібрати такі, що мають кількість хромосом 40-44, і перспективні для створення ліній пшениці з різним обсягом інтрогресії хромосом геному Т до геному пшениці сорту Аврора.

4. Перевірити наявність в геномах гібридних рослин генетичного матеріалу від Т геному методом дот-блот гібридизації та за допомогою оцінки морфологічних ознак рослин.

5. Серед мікросателітних локусів, що вважаються специфічними до хромосом 5 гомеологічної групи пшениці, у яких локалізовані відомі гени морозостійкості пшениці, відібрати такі, що є поліморфними для Аврори та Авротіки.

5. За поліморфними локусами, специфічними для хромосом 5-ої гомеологічної групи, скринувати рослини популяцій F_4 та F_5 гібрида Авротіка х Аврора.

6. Порівняти зимостійкість інтрогресивних ліній, що мають або не мають мікросателітних маркерів хромосоми 5Т.

7. Порівняти архітектуру кореневої системи інтрогресивних ліній, що мають або не мають мікросателітних маркерів хромосоми 5Т.

8. На основі даних наукової літератури запропонувати гени-кандидати на роль ключових регуляторів зимостійкості у рослин з інтрогресіями від *Ae. mutica* та розробити праймери для скринування рослин інтрогресивних ліній та дослідження їхньої можливої участі в забезпеченні підвищеної зимостійкості ліній.

Об'єкт дослідження – геномно-заміщений амфідиплоїд Авротіка, сорт м'якої пшениці Аврора, інтрогресивні лінії пшениці, що походять від схрещування Аврора x Авротіка та наступного самозапилення.

Предмет дослідження – висока зимостійкість геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка, особливості архітектури кореневої системи Авротіки, Аврори, інтрогресивних ліній з підвищеною зимостійкістю

Методи дослідження

Метод штучної гібридизації рослин, встановлення кількості хромосом в первинних корінцях пшениці, визначення вільного проліна, визначення електричної провідності рідини зі вмістом клітин, руйнованих низькою температурою, оцінка виживання рослин в полі, виділення ДНК зі ЦТАВ буфером, ПЛР, електрофорез в поліакриламідному гелі за денатуруючих умов та в агарозному гелі, визначення характеристик кореневої системи, оцінка рослин за ознаками морфології, методи статистичної обробки даних.

Наукова новизна

Вперше створено набір гексаплоїдних інтрогресивних ліній з залученням генетичного матеріалу виду *Aegilops mutica*, який досі у віддаленій гібридизації практично не використовувався.

Показано, що обмежена самофертильність гібридів ранніх генерацій є природним фактором добору рослин зі збалансованими хромосомними наборами, що робить етап визначення кількостей хромосом у окремих рослин зайвим.

В роботі вперше показано, що одним з можливих механізмів підвищення зимостійкості Авротіки у порівнянні з Аворою є формування у неї більш

розвиненої кореневої системи, якщо оцінювати її як відношення обсягу коренів, який припадає на один наземний пагін.

Встановлено, що лінії, які мають заміщення мікросателітних маркерів, специфічних до хромосом 5-ої гомеологічної групи пшениці, на маркери хромосоми 5Т, характеризуються більш високим відношенням об'єм коренів/кількість пагонів та кращою зимостійкістю у порівнянні з Авророю.

Вперше встановлено, що за умов загартовування краще зимують лінії з властивим Авротіці алелем гена *TaAGL21*, що кодує транскрипційний фактор, ефектор синтезу ауксину, який є промотором утворення бічних коренів.

Практичне значення

Створені інтрогресивні лінії Аврора/Авротіка можна використовувати як джерело корисних ознак для покращення м'якої пшениці, серед яких підвищена зимостійкість, стійкість до борошнистої роси та листової іржі. Лінії можна використовувати для створення картуючих популяцій, придатних для генетичного аналізу геному пшениці за всіма ознаками морфології та фізіології, за якими Авротіка відрізняється від сортів м'якої пшениці. При спробі використати лінії для покращення зимостійкості пшениці скринування гібридних популяцій за геном *TaAGL21* можна використовуватися для добору рослин з потенційною здатністю формувати таку архітектуру кореневої системи, яка буде забезпечувати кращу перезимівлю рослин через збереження коренів та краще забезпечення наземної маси водою та мінеральними речовинами.

Особистий внесок здобувача

Написання огляду літературних джерел та виконання експериментальної частини роботи було здійснено особисто здобувачем. Планування експерименту та аналіз отриманих результатів здійснювалися разом з Терновською Т. К. та науковим керівником Антонюком М. З.

Також висловлюю подяку Джорджу Федаку (Eastern Cereal and Oilseed Research Center, Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa), в лабораторії якого було виконано частину роботи з мікросателітного аналізу.

Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертації доповідалися на IX Міжнародній науковій конференції "Молодь та поступ біології " (Львів, Україна, 2013), VI Міжнародній конференції молодих вчених «Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція», присвяченій 150-річчю від дня народження видатного ботаніка В.І. Липського. (Одеса, Україна, 2013), X Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції» (Чернівці, Україна, 2015), XI Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції» (Одеса, Україна, 2016).

Публікації

За темою дисертації опубліковано 13 наукових робіт, з них 8 статей у наукових журналах та тези 5 доповідей у збірниках матеріалів міжнародних і всеукраїнських конференцій.

Структура і обсяг роботи

Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, експериментальної частини, узагальнення результатів, висновків та списку використаних джерел, який включає 237 джерел. Дисертація викладена на 200 сторінках машинописного тексту, вона містить 34 рисунки і 23 таблиць.

РОЗДІЛ 1

КЛІТИННО-МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ФОРМУВАННЯ ХОЛОДОСТІЙКОСТІ У РОСЛИН (огляд літератури)

Зимо-морозостійкість є економічно важливою ознакою і значну кількість досліджень виконано для встановлення генетичного контролю та молекулярних механізмів стійкості до низьких температур у рослин, як модельних, так і сільськогосподарсько важливих видів. Використання модельних видів пояснюється тим, що вони мають певні характеристики, які роблять їх особливо зручними для проведення біологічних досліджень (малі розміри, малий геном, короткий життєвий цикл, легкість культивування в лабораторії). Інформація про фізіологічні та молекулярно-генетичні процеси, що лежать в основі зимо-морозостійкості, отримана на модельних об'єктах, часто буває корисною при дослідженні інших видів, зокрема економічно важливих. Тим не менше, результати, отримані при дослідженні модельних об'єктів, не можуть бути повністю перенесені на інші організми, і кожен вид потребує окремого дослідження особливостей генетичних і молекулярних механізмів його біологічних процесів (розвитку морозостійкості зокрема) [12].

1.1. Молекулярні механізми морозостійкості рослин, досліджені на модельних рослинах

1.1.1. Процес загартовування у рослин. Морозостійкість – здатність рослин виживати при дії низьких (нижче нуля) температур, запобігати пошкодженням вегетативних тканин та мінімізувати негативний вплив цих низьких температур на врожай [75]. Морозостійкість рослин значно підвищується в процесі загартовування (cold acclimation). Загартовування – це адаптивний процес, який відбувається за низьких позитивних температур (вище нуля) в рослинах, і має своїм результатом підвищення морозостійкості цих загартованих рослин, порівняно з незагартованими рослинами. Процес

загартовування включає різні фізіологічні, біохімічні та молекулярні зміни, що будуть захищати структури рослинної клітини від наступного морозного стресу (дії низьких температур нижче нуля). Ці зміни включають підвищення та зниження рівня експресії різних холод-регульованих генів (cold-responsive genes) [77; 132], накопичення специфічних захисних сполук (білків, амінокислот, цукрів і поліамінів) [209; 128; 228; 23], зміни складу мембрани [34], зміни характеристик метаболізму [149], підвищення активності антиоксидантних систем [37]. Ефективність процесу загартовування та набутої внаслідок цього морозостійкості залежить від специфічних алелів генів, що беруть участь у контролі морозостійкості. Отже, розуміння молекулярних механізмів, що відбуваються під час процесу загартовування, є важливим для розробки ефективних стратегій покращення морозостійкості сільськогосподарсько важливих рослин.

1.1.2. Сприйняття низької температури рослинами. Сприйняття зміни температури є першим кроком для ініціювання процесу загартовування і підготовки рослини до виживання під дією морозного стресу, тому дослідження механізмів сприйняття низьких температур є важливим для розуміння всього шляху відповіді рослини на низькотемпературний стрес [139].

Плазматична мембрана рослинної клітини вважається первинною мішенню впливу низьких температур. Los і Murata [139] вважають, що відчуття рослиною холоду відбувається через зміни властивостей мембрани, таких як текучість/жорсткість, що відбуваються у відповідь на зміну температури [39]. Було показано, що низькі температури викликають зменшення текучості мембрани (мембрана стає більш жорсткою), і навпаки – за вищих температур текучість мембрани збільшується (жорсткість зменшується) [24]. Ця гіпотеза Los та Murata (про те, що мембрана є первинним сайтом сприйняття зміни температури) отримала підтвердження в дослідженнях з використанням хімічних сполук, які змінюють властивості мембрани (текучість/жорсткість). Такою сполукою є, наприклад, що бензолвий спирт. Було показано, що індукована холодом експресія гена *Cas30* (*COLD-ACCLIMATION SPECIFIC*) у

люцерни (*Medicago sativa*) була блокована дією бензолового спирту, що супроводжувалося зменшенням морозостійкості люцерни [158]. Щодо складу мембрани відомо, що більша кількість ненасичених жирних кислот мембранних ліпідів збільшує текучість мембрани, і під впливом холодового загартовування у рослин збільшується експресія генів десатураз жирних кислот [139]. Показано, що використання диметилсульфоксиду, сполуки, що підвищує жорсткість мембрани, індукувало експресію холод-індукованого гена *BN115* у *Brassica napus* без дії низької температури [173]. Ці дослідження певною мірою підтверджують гіпотезу про те, що зміни властивостей плазматичної мембрани можуть впливати на експресію генів, регульованих холодом, і, принаймні потенційно, впливати на морозостійкість рослини.

Інші фактори, залучені у сприйнятті рослиною низьких температур, є кількість і якість світла, яке сприймає рослина. Відповідно до результатів Sotaimo і колег [188], загартовування рослин є більш ефективним за умов освітлення, ніж в темряві. Якщо загартовування відбувається на світлі, активується приблизно вдвічі більше генів, ніж при загартовуванні рослин в темряві [188]. Крім того, показано, що опромінення рослин ультрафіолетовим світлом, або світлом високої інтенсивності, може частково підвищити морозостійкість рослин, навіть без витримування за низьких температур (без холодового загартовування) [101; 102; 225]. В дослідженні, що проводилось на паростках озимої пшениці, отримано дані, що паростки, опромінені ультрафіолетом-В (UV-B), мали нижчу температуру LT₅₀, порівняно з контрольною групою (неопроміненими паростками). Збільшення морозостійкості UV-B-опромінених паростків пояснюється активацією антиоксидантних ензимів та метаболітів (зокрема аскорбат-глутатіонового циклу) [225]. В іншому дослідженні вивчали вплив інтенсивності світла на морозостійкість пшениці. Отримані результати показали, що рослини пшениці, які витримувалися за умов високої інтенсивності світла (без дії низьких температур), показали вищий рівень морозостійкості, порівняно з контрольними рослинами, що співвідносилося зі зменшенням насичення

гексадеканоїдної кислоти та підвищенням активності таких антиоксидантних ферментів, як глутатіонредуктаза та аскорбатпероксидаза [102]. Світло може також індукувати активність певних ізоформ дельта-12-десатураз жирних кислот, зокрема FAD2-3 FAD2-4. Ці ферменти активуються за дії низьких температур, а також регулюються світлом і забезпечують модифікації жирних кислот, які забезпечують зміни властивості мембрани (що може мати значення для адаптації рослин до холодового стресу) [110].

Зміни температури сильно впливають на фотосинтетичний апарат рослинної клітини. Було показано, що приблизно 50% білків, що диференційно накопичуються під час загартовування, беруть участь у процесах фотосинтезу [188]. Зокрема, активність РУБІСКО підвищується під час процесу загартовування, що пов'язано з накопиченням більш активної форми РУБІСКО активази (RA) – RA beta. За умов холодового стресу фотосинтетичний апарат продукує підвищену кількість активних форм кисню (АФК), і крім здатності спричинити пошкодження клітинних структур, ці активні форми кисню беруть участь у процесах передачі сигналу (для забезпечення відповіді на холодний стрес зокрема) [194]. У вже вище згаданому дослідженні UV-B-опромінених паростків пшениці, H_2O_2 , як припускалося, діє як сигнальна молекула, оскільки підвищення рівня H_2O_2 супроводжувалося підвищенням активності ферментів, що знешкоджують активні форми кисню [225].

В дослідженні, що проводилося на *Arabidopsis*, [131], показана роль специфічного варіанта гістонового білка, H2A.Z, у сприйнятті змін температури. Автори показали, що гістон H2A.Z частіше зустрічається в нуклеосомах за умов зниження температури. Такі H2A.Z-вмісні нуклеосоми забезпечують більш щільне згортання ДНК, і це перешкоджає просуванню РНК-полімерази і транскрипції генів, експресія яких має бути знижена під час дії низьких температур. З іншого боку, в цис-регуляторних елементах генів, експресія яких має підвищитися за дії низької температури, H2A.Z гістон, як передбачається, може перешкоджати зв'язуванню транскрипційних факторів-супресорів транскрипції, або перешкоджає метилуванню ДНК. Це може бути

одним з важливих механізмів регуляції транскрипції у відповідь на зміни температури [131].

Інше дослідження ролі гістонів у сприйнятті змін температури показало, що експресія генів двох гістонів, *H2A* та *HTA11*, знижується під час процесу загартовування (між 3 та 7 днями за 3°C) у тканині конуса наростання озимого ячменю [103]. Автори припускають, що таке зниження експресії генів цих гістонів має результатом менш щільну упаковку ДНК, що сприяє експресії холод-регульованих генів. На думку авторів, таке ремоделювання нуклеосом може бути специфічним механізмом відповіді на холодоровий стрес для конусів наростання (у озимого ячменю) [103].

Дослідження механізмів сприйняття рослиною низьких температур є важливим, оскільки здатність рослини вчасно почати процес загартовування забезпечує підготовку до наступного морозного стресу (дії температур сильно нижче нуля). Для того, щоб пов'язати сприйняття зниження температури рослиною з наступними змінами, що відбуваються в рослинній клітині, існують вторинні посередники. Такий поширений і канонічний вторинний посередник, як Ca^{2+} , відіграє важливу роль і на шляху передачі сигналу у відповідь на холодоровий стрес [47]. Вихід іонів Кальцію в цитозоль є одним з найперших наслідків сприйняття зниження температури [108; 95]. Цей процес може бути пояснений механочутливими кальцієвими каналами, що активуються у відповідь на збільшення жорсткості мембрани під дією зниження температури. Роль Ca^{2+} в активованому низькою температурою сигнальному шляху була підтверджена в дослідженні з використанням хелаторів іонів Кальцію та блокаторів кальцієвих каналів, що перешкоджали загартовуванню рослин [151]. Подальша передача сигналу відбувається завдяки Кальцій-зв'язувальним білкам (Calcium Binding Proteins - CBPs), які вже взаємодіють з різними цільовими білками та змінюють їхню активність [54]. В дослідженні пшениці показано, що Кальцій накопичується в цитоплазмі у відповідь на стрімке зниження температури (холодоровий шок), але не на поступове [153], очевидно,

що роль Кальцію з процесах відповіді на вплив низьких температур потребує подальшого дослідження.

1.1.3. CBF транскрипційні фактори у відповіді рослин на холодний стрес. При дослідженні генетичного контролю та молекулярних механізмів певної складної ознаки, виявлення головних транскрипційних факторів, що регулюють розвиток цієї ознаки, часто вважається першим і важливим завданням. Ці транскрипційні фактори працюють як «перемикачі» (“masterswitches”) та координують експресію багатьох інших генів. Ідентифікація основних транскрипційних факторів, що регулюють розвиток такої економічно важливої ознаки як морозостійкість є потрібним для можливості покращення цієї ознаки.

Наразі найкраще дослідженим шляхом відповіді рослин на холодний стрес є CBF шлях. Транскрипційні фактори CBF (C-repeat Binding Factors) були вперше ідентифіковані у *Arabidopsis thaliana* [138; 82], і це було важливою подією для розуміння механізмів морозостійкості рослин. CBF фактори також відомі як DREB1 (Dehydration Response Binding factors 1), оскільки, крім стійкості до холодного стресу, ці транскрипційні фактори беруть участь у відповіді на інші стреси з компонентом зневоднення, як, наприклад, осмотичний стрес [138; 82]. DREB транскрипційні фактори зв'язуються зі специфічними регуляторними регіонами в промоторах DREB-регульованих генів. Dehydration-responsive element (DRE; TACCGACAT) – специфічна послідовність, що вперше була виявлена в промоторі гена *Arabidopsis RD29A*, експресія якого індукується у відповідь на дію низької температури та зневоднення [221]. Цей регуляторний елемент (DRE) містить корову послідовність з 5 пар нуклеотидів, багату на Цитозин (CCGAC), яка називається C-repeat (CRT) [30]. Цей C-повтор присутній в промоторах багатьох регульованих холодом генів, зокрема в промоторі гена *Arabidopsis COR15A* та гена пшениці *WCS120* [209]. CBF транскрипційні фактори зв'язуються з цими специфічними цис-регуляторними послідовностями (C-повторами) в промоторах певних генів і регулюють експресію цих генів.

У *Arabidopsis* родина CBF транскрипційних факторів представлена трьома членами: CBF1 (DREB1B), CBF2 (DREB1C) та CBF3 (DREB1A). Дослідження на *Arabidopsis* показали, що CBF гени не містять інтронів і розташовані один за одним на хромосомі 4 – CBF1-CBF3-CBF2 [146]. На думку Medina і колег (146), CBF гени еволюційно походять від одного гена шляхом дуплікації та дивергенції. У більшості інших досліджених видів рослин CBF гени присутні у значно більшій кількості, ніж у *Arabidopsis*.

Інформація щодо структури CBF транскрипційних факторів також була отримана в дослідженнях на *Arabidopsis thaliana*. CBF належать до родини AP2/ERF (APETALA2/Ethylene-Responsive Factor) транскрипційних факторів. На своєму N-кінці, CBF білки містять основні амінокислотні залишки, які потенційно відповідають за ядерну локалізацію, а на С-кінці CBF транскрипційні фактори мають активаційний домен. CBF транскрипційні фактори також мають AP2/ERF домен для зв'язування з ДНК. AP2 домен складається з β -шару та α -спіралі, і амінокислотні залишки 14 та 19 β -шару є важливими для зв'язування цільової ДНК. Для CBF транскрипційних факторів, 14 та 19 амінокислотні залишки представлені валіном та глютаміною кислотою, відповідно [138].

Незважаючи на те, що CBF транскрипційні фактори є важливими для регуляції відповіді рослини на дію низьких температур, вони не є єдиними факторами, що регулюють цю відповідь. Для *Arabidopsis* показано, що лише приблизно 12% генів, експресія яких змінюється у відповідь на дію низьких температур, регулюються CBF транскрипційними факторами, це складає приблизно 4% від усіх генів *Arabidopsis* [210]. Отже, CBF шлях є, можливо, одним з кількох регуляторних шляхів, що беруть участь у забезпеченні відповіді рослини на холодострес.

Взаємозв'язки між трьома CBF транскрипційними факторами *Arabidopsis* досліджували з використанням *cbf2* мутантів, і було показано, що CBF2 є негативним регулятором CBF1 та CBF3. За відсутності функціонального CBF2, збільшується вміст транскриптів а білків CBF1 та CBF3, а також

морозостійкість *Arabidopsis* підвищується. Вважається, що CBF2 координує роботу CBF-регулону [156]. У випадку присутності більше, ніж трьох CBF генів, як у більшості інших рослин, взаємозв'язки між різними CBF факторами потребують окремого дослідження.

Крім *Arabidopsis*, транскрипційні фактори CBF були виявлені у багатьох інших видів рослин: пшениці (*Triticum aestivum*) [28], люцерни (*Medicago truncatula*) [164], томата (*Lycopersicum esculentum*) [230], кукурудзи (*Zea mays*) [168], риса (*Oryza sativa*), жита (*Secale cereale*) [38], ячменю (*Hordeum vulgare*) [181] та інших видів. Це вказує на те, що, CBF транскрипційні фактори є консервативними і важливими для відповіді на холодострес для різних видів рослин [45].

Активація регульованих холодом генів через зв'язування CBF транскрипційних факторів зі специфічними ділянками в промоторах (С-повторах), іноді називається АБК-незалежним шляхом (abscisic acid-independent pathway). У рослин існує також інший шлях регуляції експресії генів у відповідь на низькотемпературний стрес, він називається АБК-залежний шлях (ABA-dependent pathway) [195]. Цей шлях є менш дослідженим, порівняно з CBF шляхом. У ньому ендогенна абсцизова кислота активує bZIP (basic leucine zipper) транскрипційні фактори, які зв'язуються з відповідними цис-регуляторними елементами – ABRE (ABA-responsive elements) в промоторах так званих АБК-залежних COR-генів (Cold-Regulated), та регулюють їхню експресію [115]. Взаємодія між цими двома шляхами регуляції генів у відповідь на холодострес потребує подальшого дослідження.

З приводу участі інших фітогормонів у регуляції відповіді на холодострес відомо, що транскрипційний фактор TERF2/LeERF2, який функціонує як позитивний регулятор біосинтезу етилену, також пов'язаний з морозостійкістю: транс генні рослини тютюну і томату з надекспресією цього транскрипційного фактора, характеризуються вищою морозостійкістю [233].

Виявлення CBF транскрипційних факторів є важливим кроком до розуміння механізмів морозостійкості рослин. Проте найбільше досліджень

функціонування цих транскрипційних факторів проводиться на *Arabidopsis*, а щодо дикорослих видів родичів пшениці, які потенційно можуть бути донорами для покращення морозостійкості пшениці, то немає поки достатньої інформації щодо особливостей функціонування і структури їхніх *CBF* транскрипційних факторів.

1.1.4. Регуляція експресії *CBF* генів. Транскрипційні фактори *CBF* не лише регулюють експресію *CBF*-залежних генів, експресія яких має змінюватися у відповідь на холодний стрес, але і самі регулюються специфічними факторами. Експресія *CBF* генів регулюється на транскрипційному рівні кількома активаторами та репресорами [46; 21].

Найбільш добре охарактеризованим позитивним регулятором експресії *CBF* генів є ICE1 (Inducer of CBF Expression 1). ICE1 належить до MYC-типу основних спіраль-петля-спіраль транскрипційних факторів (MYC-type of basic helix-loop-helix, bHLH), і вперше його було ідентифіковано у *Arabidopsis* [46]. В цьому дослідженні було показано, що *ice1* мутант характеризувався зниженим рівнем експресії *CBF3* за умов низької температури, і зниженою стійкістю до низькотемпературного стресу. Як показано, білок ICE1 зв'язується зі специфічними MYC-послідовностями, регуляторними цис-елементами в промоторах *CBF3* та *CBF2* генів [46]. Ці послідовності для зв'язування ICE1, які були вперше ідентифіковані Zarka і колегами в промоторі *CBF2*, були названі ICEr1 та ICEr2 (ICE region1 and 2) [229], вони також називаються ICE-box [47]. ICE-подібні білки позитивно регулюють експресію *CBF1* та *CBF2*, що підтверджується ідентифікацією ICE2, який активує експресію *CBF1* [72].

Цікаво, що ген *ICE1* експресується конститутивно, але ICE1 білки активують експресію *CBF* генів лише у відповідь на низьку температуру, що забезпечує адекватну відповідь рослини на холодний стрес [46]. Пояснення цьому факту знайдено, коли показали, що регуляція активності ICE1 відбувається через посттрансляційні модифікації [46; 61]. Одна з індукованих холодом модифікацій білка ICE1 – його фосфорилування [цит. за 148]. Крім того, активність ICE1 регулюється через протеасомну деградацію цього білка.

В дослідженнях Dong і колег [61] було продемонстровано, що HOS1 є убіквітин E3 лігазою (ubiquitinE3 ligase), яка здійснює убіквітинування білка ICE1. Поліубіквітинільований під дією HOS1, білок ICE1 направляється в протеасому для деградації. Дослідження рослин *Arabidopsis* з надекспресією гена *HOS1* характеризуються зниженою експресією *CBF* генів та гіперчутливістю до холодового стресу [61; 145].

Для того, щоб попередити протеасомну деградацію ICE1 за умов холодового стресу, коли його активність необхідна для активації *CBF* генів, відбувається інша посттрансляційна модифікація білка ICE1. Цією «захисною» модифікацією є сумоїлювання ICE1. Сумоїлювання – це посттрансляційна модифікація білків, що здійснюється специфічними ферментами – SUMOE3 лігазами, які приєднують SUMO (small ubiquitin-like modifier) залишки до специфічних сайтів цільових білків. Сумоїлювання захищає білки від протеасомної деградації завдяки тому, що перешкоджає їх поліубіквітинуванию [206]. У *Arabidopsis* ідентифікували SIZ1 SUMOE3 лігазу, що приєднує SUMO до K393 (лізину в положенні 393) білка ICE1 *Arabidopsis* під час процесу загартовування [148]. Показано, що *siz1* мутанти (рослини з нефункціональною SIZ1 SUMOE3 лігазою) мають знижені рівні експресії *CBF* генів, *CBF*-залежних *COR*-генів, та характеризуються підвищеною чутливістю до холодового стресу [148]. Отже, сумоїлювання ICE1 є важливим для його стабільності та функціонування в активації *CBF* генів [47].

Крім дії ICE білків, експресія *CBF* генів також позитивно регулюється CAMTA3. Транскрипційні фактори CAMTA1 та CAMTA3 належать до родини кальмодулін-зв'язувальних транскрипційних активаторів (CAMTA), і зв'язуються зі специфічними регіонами в промоторах *CBF2* гена [66]. Дослідження з мутантами *Arabidopsis* показують, що CAMTA 3 і CAMTA1 є необхідними для нормального проходження процесу загартовування рослини [66; 60].

Негативним регулятором експресії *CBF* генів є MYB15, що був ідентифікований Agarwal і колегами також у *Arabidopsis* [21].

Транскрипційний фактор MYB15 зв'язується зі специфічними MYB сайтами в промоторах *CBF* генів та негативно регулює їхню експресію. MYB15 належить до R2R3-Myb родини транскрипційних факторів, і може зв'язуватися з відповідними послідовностями в промоторах усіх трьох генів *CBF Arabidopsis* [21]. Інший MYB транскрипційний фактор – MYBS3, також функціонує як негативний регулятор CBF сигнального шляху риса, але може позитивно впливати на стійкість до низьких температур [190]. Рослини риса, що оверекспресували MYBS3, характеризувалися підвищеною стійкістю до низьких позитивних температур (4°C протягом тижня без негативного впливу на врожай). Автори припускають, що оскільки CBF-шлях швидко активується у відповідь на холодний стрес, а MYBS3 відповідь є більш повільною, то ці шляхи є послідовними і комплементарними у відповіді на короткотривалий і довготривалий холодний стрес у риса [190].

1.1.5. Взаємодія CBF генів і циркадного годинника. Гени *CBF1*, *CBF2* та *CBF3 Arabidopsis* регулюються циркадним годинником, тобто інтенсивність їхньої експресії залежить від часу за годинником, коли почав діяти стимул (низька температура). Ця регуляція здійснюється через позитивну дію двох головних компонентів годинника: CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 (CCA1) LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) [62]. У рослин з подвійною мутацією *cca1-11/lhy-21* індукція холодом генів *CBF1*, *CBF2* та *CBF3* сильно порушена, а циркадна регуляція генів *CBF1* та *CBF3* обмежена, циркадна регуляція *CBF2* продовжується, але амплітуда зменшена. У рослин з подвійною мутацією *cca1-11/lhy-21* також порушена циркадна регуляція та індукція холод-регульованих генів *COLD-REGULATED GENE 15A (COR15A)*, *COR47* та *COR78*. Ця подвійна мутація також спричинює порушення морозостійкості цих рослин, як загартованих, так і не загартованих. Ці результати вказують на зв'язок між циркадним годинником і набуттям морозостійкості, і такі компоненти циркадного годинника як CCA1 та LHY є позитивними регуляторами зумовленої холодом індукції *CBF* генів [62]. Крім того показано, що інші компоненти циркадного годинника можуть бути негативними

регуляторами експресії *CBF* генів. Наприклад, у рослин з потрійною мутацією *prp9-11/prp7-10/prp5-10* порушується циркадна регуляція та холодова індукція *CBF* генів і рівень їхньої експресії залишається високим навіть за кімнатної температури (за відсутності дії низьких температур), тобто PRR9, PRR7 та PRR5 є негативними регуляторами експресії *CBF* генів [62].

Негативним регулятором експресії гена *CBF2 (DREB1C)* є Phytochrome-Interacting Factor7 (PIF7), і він діє під контролем циркадного годинника. [112]. В промоторному регіоні гена *CBF2* міститься специфічна регуляторна послідовність G-box з якою специфічно зв'язується PIF7, що діє як транскрипційний репресор. Регуляція PIF7 здійснюється через циркадний годинник і його експресія не залежить від дії низької температури. Негативна регуляція гена *CBF2* є важливою для запобігання затримки росту рослини через накопичення білка *CBF2* за умов відсутності стресу (дії низької температури) [112].

1.1.6. Регульовані холодом гени (Cold Regulated – COR-genes). Цільовими генами для регуляції *CBF* транскрипційними факторами є COR-гени (Cold Regulated), тобто гени, експресія яких змінюється під дією низьких температур. Ці гени представляють вже більш ефекторну частину шляху відповіді рослини на холододовий стрес. У своїх промоторах COR-гени містять CRE (C-repeat) цис-регуляторні елементи, з якими зв'язуються *CBF* транскрипційні фактори та індукують експресію COR-генів у відповідь низькі температури [184; 100]. Продуктами COR-генів є ефекторні білки, що готують рослину до наступного холододового стресу, захищають від пошкодження заморожуванням, тобто забезпечують механізми виживання рослини під час дії низьких температур. Серед продуктів COR-генів є антифризові білки, антиоксидантні ензими, ензими, що відповідають за зміну процесів метаболізму за умов стресу [87; 124; 194]. Основні групи COR-генів (відповідно, їхніх продуктів) дають можливість приблизно уявити основні механізми, що забезпечують морозостійкість рослин.

Зневоднення є одним з основних компонентів стресу заморожування (freezing stress). Частина COR-генів кодують білки-дегідрини. Дегідрини належать до групи II LEA (Late Embryogenesis Abundant) білків. Вони є сильно гідрофільними і накопичуються у відповідь на стреси з компонентом зневоднення, зокрема стрес заморожування та осмотичний стрес [124; 213]. Дегідрини мають лізин-багатий мотив (K-сегмент), також є багатими на гліцин та полярні амінокислоти. Роль дегідринів у відповіді на холодоровий стрес може бути пов'язана з їх здатністю стабілізувати мембрани за умов зневоднення [124; 126]. Один з найкраще охарактеризованих генів пшениці, експресія якого змінюється у відповідь на холодоровий стрес, *WCS120*, належить до *Cor/Lea* суперродини і має значну гомологію з дегідринами ячменю [209]. Накопичення *WCS120* білків під час процесу загартовування пшениці позитивно корелює з морозостійкістю рослин пшениці [209]; було навіть запропоновано, що *WCS120* може використовуватися як молекулярний маркер морозостійкості [124]. Дослідження на ячмені показали, що існує зв'язок між морозостійкістю та специфічними алелями генів дегідринів ячменю [96]. Відповідно до результатів дослідження, комбінована присутність 6-нуклеотидної інсерції в екзоні 1 гена *Dhn4* та 30-нуклеотидна делеція в екзоні 1 гена *Dhn7*, асоційовані з підвищеним рівнем морозостійкості ячменю [96].

Під час холодорового стресу також відбувається утворення підвищеної кількості активних форм кисню (ROS), що може спричинити значне пошкодження клітинних структур. Отже, іншою важливою групою COR-генів є гени антиоксидантних ензимів (ROS scavenging enzymes), та ферментів, що беруть участь у синтезі антиоксидантних сполук [194]. Показано, що за умов холодорового стресу експресія генів антиоксидантних ензимів підвищується, зокрема таких ензимів як супероксиддисмутаза (SOD), аскорбатпероксидаза (APX), каталаза (CAT), глутатіонпероксидаза (GPX). Ці ензими безпосередньо залучені у нейтралізації активних форм кисню. Крім того, у відповідь на холодоровий стрес активується експресія генів ензимів, що належать до шляхів біосинтезу антиоксидантних сполук. Наприклад, халконсинтаза та

халконізомераза є представниками цієї другої групи, і залучені в синтезі флавоноїдів, вторинних метаболітів рослин, що відомі своєю функцією як антиоксиданти [218].

Гени антифризових білків та білків-інгібіторів рекристалізації льоду складають ще одну важливу групу COR-генів необхідних для забезпечення морозостійкості рослини. Антифризові білки (AFP) відкладають заморожування через зниження температури, коли починається замерзання (freezing point). Більшість антифризових білків спрямовуються в апопласт, тому що, порівняно з цитозолем, позаклітинна рідина має нижчу концентрацію розчинених речовин, що зумовлює початково вищу температуру (точку) замерзання. Цікаво, що антифризові білки вважають спорідненими до білків, необхідних для відповіді на дію патогена (PR proteins, pathogen-related) [87].

Коли починається замерзання, кристали льоду формуються переважно в позаклітинному просторі. Ці кристали збільшуються в розмірі по мірі того, як вода виходить з цитоплазми в апопласт в процесі спричиненого заморожуванням зневоднення. Ріст цих кристаликів льоду спричиняє механічне пошкодження клітинних мембран [222]. Білки-інгібітори рекристалізації льоду (Ice Recrystallization Inhibition (IRI) proteins), як показано, зв'язуються з кристаликами льоду та інгібують їхній ріст (збільшення розміру) та рекристалізацію [150]. Як вважається, IRI білки мають поверхню для зв'язування кристаликів льоду (ice-binding surface – IBS) [220; 202], і здатні зв'язувати кристали льоду неспецифічно через водневі зв'язки та Ван дер Ваальсові взаємодії [87]. Гени, що кодують IRI білки, досліджувалися на багаторічному райграсі. Два гени IRI білків позитивно регулюються під час холодового загартовування [232], та при перенесенні до *Arabidopsis* два гени IRI білків райграсу (*LpIRI-a*, *LpIRI-b*) підвищують виживання рослин *Arabidopsis*, що надекспресують ці гени під час стресу заморожування [232].

Олігосахариди можуть грати роль осмопротекторів під час холодового стресу та певною мірою перешкоджати зневодненню. Накопичення таких цукрів як рафіноза, трегалоза та сахароза, відповідно до результатів досліджень,

позитивно корелює з морозостійкістю рослин [164; 108]. Winfield і колеги [217] продемонстрували, що під час процесу загартовування рослин пшениці відбувається значне підвищення експресії гена галактинолсинтази (GolS). Галактинолсинтаза є першим ензимом на шляху біосинтезу рафінози, отже, підвищена експресія гена GolS потенційно призводить до накопичення більшої кількості рафінози, що, в свою чергу, діє як осмопротектор під час холодового стресу. Ці результати можуть вказувати, що гени шляхів біосинтезу цукрів складають ще одну важливу групу COR-генів. В іншому дослідженні показана роль накопичення гліцин-бетаїну для морозостійкості [234]. Рослини, які накопичують більшу кількість гліцин-бетаїну характеризуються вищим рівнем морозостійкості, що забезпечується кращим збереженням цілісності мембрани під дією холодового стресу, а також вищою активністю H^+ -АТРази [234]. Пристосуванням до виживання за умов морозного стресу також може бути накопичення проліну та фенольних сполук [123].

Під час процесу загартовування, різні адаптивні зміни відбуваються в різних компонентах клітини, і в цитоскелеті зокрема. На початкових стадіях загартовування відбувається реорганізація мікротрубочок, з утворенням мікротрубочок більш стабільних за умов холодового стресу. Ці процеси також залежать від диференційної експресії генів, як було показано, ген альфа-тубуліна *wca18g11* індукується під час процесу загартовування у пшениці. Продукт цього гена, як вважають автори, залучений у процесі регульованої холодом реорганізації цитоскелету [48].

WCSP1, один з регульованих холодом генів пшениці, кодує білок, що має домени для зв'язування нуклеїнових кислот і має спільні структурні характеристики з бактеріальними білками з групи білків холодового шоку [109]. Білок WCSP1 гомологічний переважно з CspA (cold shock protein A) *Escherichia coli*, і має два РНК-зв'язувальних домени. У прокаріотів процес, схожий на процес загартовування, називається «відповідь на холодний шок» ("cold shock response"), цей процес відбувається за низьких температур і найкраще досліджений у *E.coli*. Білок CspA є найкраще охарактеризованим з

білків холодового шоку і складає близько 10% всіх білків, що синтезуються під час процесу «відповіді на холодний шок». Цей білок (CspA) у *E.coli* зв'язується з РНК і дестабілізує її вторинні структури, отже, як вважається, він забезпечує трансляцію за низьких температур, перешкоджаючи утворенню вторинних структур мРНК. Можливо, що білок пшениці WCSP1 відіграє схожу роль у рослин [102].

Білкові продукти описаних COR-генів (Cold Regulated genes) диференційно накопичуються в рослинах з різним рівнем морозостійкості: як правило, більш морозостійкі рослини під час процесу загартовування накопичують більшу кількість дегідринів, антифризових білків, білків-інгібіторів рекристалізації льоду тощо, порівняно з менш морозостійкими рослинами. Визначення, за допомогою специфічних методів накопичення цих білкових продуктів COR-генів може показати, які механізми забезпечення морозостійкості переважають для певного виду рослин (або, можливо, певного генотипу). Альтернативно, відмінності в експресії COR-генів можуть визначатися на рівні транскрипції. Тим не менше, причиною різного рівня експресії COR-генів між рослинами з різним рівнем морозостійкості мають бути відмінності на рівні транскрипційних факторів, «головних регуляторів», отже, часто саме транскрипційні фактори розглядаються в якості «цілей» для можливого покращення морозостійкості сільськогосподарсько важливих видів рослин [12].

1.1.7. Гени, що відповідають за яровизацію, та їхній зв'язок з морозостійкістю. Цвітіння є критичною стадією життєвого циклу рослини і час цвітіння рослини має збігатися зі сприятливими умовами довкілля для того, щоб могло утворитися життєздатне насіння і було забезпечено виживання виду в наступних поколіннях. Яровизація – потреба рослин у тривалій дії низьких температур як один зі стимулів довкілля, необхідних для ініціації цвітіння, є захисним механізмом, що попереджає цвітіння рослин до настання сприятливих умов (весни). Потреба в яровизації є притаманною багатьом видам рослин, як дводольним, так і однодольним. Рослини, що потребують яровизації, часто

також мають потребу в додатковому стимулі довкілля для переходу до цвітіння – збільшенні довжини дня [57; 113].

Рослини з потребою яровизації повинні переживати низькі температури (в зимовий період), тому існує зв'язок між потребою рослини в яровизації та рівнем її морозостійкості. Крім того, генеративні тканини є набагато більш чутливими до дії низьких температур, порівняно з вегетативними, тому поки в рослині не відбувся перехід до розвитку генеративних органів, її морозостійкість є, як правило, набагато вищою, ніж після такого переходу [113].

Яровизація має кілька унікальних характеристик. По-перше, початкове сприйняття та відповідь на період низьких температур має відбутися в клітинах, що поділяються, так, наприклад, у молодих паростках, які активно ростуть, і, відповідно, це первинне сприйняття низьких температур часто відділене від часу цвітіння тижнями та навіть місяцями. Молекулярна пам'ять про яровизацію може зберігатися протягом наступного досить тривалого періоду вегетативного росту рослини, до того часу, як цвітіння буде індуковане збільшенням довжини дня. По-друге, для всіх видів рослин з потребою в яровизації (як однодольних, так і дводольних), характерним є повернення до початкового стану для насіння рослин наступного покоління, тобто рослини наступного не перейдуть до цвітіння без періоду дії низьких температур [57].

Процес яровизації має певні характеристики, що є спільними як для дводольних, так і для однодольних рослин, проте досить значними є і відмінності між цими групами. Спільним для обох груп є те, що процес яровизації включає регуляцію ключових генів шляхом епігенетичної модифікації – модифікацій хроматину, що не змінюють послідовність ДНК [57].

Дослідження молекулярних механізмів яровизації відбувалися на моделі *Arabidopsis*. У цього виду головні епігенетичні зміни, що супроводжують процес яровизації, відбуваються з локусом *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*) [203]. *FLC* кодує репресор цвітіння, що забезпечує продовження вегетативного росту

протягом несприятливих зимових умов. Внаслідок процесу яровизації відбуваються модифікації гістонів, що репресують *FLC*. Репресія цього локусу супроводжується підвищенням рівня триметилування лізину 27 (K27me3) в гістоні H3. Ця модифікація (H3 K27me3) здійснюється білками групи Polycomb, білками, що відповідають за ремоделювання хроматину і мають гомологів у *Drosophila*, ссавців, червів та рослин. Polycomb комплекс репресії 2 (Polycomb repressive complex 2 – PRC) має активність гістонової метилази і відповідає за епігенетичне пригнічення *FLC*. За відсутності репресорного білка *FLC* починається експресія двох генів – *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) та *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS* (*SOC1*) і продукти цих генів запускають інші гени, необхідні для ініціації процесу цвітіння. *FT* кодує білок, що діє як мобільний сигнал цвітіння, так званий «флориген», який рухається флоемою від листка до апекса і відповідає за формування квітки [203].

1.2. Генетичний контроль морозостійкості та яровизації пшениці

1.2.1. Основні локуси, що контролюють морозостійкість у пшениці.

Сорти озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) культивують у різних географічних районах, включно і з такими, де є сильні морози під час зимового періоду. Відповідно, розуміння генетичного контролю морозостійкості пшениці є важливим для покращення морозостійкості сортів, і цьому питанню було присвячено багато досліджень.

Відомо, що морозостійкість пшениці контролюється двома головними локусами кількісних ознак (QTLs, quantitative trait loci) – *Fr-1* (Frost Resistance 1) та *Fr-2*, що локалізовані на 5А хромосомі пшениці [74; 208; 40; 75].

Локус *Fr-1* (*Fr-A1*) було вперше картовано на 5А хромосомі пшениці Galiba та колегами з використанням RFLP картування [74]. Цей локус вважається або дуже близько зчепленим, або тим самим локусом, що головний локус яровизації *Vrn1* (main vernalization locus *Vrn-A1*) [74]. Фізичне картування

Fr-1 (Fr-A1) та *Vrn-A1* здійснювалося з використанням гомозиготних делеційних ліній пшениці для 5AL. Локус *Vrn-A1* було картовано між розривами (breakpoints) 0,68 і 0,78, а локус *Fr-A1* – між 0,67 і 0,68 [191; 31].

Локус *Fr-2 (Fr-A2)* представлений тандемно організованими генами CBF транскрипційних факторів [208], роль яких для розвитку морозостійкості детально досліджена на *Arabidopsis* і описана вище.

Як і могло очікуватися згідно з відомостями про гомологію субгеномів пшениці, локуси, що беруть участь у контролі морозостійкості, були ідентифіковані в складі 5D хромосоми - *Fr-D1* [183], та у складі 5B хромосоми пшениці - *Fr-B1* [201]. Схожим чином як *Fr-A1* тісно зчеплений з *Vrn-A1* [74], так і *Fr-D1* та *Vrn-D1* зчеплені [183], а також *Vrn-B1* ген було картовано на довгому плечі 5B хромосоми [201]. Хромосомна локалізація локуса *Fr-B1* вивчалася на двох популяціях рекомбінантних за однією хромосомою ліній з використанням мікросателітних маркерів, і *Fr-B1* було картовано на довгому плечі 5B хромосоми, на відстані 40 сМ від центромери [201].

1.2.2. CBF гени пшениці. Транскрипційні фактори CBF відіграють важливу роль у розвитку морозостійкості, є найкраще дослідженим шляхом відповіді рослини на холод, досить добре досліджені на *Arabidopsis*, який має три CBF гени. Інші види рослин переважно мають більшу кількість CBF генів. *Triticum aestivum* може мати близько 25 різних CBF генів [28]. CBF гени родини *Poaceae* можуть бути класифіковані на 10 груп, що мають спільне філогенетичне походження та схожі структурні характеристики. Шість із цих груп (IIIc, IIIId, IVa, IVb, IVc та IVd) зустрічаються лише у *Pooideae*, що вказує на їхню еволюцію для пристосування до зростання за умов помірного клімату [28].

Дослідження експресії CBF генів пшениці, розташованих у *Fr-A2* локусі, показали, що деякі гени експресуються диференційно у морозостійких та нестійких ліній пшениці [193]. Одна категорія генів: *Cbf-2*, *Cbf-A22*, *Cbf-B-22* збільшували експресію в процесі загартовування як у морозостійких ліній, так і нестійких. Інша категорія генів *Cbf* генів: *Cbf-3*, *Cbf-5*, *Cbf-6*, *Cbf-12*, *Cbf-14* та

Cbf-19) диференційно експресувалися між загартованими морозостійкими та нестійкими лініями (відносно до контролю – незагартованих рослин). Вищий рівень експресії цих генів у морозостійких ліній, як припускають автори, може бути пов'язаний з мутацією, яка добиралася позитивним добором, бо забезпечувала краще виживання за умов морозного стресу [193]. Автори пропонують таку модель взаємодії *Cbf* генів для розвитку морозостійкості. Один з *Cbf* генів, що належить до центрального кластеру (*Cbf-12* або *Cbf-14*) може функціонувати як ключовий регулятор інших генів (зокрема інших *Cbf* генів). Такий ключовий регулятор автори пропонують називати *Cbf-K*, а його цільові гени – *Cbf-T* (target). Можливі цільові гени (*Cbf-T*) включають *Cbf-3*, *Cbf-5*, *Cbf-6*, які в свою чергу регулюють експресію інших цільових генів, більш ефекторних (TG). Якщо за умов загартовування активується ген *Cbf-K* і продукується функціональний CBF-K білок, що може активувати наступні гени, то розвивається морозостійкий фенотип [193; 38].

Рівень морозостійкості пшениці може бути пов'язаним з присутністю/відсутністю делецій певних *CBF* генів [162]. Як відомо, у пшениці *CBF* генів набагато більше, ніж у *Arabidopsis*, відомо принаймні 15 (чи більше) генів, 11 з яких розташовані у *Fr-2* локусах гомеологічних хромосом 5 групи [29]. У тетраплоїдній на гексаплоїдній пшениці були виявлені великі мутації, які включають 6, 9 та всі 11 *CBF* генів з *Fr-B2* локуса. У культивованих сортів пшениці делеції в *Fr-B2* локусі є більш поширеними серед ярих сортів, ніж озимих сортів. Досліди з визначення морозостійкості показали, що як делеція 9-ти *CBF* генів тетраплоїдній пшениці, так і делеція всіх 11 *CBF* генів *Fr-B2* локуса у гексаплоїдній пшениці, призводять до значного зменшення морозостійкості (виживання рослин після морозного стресу) [162]. Точно невідомо чи три ідентифіковані делеції виникли незалежно, чи в результаті додаткових делецій, що відбулися у лінії, яка вже мала одну делецію. Делеції в регіоні геному, де знаходяться множинні копії споріднених генів не є неочікуваними. Крім того, великий геном пшениці може мати великі делеції без особливої шкоди для рослини завдяки поліплоїдії [64; 162]. Делеції генів *Fr-B2*

локуса пов'язані з типом розвитку пшениці – озима чи яра; так повна делеція всіх 11 *CBF* генів була ідентифікована у 22% ярих сортів, і лише у 2% озимих сортів пшениці [162]. Вважають, що збільшення кількості *CBF* генів відбулося під селективним тиском для покращення морозостійкості для виживання рослин протягом періоду низьких температур взимку.

1.2.3. Генетичний контроль яровизації у пшениці. Потреба в яровизації для пшениці визначає індукування цвітіння внаслідок перебування рослин за умов температури 4-6°C протягом 4-6 тижнів [174]. На основі потреби у яровизації сорти пшениці поділяють на озимі – ті, що переходять до цвітіння лише після перебування за вказаних низьких температур, та ярі – ті, які не потребують для переходу до цвітіння тривалого періоду дії низьких температур [174].

У диплоїдній пшениці (*Triticum monococcum* L., $2n=2x=14$, A^mA^m) та ячменю (*Hordeum vulgare* L., $2n=2x=14$, HH) яровизація контролюється щонайменше трьома генами: *VRN1*, *VRN2* та *VNR3* [64].

У гексаплоїдній пшениці (*T. aestivum* L., $2n=6x=42$, AABBDD) є три гомеологи гена *VRN1*: *VRN-A1*, *VRN-B1* та *VRN-D1*, що розташовані на довгих плечах хромосом 5 групи (5A, 5B та 5D, відповідно); це є головні гени, що визначають потребу в яровизації м'якої пшениці [64; 175; 183; 203]. Саме ці головні локуси яровизації вважаються також локусами *Fr-1*, одного з двох головних локусів, що відповідають за морозостійкість пшениці. Домінантний алель за будь-яким з цих локусів визначає ярий тип росту пшениці (без потреби яровизації). Для розвитку озимого типу росту (озимі сорти пшениці, з потребою яровизації), за всіма цими трьома генами мають бути рецесивні алелі: *vrn-A1*, *vrn-B1*, *vrn-D3* [64]. Що стосується інших генів яровизації, то ген *VRN2* у озимих сортів представлений домінантним алелем – *Vrn2*, а ген *VNR3* – рецесивним - *vrn3*, тобто комбінація алелів для озимого росту пшениці така: *vrn1*, *Vrn2*, *vrn3* [114].

Крім досить добре досліджених генів яровизації *VRN1*, *VRN2* та *VNR3*, які є клонованими та мають гомеологів у всіх трьох геномах [114], у пшениці

відомий також ген *VRN4* [85]. Цей ген *VRN4* було ідентифіковано спочатку лише в D геномі пшениці та було картовано на інтервалі 0,09 cM в центромерному регіоні хромосоми пшениці 5D. З використанням телоцентричних 5D хромосом було також встановлено, що цей ген знаходиться на короткому плечі 5D [114]. Показано, що домінантний алель гена *Vrn-D4* асоційований зі значним підвищенням експресії генів *VRN1* та *VNR3*, та зниженням експресії гена *VRN2* (зменшення кількості транскриптів в листі) [114]. Потрібне подальше дослідження того, як ген *VRN-D4* взаємодіє з іншими генами яровизації (*VRN1*, *VRN2* та *VNR3*) і входить в генетичну систему забезпечення потреби в яровизації пшениці.

1.3. Методи оцінки морозостійкості рослин

Оцінка морозостійкості рослин може проводитися в полі або в лабораторних умовах. Методи оцінки морозостійкості рослин в лабораторних умовах можна розділити на дві основні групи: прямі методи і непрямі методи [176]. При використанні прямих методів оцінки морозостійкості вивчають реакцію рослин на безпосередню дію стресового чинника – низьких температур нижче нуля. При використанні непрямих методів рослини не піддають дії температур нижче нуля, а оцінюють їхню морозостійкість за біохімічними змінами, індукованими загартовуваннями; або за присутністю молекулярних маркерів, асоційованих з генами, що залучені в контролі морозостійкості [176].

1.3.1. Тестування морозостійкості рослин в полі. Певною мірою окремо серед методів оцінки морозостійкості можна виділити тестування морозостійкості рослин в полі. Оскільки цей метод оцінки безумовно пов'язаний з безпосередньою дією низьких температур, його можна було б віднести до прямих методів оцінки, але тим не менше, окрім низької температури, в полі на рослини діє багато інших факторів, саме з цим і пов'язані як переваги, так і недоліки тестування в полі. Серед переваг тестування в полі можна виділити можливість оцінити різні чинники, що

впливають на перезимовування (не лише дію низьких температур), більш «реальні» умови. Водночас взаємодія багатьох факторів, що впливають на виживання рослин в полі, складність у встановленні того, які саме фактори є визначальними для виживання, нездатність контролювати умови є недоліками тестування морозостійкості рослин в полі [176]. Крім того, умови в полі часто можуть бути недостатньо жорсткими для диференціювання різних за морозостійкістю рослин. Існує таке поняття як «диференційна зима» [133] – це зима з досить жорсткими умовами, щоб «вбити» найбільш нестійкі рослини та пошкодити різною мірою рослини середньої морозостійкості. Такі зими можуть траплятися досить рідко. Для підвищення морозного стресу за умов тестування в полі (підвищення диференційності методу) можна використовувати такі способи: висаджувати рослини на земляному підвищенні висотою 20-30 см, де сніг зазвичай видувається вітром і рослини більшою мірою піддаються дії низьких температур; висаджувати рослини в дерев'яних коробках, які ставити на поверхні ґрунту у відкритому полі для того, щоб дія низьких температур краще досягала вузлів кушіння; або можна прибирати сніговий покрив з рослин, висаджених в полі, для підвищення морозного стресу [176].

Загалом на виживання рослин в полі можуть впливати такі фактори: нерівномірний сніговий покрив, склад ґрунту, глибина посадки, зволоженість ґрунту. Тому при тестуванні морозостійкості рослин в полі необхідно забезпечувати максимальну однорідність вище зазначених факторів [176].

1.3.2. Прямі методи оцінки морозостійкості. Через описані вище ускладнення, що виникають при тестуванні в полі, найчастіше оцінку морозостійкості рослин проводять за контрольованих умов з використанням спеціальних морозильних камер. Такі методи є прямими, оскільки передбачають безпосередню дію стресового чинника (низької температури), і оскільки умови є контрольованими, виключають вплив інших чинників дозволяючи оцінити дію саме низької температури на рослини [176].

Для підвищення рівня морозостійкості, рослини перед тестом на морозостійкість піддають тривалій дії низьких температур вище нуля для того,

щоб відбувся процес загартовування. Цей процес рослини можуть проходити в природних умовах або за контрольованих умов (спеціальні камери з контрольованим кліматом).

Після загартовування рослини піддають дії стресового чинника – певної низької температури нижче нуля. Для цього рослини поміщають в спеціальні морозильні камери з контрольованими умовами. В морозильні камери можуть вносити інтактні рослини (в тих самих горщиках, в яких вони проводили загартовування); вузли кушіння, які поміщають в пластикові контейнери з вологим піском; або молоді паростки [161] (тоді, як правило, проводиться оцінка морозостійкості за ступенем ушкодження листків). Вузли кушіння є найбільш важливою частиною для виживання рослини [77], вони містять меристематичну частину, необхідну для відростання після морозного стресу. Для отримання вузлів кушіння відрізають верхню частину рослини на відстані 2-3 см від вузла і коріння на відстані 0,5-1 см і поміщають, як правило, у вологий пісок.

При тестуванні морозостійкості в морозильних камерах зниження температури має відбуватися поступово – 1-3°C на годину. Морозостійкість рослин тестують під дією серії температури, як правило, з інтервалом 2°C [70].

Для вираження морозостійкості рослин при застосуванні прямих методів оцінки часто використовують показник LT_{50} – це температура, за якої виживає 50% рослин [70]. Підрахунок рослин, що вижили та/або оцінка пошкоджень, завданих морозним стресом, проводить після періоду відновлення. Після тестового заморожування температура має підніматися поступово і після танення рослини залишають на 2-3 тижні за температури 15-22°C для відновлення. Іноді для скорочення періоду відновлення рослини витримують за більш високої температури – 3 дні за 24-26°C [155].

Після тестового замороження морозостійкість рослин може оцінюватися не лише за LT_{50} та відсотком рослин [180], що вижили за певної температури, а й через деякі інші характеристики. Наприклад, визначення електричної провідності (витікання електролітів через пошкоджені мембрани) [166],

флуоресценції хлорофілу *in vivo*, визначення життєздатності тканин з використанням певних хімічних сполук (тетразолій або кислий фуксин), що змінюють колір внаслідок реакції окиснення. Проте два останні методи мають недоліки, що полягають в необхідності коштовного спеціального обладнання для визначення флуоресценції хлорофілу та значних затрат праці і часу для визначення життєздатності тканин з використанням хімічних сполук [176]. Метод визначення електричної провідності для оцінки морозостійкості рослин має досить широке використання і буде детальніше розглянутий нижче.

1.3.3. Непрямі методи оцінки морозостійкості. Непрямі методи оцінки морозостійкості базуються на виявленні змін, що відбуваються в рослині під час процесу холодowego загартовування. Так рослини з більшою морозостійкістю під час загартовування накопичують більшу кількість певних сполук, мають вищий рівень активації певних генів, що мають забезпечувати їхнє краще пристосування для виживання під час наступного морозного стресу.

1.3.4. Метод визначення вмісту вільного проліна. Однієї з таких сполук, що під час загартовування в більшій кількості накопичуються в більш морозостійких рослинах, є амінокислота пролін. Було показано, що вільний пролін має захисну роль при дії стресових чинників, зокрема низьких температур, виступаючи переважно як осмопротектор [197]. Значна кількість вільного проліна накопичується в листках та пагонах рослин під час загартовування і накопичення проліна позитивно корелює з генотип-специфічною морозостійкістю [63]. Визначення вмісту вільного проліна після загартовування може надати інформацію про потенційну морозостійкість. Таким чином, вільний пролін може використовуватися як біохімічний маркер морозостійкості картоплі, ячменю, пшениці [63; 165].

Метод визначення вмісту вільного проліна був запропонований Bates та колегами ще в 1973 році [33]. Цей метод є зручним та швидким і використовується в дослідженнях і зараз [123]. В основі методу лежить реакція, що відбувається між нінгідрином та амінокислотами [197]. Нінгідрин є сильним окисником, що здійснює окисне дезамінування α -аміногрупи амінокислот,

вивільняючи амоній, CO_2 , відповідний альдегід та нінгідрин у відновленій формі. Вивільнений амоній реагує з додатковим молекулою нінгідрину та з відновленим нінгідрином з утворенням забарвленої комплексної сполуки. Адсорбція цього комплексу за відповідної довжини хвилі майже лінійно залежить від кількості аміногруп, присутніх в розчині. Завдяки цьому, описана реакція є зручним способом кількісного колориметричного визначення амінокислот [197].

Оскільки пролін є незвичайною амінокислотою, власне імінокислотою (частково заміщена аміногрупа), реакція нінгідрину з проліном відрізняється від реакції з рештою амінокислот, і утворений комплекс має інший максимум поглинання. Тобто описаний метод є достатньо специфічним для визначення проліну. Хоча деякі інші амінокислоти могли б теоретично порушувати точність визначення кількості проліну, насправді концентрація інших вільних амінокислот в рослинах за умов стресу є надзвичайно малою, порівняно з вільним проліном, тому цим можна нехтувати [197].

Іншим непрямим методом оцінки морозостійкості є визначення накопичення під час загартовування специфічних білків – продуктів регульованих холодом *COR*-генів (cold regulated). Накопичення таких білків визначають методикою western blot з використанням відповідних антитіл [126]. Для м'якої пшениці, наприклад, одним з білків, що в різній кількості накопичуються у контрастних за морозостійкістю формах, є білок WCS120 [209]. В ячменю ортологом гена пшениці *Wcs120* є ген *Dhn5* – один з головних регульованих холодом генів ячменю, ген дегідрину. Дегідрини – це білки, що належать до родини LEAII, і накопичуються в тканинах рослин у відповідь на стреси з компонентом зневоднення. Накопичення DHN5 білку в ячменю досліджували методом блотингу (protein gel blot) з використанням специфічних до дегідрину антитіл (anti-dehydrin antibody). Було показано позитивний зв'язок між накопиченням дегідрину в листі і пагонах ячменю під час загартовування та морозостійкістю рослин ячменю (морозостійкість визначали прямим тестом) [126].

Для оцінки морозостійкості можна також визначати відмінності в експресії *COR*-генів під час загартовування на рівні транскрипції, використовуючи методи зворотної кількісної полімеразної ланцюгової реакції [234] та мікроматриць.

Для ячменю показано зв'язок між морозостійкістю та певними алелями генів дегідринів. Одночасна присутність 6-нуклеотидної інсерції в екзоні 1 гена дегідрина *Dhn4* та 30-нуклеотидної делеції в екзоні 1 гена *Dhn7* пов'язана з вищою морозостійкістю ячменю (*Hordeum vulgare*) [96]. Для виявлення алелів відповідних генів дегідринів проводили ампліфікацію ДНК з праймерами до першого екзону генів *Dhn4* і *Dhn7*, розділення продуктів електрофоретично, і наступне секвенування [96].

Показано також зв'язок між морозостійкістю та певними алелями запасних білків [167; 106]. Досліджували подвійні гаплоїди пшениці, морозостійкість визначали як відсоток рослин, що вижили зимою в горщиках, поставлених на різній висоті над землею. Запасні білки гліадини розділяли електрофоретично в крохмалі. Було показано, що середнє виживання подвійних гаплоїдів з алелями гліадинів *GLI1B1* чи *GLI6D2* значно вище, ніж для подвійних гаплоїдів без цих алелів [167]. В іншому дослідженні показали зв'язок морозостійкості із запасними білками пшениці глютенінами. Відповідно до результатів дослідження, *Glu-A1* алель НМВ глютенінів (глютеніни розділяли SDS-електрофорезом в поліакриламідному гелі) позитивно корелює з морозостійкістю ліній озимої пшениці [154].

1.3.5. Оцінка морозостійкості рослин через визначення електричної провідності (витікання електролітів). Метод визначення електричної провідності був вперше запропонований Dexter і колегами в 1930 році та досі широко використовується для оцінки морозостійкості рослин [56]. Метод базується на тому, що ступінь пошкоджень клітин внаслідок дії стресового чинника корелює з кількістю електролітів, що витікають з пошкоджених клітин у деіонізовану воду внаслідок порушення цілісності мембрани. Електрична провідність може виражатися в різних величинах. Абсолютна провідність

вимірюється в мікросіменсах на сантиметр ($\mu S \cdot cm^{-1}$). Недоліком є те, що ця величина залежить від концентрації електролітів в тканині певного типу та розміру зразків [166]. Тому Prasil і колеги запропонували інші величини для вираження різниці в електричній провідності, які дозволили зробити метод визначення витікання електролітів більш точним [166; 68]. Відносна провідність (R_t) – виражає кількість електролітів, що витікають зі зразка, замороженого за певної температури t (L_t), як відсоток від кількості електролітів, що витікає за максимальної провідності з відповідного зразка після його “вбивання” (шляхом кип’ятіння/автоклавування/поміщення в рідкий азот) (L_{tm}): $R_t(\%) = 100(L_t / L_{tm})$. Відносна провідність дозволяє враховувати максимально можливе витікання електролітів для зразка певної тканини. Проте найкраще виражати різницю в електричній провідності через індекс пошкоджень (I_t): $I_t(\%) = 100(R_t - R_o) / (R_f - R_o)$, де R_o - відносна провідність незамороженого зразка (щоб врахувати витікання електролітів не спричинене стресом; ($R_o = 100L_o / L_{om}$)), R_f - відносна провідність вбитого заморожуванням зразка ($-30^\circ C$; ($R_f = 100L_f / L_{fm}$)) [166].

Індекс пошкодження (I_t) надає ряд переваг при його використанні для вираження різниці в електричній провідності:

- на величину індексу пошкодження не впливає розмір зразків, що використовуються для дослідження (розмір шматків листків чи стебел досліджуваних рослин);
- не впливає час перемішування зразків (що є частиною методики);
- не впливає час витікання електролітів (час, що витрачається на проведення дослідження).

Тобто вираження відмінностей між рослинними формами за витіканням електролітів через індекс пошкоджень дозволяє досягти більшої точності при використанні методу визначення електричної провідності, максимально виключити вплив сторонніх факторів (інших факторів, крім ступеню пошкодження мембрани, спричиненого низькотемпературним стресом, що також впливають на витікання електролітів) [166].

Метод визначення електричної провідності і зараз використовується в багатьох дослідженнях для оцінки морозостійкості рослин. Цей метод використовували зокрема для визначення морозостійкості подвійних гаплоїдів ячменю. Визначали електричну провідність листків після заморожування за різних тестових температур [126].

Рослини можуть піддаватися дії стресового чинника (низької температури), що викликає пошкодження мембрани і витікання електролітів, різним чином – тестуванням в полі або прямими тестами на морозостійкість (заморожування в спеціальних морозильних камерах). Часто визначення електричної провідності (витікання електролітів) поєднується з іншими способами оцінки морозостійкості – підрахунком відсотку рослин, що вижили, визначенням LT_{50} . Так для оцінки морозостійкості різних генотипів Triticale визначали електричну провідність, а також підраховували відсоток рослин, що вижили за певної низької температури (витримування в морозильних камерах) [155]. В дослідженні дигаплоїдних ліній пшениці в Австралії тестування морозостійкості проводили в полі, після кожного випадку морозу (температури нижче нуля), брали листки рослин для визначення електричної провідності, а також для визначення вмісту гліцинбетаїну. Дослідження морозостійкості рослин *Lolium perenne* проводили в два етап: на першому етапі оцінювали відростання рослин після дії стресової температури, а на другому етапі визначали електричну провідність на різних стадіях загартовування [232; 234].

Незважаючи на те, що в науковій літературі є багато відомостей про різні механізми морозостійкості рослин, важливо встановити які саме механізми забезпечують високу зимостійкість досліджуваного геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка, який містить Т геном виду *Amblyopyrum muticum* (*Aegilops mutica*). В нашому випадку, як ми вважаємо, визначу роль у забезпеченні зимостійкості Авротіки можуть мати гени, що мають чужинне походження – гени Т геному. Крім того, важливо розрізняти морозостійкість як здатність рослин виживати після експериментального заморожування та

зимостійкість як більш комплексну ознаку, що включає пристосування до виживання рослин в польових умовах протягом зими, остання ознака має більше значення для сільського господарства.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Рослинний матеріал

2.1.1. Геномно-заміщений амфідиплоїд Авротіка, сорт Аврора, *Aegilops mutica*. Сорт м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) Аврора - це гексаплоїдна ($2n = 42$, AABBDD) озима пшениця. Цей сорт був раніше використаний для виділення тетраплоїдного компонента (AABB) [6] та для створення геномно-заміщених амфідиплоїдів, які поєднують у своїх геномах тетраплоїдний компонент Аврори (AABB) та геном одного з диплоїдних видів, дикорослих родичів пшениці (з родів *Aegilops*, *Secale*, *Triticum*) [7]. Ця робота була зроблена в Краснодарі в лабораторії Є.Г. Жирова [7].

Геномно-заміщений амфідиплоїд Авротіка (AABBTТ) об'єднує в своєму геномі тетраплоїдний компонент сорту Аврора (AABB) і Т геном диплоїдного виду *Aegilops mutica* (*Amblyopyrum muticum*). Схема створення геномно-заміщеної форми Авротіка представлена на рисунку 2.1.

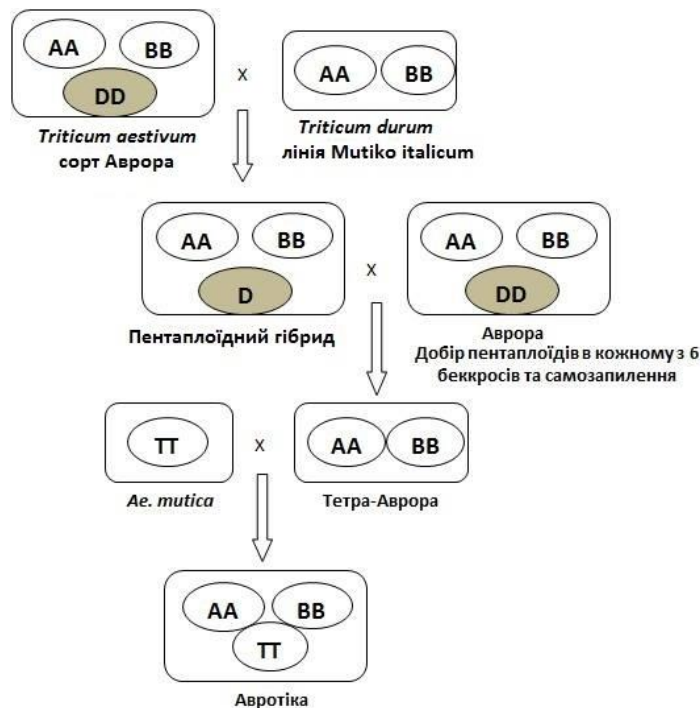


Рис. 2.1. Схема створення геномно-заміщеної форми Авротіка [за 7].

Для її створення тетраплоїдний компонент Аврори (AABB) був схрещений з диплоїдним видом *Aegilops mutica* (*Amblyopyrum muticum*) (геном TT). Отримані триплоїдні гібриди (ABT) були оброблені колхіцином для подвоєння кількості хромосом, і була отримана гексаплоїдна геномно-заміщена форма (AABVTT) [7].

Aegilops mutica (*Amblyopyrum muticum*) – диплоїдний вид, дикорослий родич пшениці, в природних умовах зростає в центральній Туреччині та Вірменії. В роботі використовувалися такий зразки: *Amblyopyrum muticum* CN 108090, Plant Gene Resources of Canada, Agriculture and Agri-Food Canada.

2.1.2. Створення чужинно-заміщених ліній пшениці. Метод створення чужинно-заміщених ліній також називається методом хромосомного (геномного) змішування, оскільки хромосоми двох чужинних геномів змішуються в гексаплоїдному гібриді між двома формами пшениці, що розрізняються лише одним субгеномом. Цей метод був вперше запропонований і застосований Жировим [7], і дозволяє створювати інтрогресивні лінії пшениці з множинними заміщеннями як цілих хромосом, так і сегментів хромосом від видів роду *Aegilops*. Ці лінії можуть бути легко схрещені з м'якою пшеницею з отриманням фертильних нащадків, і, отже, є цінним джерелом чужинних генів стійкості до біотичних та абіотичних стресів, що можуть бути перенесені до сортів пшениці.

Для створення інтрогресивних ліній пшениці, що несуть різний обсяг генетичного матеріалу від виду *Aegilops mutica* (геном TT), спочатку сорт Аврора (AABBDD) був схрещений з геномно-заміщеним амфідиплоїдом Авротіка (AABVTT) і були отримані гібриди покоління F₁. Хромосоми T і D геномів не утворюють біваленти і мігрують випадковим чином до полюсів чи втрачаються, і гібриди F₁ мають геномну формулу AABVDT. Здійснювався контроль кількості хромосом гібридних рослин. Теоретично кількість хромосом в зиготах може варіювати від 28 до 56. Для створення інтрогресивних ліній добиралися такі рослини, які можуть дати 42-хромосомні ліній. Далі гібридні рослини розмножувалися самозапиленням, і кількість хромосом

контролювалася для наступних поколінь. Добиралися рослини, що мали принаймні 40 хромосом, оскільки рослини, що мають меншу кількість хромосом, не підходять для створення інтрогресивних ліній.

2.2. Реактиви, розчини, обладнання

Поліакриламідний гель для електрофорезу: акриламід 30% на ТБЕ 1X – 8 мл, бісакриламід 2% - 6 мл, сечовина – 16,8 г, вода дистильована – до 40 мл. ПСА, ТЕМЕД – додати перед використанням.

Буфер нанесення для електрофорезу: формамід – 950 мкл, ЕДТА (0,5М, рН 8.0) – 50 мкл, кілька кристалів бромфенолового синього та ксилен-ціанолу.

ТБЕ 5^x електродний буфер: Tris-HCl – 54 г, борна кислота – 27,5 г, ЕДТА (рН 8.0) – 20 мл, вода дистильована – до 1 л.

Фіксатор для проявлення продуктів, розділених електрофоретично: етиловий спирт 96% -100 мл, оцтова кислота – 5 мл, вода дистильована – до 1л.

Розчин нітрату срібла для проявлення продуктів, розділених електрофоретично: AgNO₃ – 1,5 г, вода дистильована – до 1л, формалін – 2,4 мл (додавали безпосередньо перед використанням).

Розчин для проявлення: NaOH 45% - 33 мл, вода дистильована – до 1л, формалін – 2 мл (додавали безпосередньо перед використанням).

СТАВ-буфер для виділення ДНК: 5М NaCl – 28 мл (1, 4 М NaCl), 0,5 М ЕДТА (рН 8.0) – 4 мл (20 мМ EDTA), 1М Tris (рН 8.0) – (100 мМ Tris), СТАВ – 2 г (2% СТАВ).

Суміш хлороформ-ізоаміловий спирт (для виділення ДНК) – об'ємне співвідношення 24:1.

ТЕ-буфер (для розчинення ДНК): 1М Tris (рН 8.0) – 10 мл (100 мМ Tris); 0,5 М ЕДТА (рН 8.0) – 2 мл (20 мМ EDTA).

Реактив Шифа (на 100мл): 97,5мл дист. Н₂О, 2,5мл HCl, 0,5 г фуксину основного для фуксинсіркової кислоти, 1,2 г метабісульфіту К чи Na. Не перемішуючи, додавали компоненти реактиву у вказаному порядку, залишали у

темному місці за кімнатної температури поки розчин не знебарвиться, принаймні, до світло-жовтого кольору.

100X розчин Денхардта (Denhardt's solution): 2% БСА, 2% фікол, 2% полівінілпіролідон.

20X SSC буфер (pH 7.0): 175,4 г NaCl (3M), 107 г цитрат натрія-5,5-водн. (0,3 M), pH довести HCl до 7.0.

Blocking/Washing буфер (для дот-блот гібридизації): розчиняли 1 об'єм концентрованого 10X Blocking/Washing буферу в 9 об'ємах води. Розведений буфер зберігали за 4°C 1 тиждень.

Блокуючий розчин (Blocking solution): 1% розчин Блокуючого реагента (Blocking Reagent) розчиняли в 1X Blocking/Washing буфер; нагрівали до 50-60°C, перемішували поки не розчиниться. Зберігали в аліквотах за -20°C.

Розведений Стрептавідин-АП кон'югат (Diluted Streptavidin-AP Conjugate): розводили концентрований Стрептавідин-АП кон'югат у 5000 разів у Блокуючому розчині. Готували безпосередньо перед використанням.

Буфер для детекції (Detection Buffer): розводили 1 об'єм концентрованого буферу для детекції у 9 об'ємах води. Зберігали за 4°C протягом тижня.

Субстратний розчин (Substrate Solution): розчиняли 1 об'єм 50X BCIP/NBT у 49 об'ємах буферу для детекції. Готували безпосередньо перед використанням.

Обладнання, яке було використано для роботи: спектрофотометр «СФ-2000» (Спектр, Санкт-Петербург, Росія), водяна баня БЛ-100 (НХП, Київ), центрифуга Centrifuge 5418 (Eppendorf, Німеччина), ампліфікатор Master cycler personal (Eppendorf, Німеччина), міні камера для горизонтального електрофорезу «Horizon 11-14» (Lifetechnologies, США), ультрафіолетова лампа "UV/White Light Transilluminator TMW-20" (UVP, США), міні центрифуга MiniSpinPlus (Eppendorf, Німеччина), джерело живлення для електрофорезу (Bio-Rad, США), електрична плита ЕПЧ 1-1,5/220 (ТЕРМІЯ, Україна), льодогенератор FM-120 DE-50 «ICEMARKER» (HOSHIZAKI, Америка), цифрова камера (Nicon, Thailand), ваги лабораторні AD-60 (AXIS, Польща).

2.3. Методика виділення ДНК

Подрібнювали зразки (паростки або листки пшениці) у ступці, заморозивши у рідкому азоті. Переносили порошок у підписану пробірку. Додавали СТАВ-буфер з розрахунку 0,8 мл на 1 г тканини. Додавали РНК-азу (попередньо витриману протягом 10 хв за 100°C) – 8 мкл на 1 мл буферу, концентрація 10 мг/мл. Зразки інкубували на водяній бані (65°C) протягом години. До зразків додавали рівний об'єм суміші хлороформ-ізоаміловий спирт. Перемішували повільно протягом 10 хвилин (депротенізація). Центрифугували 10 хвилин за 10 тис. об/хв. Відбирали верхню фазу (водну) фазу (яка містила ДНК) в чисті пробірки. Додавали хлороформ і повторювали депротенізацію. З водного розчину осаджували ДНК ізопропанолом (додавали 0,8 об'єму від водної фази). Перемішували, охолоджували 30 хв за -20°C. Центрифугували 10 хвилин за 13-14 тис. об/хв. Супернатант зливали. ДНК промивали 70% етиловим спиртом. Центрифугували 10 хвилин, 13-14 тис. об/хв. Супернатант зливали. ДНК сушили на повітрі. Розчиняли в 100 мкл ТЕ-буферу.

Для визначення концентрації ДНК отримані зразки розводили дистильованою водою у 150 разів і за допомогою спектрофотометра «СФ-2000» вимірювали екстинкцію. Вимірювання проводили в ультрафіолетовому світлі при значеннях довжин хвилі 260 нм для нуклеїнових кислот Щоб знайти концентрацію ДНК була застосована формула:

$$C = OD_{260} \times 50 \times 150 \text{ [мкг/мл]}, \text{ де}$$

OD_{260} – поглинання нуклеїновими кислотами УФ на довжині хвилі 260 нм; 50 – коефіцієнт для переведення оптичної густини в концентрацію ДНК; 150 – розведення ДНК.

2.4. Методика полімеразно-ланцюгової реакції та електрофорезу для розділення продуктів ампліфікації

2.4.1. Полімеразно-ланцюгова реакція. Концентрації і кількість реактивів, що додавали до ПЛР-суміші (на 50 мкл суміші): H_2O дистильована – 10 мкл; буфер з $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10^x – 5 мкл (концентрація в ПЛР-суміші 1^x); MgCl_2 , 25 мМ – 3 мкл (концентрація в ПЛР-суміші – 1,5 мМ); суміш дезоксинуктеотидтрифосфатів (dNTP) – 5 мкл 2 мМ суміші (концентрація в ПЛР-суміші – 0,2 мМ); праймер 1 (1,25пМ/мкл) – 10 мкл (концентрація в ПЛР-суміші – 12,5 25пМ/мкл); праймер 2 (1,25пМ/мкл) – 10 мкл (концентрація в ПЛР-суміші – 12,5 25 пМ/мкл); Taq-полімераза (1u/мкл) – 2 мкл (концентрація в ПЛР-суміші – 2u); ДНК (10 нг/мкл) – 5 мкл (концентрація в ПЛР-суміші – 5нг/мкл).

Умови ПЛР: початкова денатурація – 94°C , протягом п'яти хвилин; денатурація – 94°C протягом 1 хвилини, гібридизація праймерів на матриці – 60°C (55°C) протягом 1 хвилини; елонгація – синтез ДНК на матриці – 74°C протягом 2 хвилин; кінцева елонгація – 74°C протягом 7 хвилин; охолодження зразків – 4°C протягом 5 хвилин. Кількість циклів – 30

2.4.2. Вертикальний денатуруючий електрофорез нуклеїнових кислот у поліакриламідному гелі. Промивали та протирали 96% спиртом для знежирення два скла. Протирали нерогате скло сіланом для прошивки. Спейсери змащували солідолом та поміщали по краях на нерогате скло. Збирали скло, поміщали його в кювету, закріплювали зажимами. Готували 40 мкл 6% поліакриламідного гелю, відливали 10 мкл, додавали ПСА та ТЕМЕД, заливали пробку. Чекали поки заполімеризується пробка, додавали ПСА та ТЕМЕД, заливали гель. Вставляли гребінку.

Приготування зразків. Змішували рівну кількість ампліфікату та буферу нанесення (12 мкл + 12 мкл). Перемішували, центрифугували (short). Прогрівали зразки протягом 3 хвилин за температури 95°C , швидко переносили зразки на лід. Через 10 хвилин наносили зразки в слоти в гелі по 22 мкл.

Параметри електрофорезу: від «-» до «+», 200 В, 40 мА – 15 хв; 400 В, 70мА – 2,5 – 3 години.

Фарбування. Скло з пришитим гелем промивали дистильованою водою, занурювали у фіксатор на 8 хв. Потім перекладали скло в розчин нітрату срібла (попередньо додаючи до нього формамід) на 11 хвилин. Промивали скло з гелем дистильованою водою, занурювали у розчин для проявлення (попередньо додаючи до нього формамід) до появи видимих смуг (коричневі смуги на зеленувато-жовтому фоні). Виймали з розчину для проявлення і занурювали у фіксатор на 2 хв., промивали водою, сушили.

2.4.3. Горизонтальний електрофорез у агарозному гелі. Готували 2% агарозний гель (2 г агарози на 100 мл 1X SB буферу). Доводили до кипіння, а потім охолоджували до 50°C. Додавали 5 мкл бромистого етидію. Заливали суміш у камеру для електрофорезу. Вставляли гребінку. Після того, як гель застиг, виймали гребінку. На парафільм наносили зразки: по 5 мкл буферу нанесення та 5 мкл зразка ДНК у краплини і перемішували. Вносили зразки у слоти. Заливали у камеру 1-кратний SB буфер. Підключали прилад до джерела струму.

2.4.4. Послідовності праймерів до ділянок генів транскрипційних факторів. Полімеразна-ланцюгова реакція проводилася з праймерами до генів пшениці *Ta-AGL21*, *Ta-AGL14* та *Ta-CBF-A14*. Послідовності праймерів (до початку гена – 1, та до другої частини гена -2) були розроблені з використанням програми Primer3 [207; 120]:

TaAGL21-1-L CGGATAGAGAACCCGACGAG

TaAGL21-1-R GTCTTCATTGCCCTGATGCC

TaAGL21-2-L AATGAAGACTCGGCGGTTTG

TaAGL21-2-R TTTTCTCGAGCGTTGTCAGC

CBF-A14-1-L GATGGACGCCGCTGATGC

CBF-A14-1-R GGTGCTGCCTTTGGAACG

CBF-A14-2-L AAGGAGATCAAGGATGCCGT

CBF-A14-2-R CGAACAAGTAGCTCCATGGC

TaAGL14-1-L GATGGACGCCGCTGATGC

TaAGL14-1-R GGTGCTGCCTTTGGAACG

TaAGL14-2-L AAGGAGATCAAGGATGCCGT

TaAGL14-2-R CGAACAAGTAGCTCCATGGC

2.5. Встановлення кількості хромосом у корінцях пшениці

2.5.1. Фіксація матеріалу. Кількість хромосом визначали у клітинах первинних корінців паростків, які пророщували у чашках Петрі на фільтрувальному папері, періодично додаючи воду (з метою запобігти пересиханню). Ті зразки, які проросли до такої стадії, що довжина первинних корінців становила 10-15 мм, переносили до холодильника на ніч. Зранку наступного дня, за 5 годин до проведення передобробки, зерна залишали при кімнатній температурі без доступу світла.

Корінці видаляли пінцетом і переносили до скляної трубочки, у якій відбувалася передобробка матеріалу. Трубочки з корінцями поміщали у холодну воду. Кожна трубочка мала індивідуальну етикетку.

Трубочки з корінцями з води переносили в ексикатор з водною емульсією бром-нафталіну (1 мл бромнафталіну на 400 мл дистильованої води). Залишали у холодильнику за температури 3-4 °C на 16-18 годин.

Трубочки з корінцями переносили в інший ексикатор з крижаною оцтовою кислотою на 4 години, потім – у суміш спирту і оцтової кислоти 3:1 на 4 години, далі – у 80% розчин етилового спирту, в якому матеріал можна було зберігати за температури 3-4 °C протягом кількох діб.

2.5.2. Мацерація та фарбування матеріалу. Розчин 1N соляної кислоти (33,2 мл HCl на 400 мл води) нагрівали на водяній бані до температури 60°C.

Трубочки з корінцями поміщали у розчин кислоти і витримували 12 хвилин, підтримуючи протягом цього часу температуру розчину на рівні 58-60 градусів.

Через 12 хвилин трубочки промивали дистильованою водою і переносили в ємність з реактивом Шифа для фарбування. Витримували у ньому протягом 1,5 години. Після фарбування матеріал переносили у холодну дистильовану воду.

Пофарбовані корінці діставали з трубочок і поміщали в пробірки типу Еппендорф з дистильованою водою, з відповідною етикеткою. Фарбовані зразки зберігали за температури 4 С⁰.

2.5.3. Виготовлення препаратів для мікроскопічного дослідження.

Фарбований корінець поміщали на чисте предметне скло, препарувальною голкою відрізали верхівку корінця, що інтенсивно забарвилася. Видаляли з предметного скла частину кореня без верхівки. До верхівки корінця додавали краплину 45% оцтової кислоти і накривали покривним скельцем. Ударами руків'я препарувальної голки по покривному склу розбивали верхівку корінця, до стану, коли забарвлена барвником тканина корінця ставала ледь помітна під покривним скельцем. Накривали препарат фільтром і чавили пальцем з поступовим збільшенням тиску. Аналізували препарат під мікроскопом, використовуючи 10X об'єктив для пошуку метафаз і 40X об'єктив для підрахунку кількості хромосом [216].

2.6. Визначення вмісту вільного проліна

Кислий нінгідрин (acid ninhydrin): нагрівали 1,25 г нінгідрина в 30 мл крижаної оцтової кислоти та 20 мл 6М фосфорної кислоти (H₃PO₄ – ортофосфатна, фосфатна кислота), до розчинення. Зберігали реагент за 4°C, залишається стабільним 24 години.

0,5 г рослинної тканини (листя) гомогенізували в 10 мл 3% водного розчину сульфосаліцилової кислоти (C₇H₆O₆S₃). Гомогенат фільтрували через паперовий фільтр Whatman (№2). До 2 мл фільтрату додавали 2 мл кислого

нінгідрину та 2 мл крижаної оцтової кислоти, перемішували. Витримували пробірки протягом 1 години за 100 °С. Переносили пробірки на лід, давали охолонути. Додавали 4 мл толуолу, активно перемішували 15-20 сек. Толуол відбирали від водної фази, нагрівали до кімнатної температури. Вимірювали поглинання за довжини хвилі 520 нм, використовували толуол як контроль. Порівнювали вміст проліна в досліджуваних зразках [33].

2.7. Дот-блот гібридизація

2.7.1. Фрагментація ДНК, що використовувалася в якості зонда. В якості зонда використовувалася геномна ДНК *Aegilops mutica*, яка попередньо була фрагментована автоклавуванням: 121°C, 1,8 атм., 10 хвилин. Для того, щоб перевірити розмір отриманих фрагментів ДНК, автоклавовану ДНК розділяли в агарозному гелі: 0,8% агароза (0,8 г агароза на 100 мл 1X ТБЕ буферу), 5 мкл етідій броміду для візуалізації додавали в агарозний гель. Умови електрофорезу: розділення від анода до катода, 25 мА, 30 В. Отримані фрагменти ДНК для зонда мали бути розміром не більше 500 пар нуклеотидів. Для порівняння використовували маркер мас (SibEnzyme, Росія).

2.7.2. Мічення ДНК біотином. Для мічення геномної ДНК *Aegilops mutica* (попередньо фрагментованої) використовували Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit #K0651 (Fermentas, Литва). Геномну ДНК мітили biotin-11-dUTP.

В мікроцентрифужну пробірку на 1,5 мл додавали такі компоненти:

ДНК матрицю (100 нг)	10 мкл
----------------------	--------

Декануклеотид у 5X Реакційному буфері	10 мкл
---------------------------------------	--------

Вода, вільна від нуклеаз	до 44 мкл
--------------------------	-----------

Перемішували і центрифугували суміш коротко (3-5 сек).

Інкубували пробірку за 100°C (вода, що кипить) протягом 5-10 хвилин. Переносили на лід, охолоджували. Центрифугували коротко.

Додавали в пробірку наступні компоненти суміші:

Суміш для мічення з біотином	5 мкл
------------------------------	-------

Кленов фрагмент, exo^- (5u) 1 мкл

Перемішували і коротко центрифугували (3-5 сек).

Інкубували пробірку протягом 1 години за 37°C.

Зупиняли реакцію додаванням 1 мкл 0,5М ЕДТА, рН 8.0.

Мічену ДНК зберігали до використання за -20°C.

2.7.3. Переосадження міченої ДНК. Для видалення невиключеної мітки ДНК після мічення переосаджували етанолом і ацетатом натрію.

В пробірку з міченою ДНК додавали 0,1 об'єму ацетату натрію (5 мкл). Додавали 100-150 мкл попередньо охолодженого (за -20°C) 96% етанолу, перемішували. Витримували за -20°C протягом 10-12 годин. Для осаження ДНК центрифугували 30 хв, 12000 g, перед центрифугуванням ротор охолоджували за -20°C. Зливали супернатант, додавали 500 мкл 70% етанолу (попередньо охолодженого за -20°C). Центрифугували 5 хв, 12000 g, перед центрифугуванням ротор охолоджували за -20°C. Зливали супернатант і залишали осад підсохнути на повітрі. Розчиняли в 20 мкл деіонізованої води.

2.7.4. Нанесення ДНК на мембрану для блоту. Вирізали шматок мембрани Hybond-N відповідного розміру (3 x 4,5 см). Розграфили мембрану олівцем на квадрати з шириною сторони 5 мм. Занурювали мембрану в 6X SSC буфер на 10 хвилин. До кожного зразка ДНК, який потім наносили на мембрану, додавали 0,5 об'єму 20X SSC буферу до кінцевої концентрації 6X SSC в мінімальному об'ємі (3мкл 20X SSC + 7 мкл ДНК). Нагрівали зразки на водяній бані, що кипить (100°C) протягом 10 хвилин, переносили зразки на лід. Центрифугували зразки 5 сек (short). Зволожену мембрану поміщали в пластиковий контейнер відповідного розміру (на шматок фільтрувального паперу, змоченого в 6X SSC). Наносили зразки на мембрану по 2 мкл, не торкаючись піпеткою мембрани. Чекали поки кожна краплина висохне на мембрані (підсушували феном). Кількість ДНК на краплинку – 0,8 мкг. Переносили мембрану на шматок Whatman 3MM, змочений у розчині для денатурації, залишали на 10 хвилин. Переносили мембрану на шматок Whatman 3MM, змочений у розчині для нейтралізації, залишали на 5 хвилин. Переносили

мембрану на сухий Whatman 3MM і сушили на повітрі, приблизно 1 годину. Загортали суху мембрану в прозору обгортку і поміщали на УФ-трансільюмінатор на 1 хвилину. Зберігали мембрану між сухими листками Whatman 3MM за кімнатної температури (можна протягом кількох місяців).

2.7.5. Пре-гібридизація та гібридизація. Готували пре-гібридизаційних розчин: 6X SSC, 5X розчин Денхардта, 0,5 % SDS, 50% деіонізований формаїд. Денатурували 0,5 мг/мл водний розчин озвученої (sonicated) ДНК сперми лосося за 100°C протягом 5 хвилин, охолоджували на льоду. Додавали денатуровану ДНК сперми лосося в пре-гібридизаційний розчин до кінцевої концентрації 50 мкг/мл. Поміщали мембрану в пластиковий контейнер відповідного розміру, додавали пре-гібридизаційний розчин з денатурованою ДНК сперми лосося і залишали на пре-гібридизацію за 42°C на 2-4 години з помірним перемішуванням. Готували гібридизаційний розчин: денатурували мічений біотином зонд – 5 хвилин за 100°C, охолоджували на льоду, додавали денатурований зонд в пре-гібридизаційний розчин до кінцевої концентрації 50 нг/мл. Зливали пре-гібридизаційний розчин і додавали гібридизаційний розчин до мембрани (60 мкл розчину на см² мембрани). Інкубували протягом ночі (12-15 годин) за 42°C з перемішуванням. Відмивали мембрану двічі 2X SSC, 0,1% SDS. Повторювали кожне відмивання двічі протягом 10 хвилин за кімнатної температури. Відмивали мембрану двічі у 0,1 X SSC, 0,1 X SDS. Кожне відмивання проводити протягом 20 хвилин за 65°C. Поміщали мембрану ненадовго на фільтрувальний папір для видалення надлишку води. Проводили детекцію відповідно до протоколу.

2.7.6. Детекція гібридизації. Для детекції використовували Biotin Chromogenic Detection Kit (Fermentas, Литва). Під час процедури детекції мембрана повинна вільно плавати в контейнері і бути рівномірно вкритою розчином.

Кількість необхідних розчинів з розрахунку на 50 см² мембрани:

Буфер для блокування/відмивання	100 мл
Блокуючий розчин	25 мл

Стрептавідин-АР кон'югат	10 мл
Буфер для детекції	15 мл
Субстратний розчин	6 мл

Відмивали мембрану в 30 мл Blocking/Washing буферу протягом 5 хвилин за кімнатної температури на платформі з помірним помішуванням. Витримували мембрану в блокуючому розчині (Blocking solution) 30 хвилин за кімнатної температури з помірним перемішуванням. Готували розчин стрептавідин-АП-кон'югату (Streptavidin-AP conjugate). Інкубували мембрану у розчині стрептавідин-АП-кон'югату протягом 30 хвилин за кімнатної температури з помірним перемішуванням. Відмивали мембрану за кімнатної температури з помірним помішуванням у Blocking/Washing буфер по 15 хвилин двічі (змінюючи буфер). Інкубували мембрану 10 хвилин у буфері для детекції (Detection buffer) за кімнатної температури з помірним перемішуванням. Проводили ензиматичну реакцію: інкубували мембрану в свіжоприготованому субстратному розчині (Substrate solution) за кімнатної температури в темряві. Фіолетовий преципітат ставав видимим через 15-30 хвилин, можна залишати для проявлення на довший час.

Зупиняли реакцію: зливали розчин і промивали мембрану дистильованою водою кілька секунд. Зливали воду і висушували мембрану, фіксували результати. Зберігали мембрану між аркушами фільтрувального паперу.

2.8. Визначення морозостійкості рослин

2.8.1. Вирощування рослин для визначення морозостійкості.

Поміщали насіння рослин на два шари вологого фільтрувального паперу у чашки Петрі і залишали чашки за 4°C на 5-7 днів (поки насіння наклюнеться).

Діставали чашки Петрі з насінням з холодильника і залишати проростати в темряві за кімнатної температури (2 дні), виставляли чашки Петрі з рослинами на світло на 2 дні, поки паростки не підростуть, набудуть зеленого забарвлення.

Висаджували рослини в землю (малі контейнери з землею). Вирощували в світловій кімнаті, 15 годинний світловий день, 20°C, поки рослини не утворювали 3 повністю розвинені листки (приблизно 10 днів).

2.8.2. Загартовування рослин. Рослини для процесу холодого загартовування переносили в холодильник з температурою 2-3°C, 15-годинний світловий день на три тижні. Інший варіант загартовування – на вулиці (коли погодні умови приблизно відповідали необхідним для процесу загартовування рослин пшениці).

2.8.3. Заморожування рослин. Експерименти з заморожування рослин проводили у спеціальному термостаті з контрольованою низькою температурою. Для цього вузли кушіння загартованих рослин виймали з землі, листки і корені обрізали на відстані 5 сантиметрів від вузла кушіння. По 5 вузлів кушіння поміщали в пластикові пробірки, засипали вологим піском і поміщали в термостат з температурою -3°C на 13 годин. Потім температуру поступово знижували: 1°C на годину, до -13°C. Після досягнення бажаної температури, термостат виключали і рослини залишали танути на ніч. На наступний день зранку рослини висаджували в землю (малі контейнери з землею) для відростання. Відростання проходило за 20 °C, 15-годинний світловий день. Через три тижні оцінювали виживання рослин за рівнем відростання.

2.8.4. Визначення електричної провідності. Листки загартованих рослин розрізали на сегменти довжиною 2 см і поміщали в пробірки з 15 мл деіонізованої води. Пробірки поміщали в програмований термостат і охолоджували, поступово знижуючи температуру (1°C на годину), до -13°C. Залишали танути на ніч. Пробірки з листками в деіонізованій воді ставили на 1 годину перемішувати за кімнатної температури. Після цього вимірювали електричну провідність води, в яку вийшли електроліти з проморожених листків, використовуючи кондуктометр. Дані про електричну провідність отримували у мікросіменсах (μS). Потім зразки (пробірки з листками в деіонізованій воді) витримували 15 хвилин на водяній бані, що кипить (100°C),

давали їм охолонути і визначали абсолютну провідність (умовно – всі електроліти, що можуть витікти з певної рослинної тканини). Визначали відносну провідність за формулою.

2.10. Вимірювання характеристик кореневої системи

Вимірювання характеристик кореневої системи проводилося для рослин, вирощених у ламінованих поліетиленом картонних пакетах об'ємом 1 літр типу TetraPack у світловій кімнаті, та для рослин, вирощених в полі.

Для вимірювання коренів, рослини, що росли в пакетах, зерно пророщували у чашках Петрі на вологому фільтрувальному папері, потім паростки висаджували в пакети об'ємом 1 л по 3 рослини в один пакет. Рослини висадили в пакети з землею 3.09.2015 р., та перенесли на вулицю до 2.12.2015 р. для перебування під впливом низьких температур протягом 60 днів. Для проведення вимірювань рослини обережно виймали з пакета, обтрушували землю і відмивали коріння від землі, після чого промивали коріння рослин дистильованою водою. Підраховували загальну кількість коренів та вимірювали максимальну довжину кореня (в см). Вимірювання об'єму кореневої системи здійснювали за модифікованим методом Д. А. Сабініного і І. І. Колосового [4]. Об'єм кореневої системи визначали за об'ємом рідини (40% розчин етилового спирту), який витісняли корені з мірної пробірки.

Прилад для вимірювання об'єму кореневої системи зображений на рисунку 2.2.



Рис. 2.2. Прилад для визначенні об'єму кореневої системи за об'ємом витісненої рідини.

Перед початком роботи бюретку (розташовану зверху, див. рис.2.2) та систему сполучених посудин «пластикову пробірку – мірна піпетка» заповнювали робочим розчином (40% розчин етилового спирту) до нульової позначки, контролювали, щоб не було бульбашок. Коріння досліджуваної рослини діставали з дистильованої води і поміщали на короткий час на фільтрувальний папір для відбирання води. Після цього коріння занурювали в пластикову пробірку, заповнену робочим розчином спирту, до кореневої шийки. В результаті рідина з цієї пластикової пробірки витіснялася і переходила до сполученої з нею горизонтально прикріпленої мірної піпетки і досягає певної позначки – цей показник фіксували. Коріння виймали з пробірки, об'єм рідини в системі пластикова пробірка-мірна піпетка доводили робочим розчином до нульової позначки. Потім з верхньої бюретки у мірну пробірку доливали робочий розчин етилового спирту до позначки, до якої рідина витіснялася при зануренні кореневої системи досліджуваної рослини до пластикової пробірки. Долийтий об'єм рідини з верхньої мірної бюретки (визначається зміна рівня рідини в бюретці за мірними позначками, у мл) дорівнював об'єму кореневої системи досліджуваної рослини.

Рослини, вирощені у полі, викопали 3 травня 2015 року і далі працювали з ними так само, як з рослинами, вирощеними у пакетах. Зимостійкість рослин визначали як кількість рослин в рядку, які збереглися до початку вегетаційного періоду з тих 20, які були у кожному з рядків у листопаді.

2.11. Оцінка рослин за ознаками морфології

Рослини оцінювали при досягненні відповідної стадії розвитку для прояву певної ознаки – на стадії зеленої рослини або на стадії зрілості колоса. Градаціям ознак, за якими оцінювали рослини, було привласнено порядкові номери:

- опушення зеленої рослини: без опушення (1), опушені вушка (2), опушені вушка та край основи листка (3), опушені вушка, край основи листка та край листової піхви (4), опушені вушка, край основи листка та листовая пластинка (5), опушені вушка та край основи листка, край листової піхви та листовая пластинка (6);

- остистість: колос безостий (1), остистий (2), напівостистий (3), остеподібні відростки (4), розвинена ость на апікальному колоску безостого колоса (5);

- форма та щільність колосу: веретеновидний (1), спельтоїдний (2);

- воскова осуга: вся рослина вкрита восковою осугою (1), вся рослина позбавлена воскової осуги (2), вегетативна частина з восковою осугою, колос без воскової осуги (3);

- колір зрілого колосу: червоний (1), світло-коричневий (2), темно-коричневий (3), чорний (4);

- опушення: відсутнє (1), густе рівномірне (2), густе нерівномірне, коли на найбільш опуклій частини опушення більш слабке геть до відсутності трихом (3), зріджене рівномірне (4), зріджене нерівномірне (5), щетинисте рівномірне (6), щетинисте нерівномірне (7), трихоми лише на кілю та центральній жилці луски;

- форма плеча: пряме (1), вузьке (2), скошене (3), виїмчасте (4), відсутнє (5);
- форма луски: овальна (1), видовжена (2);
- вдавленість у основі луски: наявна (1), відсутня (2), стан проміжний, важкий для визначення (3);
- ламкість колосового стрижня: неламкий (1), ламкий (2);
- жорсткість луски: м'яка (1), жорстка (2), дуже жорстка (3);
- рівномірність забарвлення луски: нерівномірне, коли на найбільш опуклій частині луски пігментація послаблюється (1), пігмент на лусці розподілений рівномірно (2);
- колір стебла під колосом: солом'яно-жовтий (1), фіолетовий (2);
- колір зернівки: червоний (1), темно-червоний (2), зеленуватий (3), зелений (4);
- стійкість до борошнистої роси: рослина сприйнятлива (1), рослина стійка (2).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Створення інтрогресивних ліній *Triticum aestivum*/*Aegilops mutica*

3.1.1. Отримання розмаїття нащадків від схрещування Авротіки та Аврори. *Aegilops mutica* Boiss (*Amblyopyrum muticum* Eig) – однорічний диплоїдний (геном Т) дикорослий родич пшениці, який є стійким до грибних захворювань пшениці, зокрема до листової іржі та борошнистої роси, а також до абіотичних стресів. Авротіку, геномно-заміщений амфідиплоїд з геномною структурою AABBTT, було створено майже 30 років тому [7]. За багаторічними спостереженнями, Авротіка характеризується високим рівнем зимостійкості. Щоб з'ясувати, чи можна цю надзвичайно цінну для селекції ознаку перенести до фенотипу м'якої пшениці та створити таким чином донор її генетичного забезпечення, було варто створити інтрогресивні лінії *Triticum aestivum* / *Aegilops mutica*, що містять генетичний матеріал від *Ae. mutica*, та вивчити їхні властивості щодо зимо- та морозостійкості.

Інтрогресивні лінії створювали із застосуванням методу «змішування» хромосом двох чужинних геномів у гексаплоїдному гібриді між двома пшеничним генотипами, які мають однакові субгеноми AABB і відрізняються за третім субгеномом [6]. Гексаплоїд Авротіка (AABBTT) є амфідиплоїдом тетраплоїдного компоненту AABB м'якої пшениці сорту Аврора та диплоїдного виду *Ae. mutica* (ТТ геном). Відповідно до методу змішування геномів, було отримано гібрид F₁ між Аворою та Авротікою (рис. 3.1). Подальша робота з матеріалом залежала від фертильності рослин покоління F₁: якби вони були самостерильними, потрібно було б беккросувати їх з Аворою, як це робилося раніше при створення інтрогресивних ліній – похідних Авролати (AABB^{UU}) та Аврозису (AABB^{S^{sh}S^{sh}}) [6]. Проте гібриди AABB^{DT} виявилися самофертильними, як колись гібриди між Авродесом (AABB^{SS}) та Аворою [6]. Можливо фертильність рослин F₁ та більшості рослин наступних

покоління F_2 – F_5 пояснюється тим, що хромосоми генотипів D і T можуть кон'югувати (принаймні певною мірою). У рослин F_1 замість очікуваної конфігурації асоціації хромосом у метафазі мейозу 1 материнських клітин пилку (М1 МКП) $14^{\text{II}} + 14^{\text{I}}$ спостерігали збільшення кількості бівалентів до 19 при максимальній асоціації за всіма дослідженими метафазними пластинками.

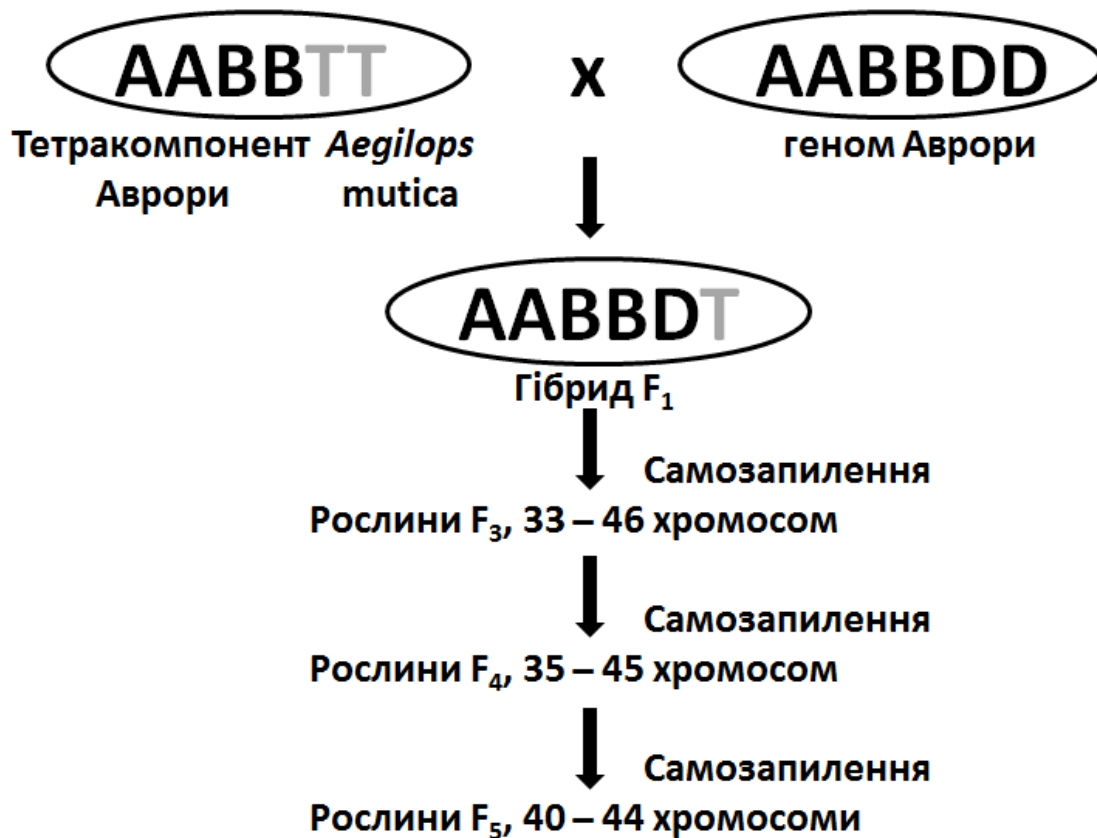


Рис. 3.1. Схема створення ліній *T. aestivum* / *Ae. mutica* методом «змішування» хромосом третього субгенотипу у гібриді F_1 між сортом м'якої пшениці (Аврора) та генотипно-заміщеним амфідиплоїдом Авротіка, генотип якого містить тетраплоїдний компонент AABB сорту Аврора та генотип TT виду *Aegilops mutica*.

Гібриди F_1 було вирощено у полі при осінньому посіві та природній яровизації. Колосся ізолювали на стадії колосіння до цвітіння. Насіння було отримано як на ізолюваних колоссях, так і на неізолюваних. З останніми подальшу роботу не проводили. Від 109 ізолюваних колосів рослин F_1 було отримано 515 насінин F_2 . Середня фертильність (кількість зернин на колосок) була 0,20 з мінімальним значенням 0 та максимальним 0,74. Розподіл

показників фертильності нормальному не відповідає і має позитивний ексцес ($E = 1,15 \pm 0,072$, $t = 15,9$). Насіння F_2 без визначення кількості хромосом в індивідуальних зернинах було висіяне восени в полі для природної яровизації. З цих 515 насінин паростки отримали лише з 219 (42,5%). Рослин F_2 , що дали насіння, було 41 (18,7% від пророслих насінин). Насіння F_3 було отримано під ізоляторами і пророщено для визначення кількості хромосом у первинних корінцях. Кількості хромосом вдалось встановити для 137 паростків F_3 (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Самофертильність та розподіл кількості хромосом у паростках F_3 – F_4 від схрещування Авротіка х Аврора

Покоління	Фертильність ¹⁾		Кількість паростків з певною кількістю хромосом													
	мін.	макс.	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
F_3	1,5	18	2	2	7	4	5	17	12	31	24	17	8	6	1	1
F_4	8,5	49,5	—	—	1	—	8	12	10	44	92	36	28	8	3	—

Примітка ¹⁾ Фертильність визначено тут як кількість насінин, отриманих з обмолочених колосів для кожної рослини вказаного покоління.

Паростки яровизували у камері 45 днів при $t=4^\circ\text{C}$. 97 рослин F_3 , що збереглися після яровизації ($70,8 \pm 3,88\%$), було вирощено у світловій кімнаті за оптимальними для всіх стадій онтогенезу режимами освітлення та температури. Насіння F_4 від самозапилення отримали від 76 рослин з кількістю хромосом в їхніх паростках від 35 до 46. З паростками, отриманими з насіння F_4 та F_5 , працювали за такою самою схемою: насіння пророщували, кількість хромосом визначали у первинних корінцях, паростки яровизували і після яровизації вирощували у світловій кімнаті для самозапилення. Від рослин F_4 з доброю фертильністю брали лише по 10 штук насінин F_5 . Насінини F_5 для пророщування та визначення хромосомних чисел брали лише від тих рослин F_4 ,

кількість хромосом в яких коливалась від 40 до 43. Рослини саме з такою кількістю хромосом можуть давати гексаплоїдних (42-хромосомних) нащадків, потенційно інтрогресивних. Тому розкид кількостей хромосом серед паростків F_5 (табл. 3.2) вже не презентує загальний розмах варіювання рослин за кількістю хромосом у поколінні (Авротіка х Аврора) F_5 .

Таблиця 3.2

Характеристика паростків F_5 за кількістю хромосом

Кількість хромосом	Кількість рослин з певними кількостями хромосом та особливостями каріотипу					
	Без особливостей	1 супутник	4 супутники	1 тело-центрик	2 тело-центрики	Всього рослин
40	39	1		3		43
41	69	1		2		72
42	42		1	11	2	56
43	7			2		9
44	1				1	2
						182

За Жировим [6], при створенні інтрогресивних ліній методом «змішування» хромосом третього субгеному у гібриді AABBDX, де X – геном егілопсу, в отриманих лініях цілі хромосоми егілопсу можуть заміщувати хромосоми пшеничного субгеному D, або додаватися до повного геному пшениці. Це відбувається за таким цитогенетичним механізмом: теоретично, в M1 мейозу МКП рослин F_1 з геномом AABBDX має бути 14 бівалентів і 14 унівалентів, якщо хромосоми геному D не кон'югують з гомеологічними хромосомами егілопса. В анафазі для будь-якого унівалента існує три можливості: залишитися в цитоплазмі (за даними літератури імовірність – 0,5), відійти до одного полюсу веретена поділу (імовірність складає 0,25), або відійти до іншого полюсу (0,25). В двох останніх випадках унівалент бере

участь у створенні гамет, проте різних. Оптимальна умова формування гексаплоїдної зиготи – об'єднання 21-хромосомних гамет, є досить малоюмовірною подією, яка кількісно характеризується першим членом при розкритті біному $(0,25+0,75)^7$, тобто 0,0000610352. Саме тому гібриди покоління F_1 з різними третіми субгеномами характеризуються, як правило, самостерильністю [7].

У $M1$ мейозу МКП гібрида AABBDT спостерігали збільшення кількості бівалентів порівняно з очікуваною. Отже, мейоз був більш упорядкованим та відбувалося формування насіння від самозапилення рослин F_1 . Коли створювали чужинно-заміщені лінії — похідні Авродесу (AABBSS) [1], появу в метафазі 1 мейозу МКП рослин покоління F_1 зайвих бівалентів можна було пояснити наявністю у гібриді F_1 AABBD S геному S, який пригнічує дію гена *Ph1* (інгібітора кон'югації гомеологічних хромосом пшениці [65; 142] і, отже, сприяє кон'югації гомеологічних хромосом. Про генотип T відомо, що при схрещуванні *Aegilops mutica* з видами, що несуть генотип D, у гібридах F_1 хромосоми T геному кон'югують з хромосомами геному D майже регулярно [104; 157]. Саме цим слід пояснювати збільшення кількості бівалентів до 19 проти очікуваних 14 у гібридах між Авророю та Авротікою. Мультивалентів у МКП таких гібридів не спостерігали, отже, нема підстав вважати, що генотип T сприяє кон'югації негомологічних хромосом. Можливо, що саме кон'югацією хромосом T та D в гібридах F_1 та F_2 від схрещування Аврора і Авротіка пояснюється висока самофертильність гібридних рослин і велика кількість 42-хромосомних паростків в поколіннях F_3 та F_4 у порівнянні з кількістю таких нащадків, що спостерігалась при створенні інтрогресивних ліній з хромосомами від *Ae. sharonensis*, *Ae. speltoides*, *Ae. umbellulata* [7].

3.1.2. Вивчення хромосомних наборів в рослинах різних поколінь при створенні ліній *Triticum aestivum*/*Aegilops mutica*. Для створення гексаплоїдних інтрогресивних ліній становлять інтерес лише рослини з такою кількістю хромосом, від яких у перспективі можна отримати 42-хромосомні

еуплоїдні рослини. Тому визначення кількості хромосом у гібридах було важливим етапом при створенні інтрогресивних ліній. Розкид кількостей хромосом у рослин F_3 , що визначали у первинних корінцях паростків, був від 33 до 46 хромосом (табл. 3.1), хоча не всі рослини, що з них вирости, були життєздатними і фертильними. Для рослин F_4 – від 37 до 45, для F_5 – від 40 до 44 з неухильним збільшенням кількості паростків, у яких кількості хромосом встановлювали. Від рослин F_1 – F_3 брали для вивчення всі утворені рослинами насінини, щоб не втратити потенційного розмаїття чужинних включень, за якими розрізнялися нащадки, починаючи з насіння F_2 гібридних рослин F_1 . Починаючи з покоління F_4 , для яровизації та вирощування добирали паростки з кількістю хромосом не меншою ніж 40, найбільш перспективних для створення гексаплоїдних ліній. Рослина, що має 40 хромосом, може бути подвійним моносоміком, який є потенційним засновником двох різних чужинно-заміщених ліній, якщо така рослина буде життєздатною та самофертильною.

Процес формування гібридних геномів не обмежується лише сортуванням хромосом двох різних геномів. Він може супроводжуватися також міжхромосомними та внутрішньохромосомними перебудовами в гібридному геномі. Це припущення частково підтверджується вже простим спостереженням метафазних пластинок: зустрічаються паростки, хромосомний набір яких включає телоцентрики, дицентричні та демінутивні хромосоми, зміну кількості супутникових хромосом відносно очікуваної на підставі каріотипів Аврори та Авротіки (рис.3.2).

Загалом, розмах варіювання за кількістю хромосом у поколінні F_5 був 40–44 хромосоми, сім рослин серед них були такими, що дали тільки 42-хромосомних нащадків. Рослини з кількістю хромосом більше 42 залишали для подальшого самозапилення як цінне джерело множинних чужинних заміщень. Під лініями з множинними чужинними заміщеннями ми маємо на увазі такі лінії, які мають більше однієї чужинної хромосоми, яка замістила хромосому субгеному D пшениці. Власне саме для отримання множинних заміщень Є.Г. Жировим і було запропоновано та розроблено метод змішування хромосом

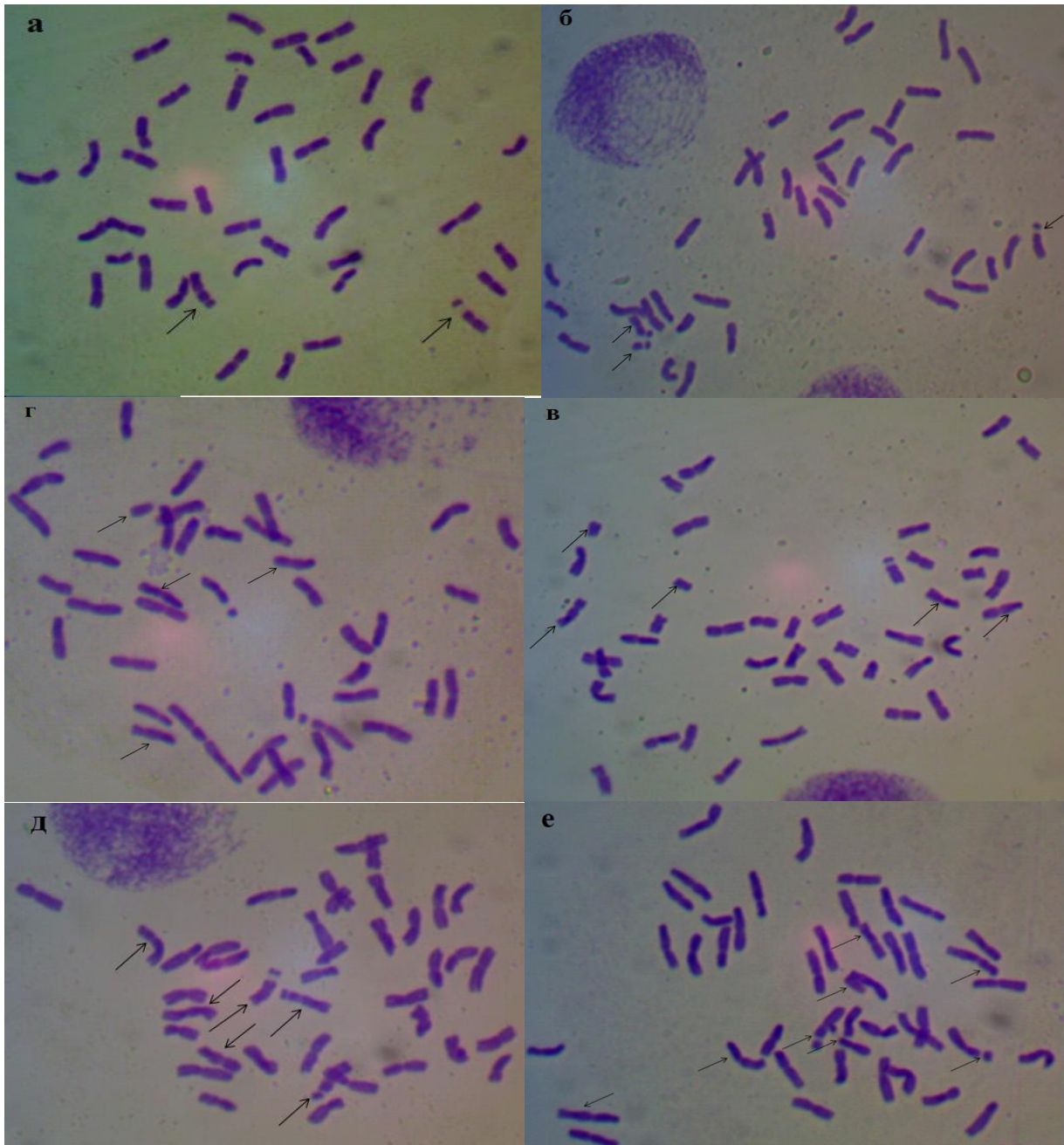


Рис. 3.2. Метафазні пластинки у клітинах корінців паростків покоління F₄: а – каріотип Аврори, 42 хромосоми, з них дві зі супутниками; б – 42 хромосоми, 3 супутникові, одна з яких телоцентрична; в – 42 хромосоми, дві з яких нетипово маленькі (демініутивні?), дицентрик, три супутникові, дві з яких не схожі на супутникові хромосоми каріотипу Аврори, г – 42 хромосоми, серед них один телоцентрик, три дицентрики; д – 40 хромосом, з них два дицентрики, чотири супутникові; е – 44 хромосоми, один телоцентрик, чотири дицентрики; три супутникові.

в одному з трьох субгеномів гексаплоїдного гібриду від схрещування двох гексаплоїдів, які відрізняються один від одного лише одним з трьох субгеномів [6]. Необхідність створення інтрогресивних ліній з множинними інтрогресіями можна пояснити можливістю залучити до геному пшениці генів, що контролюють кілька корисних ознак, у складі геному однієї інтрогресивної лінії, або одну ознаку, що має немоногенне успадкування. За сучасними даними, генетичне забезпечення стійкості до абіотичних стресів, в нашому випадку це підвищена зимостійкість Авротіки, майже ніколи не буває моногенним, а здійснюється в результаті експресії і взаємодії багатьох генів [226]. Щоб перенести у геном пшениці кілька ключових генів, які беруть участь у контролі корисної ознаки (стійкості до певного абіотичного стресу), навіть теоретично потрібно починати роботу з таким геномом, який має кілька чужинних заміщень. І якщо Авротіка характеризується підвищеною у порівнянні з м'якою пшеницею зимостійкістю, інтерес викликають не лише гексаплоїдні інтрогресивні лінії, які наближаються за цим показником до Авротіки, а і лінії з 44 хромосомами. В будь-якому випадку, першим кроком у такій роботі є створення гексаплоїдних ліній з чужинними інтрогресіями, які будуть схрещуватися з м'якою пшеницею без обмежень і давати фертильні гібриди, серед нащадків яких ми можемо шукати рослини з бажаними властивостями.

3.1.3. Характеристика ліній *Triticum aestivum/Aegilops mutica* за ознаками морфології рослин. Під час створення інтрогресивних ліній *Triticum aestivum/Aegilops mutica* крім контролю кількості хромосом також важливо перевірити наявність чужинного генетичного матеріалу у геномах цих рослин. Першим доказом наявності чужинного генетичного матеріалу у складі геному лінії інтрогресивного походження можуть дати результати оцінки ліній за ознаками морфології сформованої рослини.

Порівняльне вивчення сорту Аврора та геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка показало, що вони відрізняються за кількома ознаками морфології колосу (рис. 3.3) та вегетативної частини рослини, а також за

стійкістю до борошнистої роси та зимостійкістю. Різним проявам ознаки (градаціям), були привласнені для зручності опису ліній, номери, причому градація «1» за будь-якою ознакою характеризувала сорт Аврора, градація «2» – Авротіку. Серед ліній було виявлено інші градації, яких не було в жодного з компонентів схрещування при створенні гібридів F_1 (табл. 3.3).

Оцінку рослин за ознаками морфології виконували у всіх поколіннях, що розщеплювались, починаючи з F_2 . Було задіяно ті ознаки морфології колосу та вегетативної частини, що за ними відрізняються компоненти схрещування, Аврора та Авротіка. За такими ознаками серед розмаїття гібридних нащадків було зареєстровано від двох до шести градацій. Градаціям було привласнено порядкові номери, які використано для опису рослин, наведеного у таблиці 3.3:

- опушення зеленої рослини: без опушення (1), опушені вушка (2), опушені вушка та край основи листка (3), опушені вушка, край основи листка та край листової піхви (4), опушені вушка, край основи листка та листові пластинки (5), опушені вушка та край основи листка, край листової піхви та листові пластинки (6);

- остистість: колос безостий (1), остистий (2), напівостистий (3), остеподібні відростки (4), розвинена ость на апікальному колоску безостого колоса (5);

- форма та щільність колосу: веретеновидний (1), спельтоїдний (2);

- воскова осуга: вся рослина вкрита восковою осугою (1), вся рослина позбавлена воскової осуги (2), вегетативна частина з восковою осугою, колос без воскової осуги (3);

- колір зрілого колосу: червоний (1), світло-коричневий (2), темно-коричневий (3), чорний (4);

- опушення: відсутнє (1), густе рівномірне (2), густе нерівномірне, коли на найбільш опуклій частині опушення більш слабе геть до відсутності трихом (3), зріджене рівномірне (4), зріджене нерівномірне (5), щетинисте рівномірне (6), щетинисте нерівномірне (7), трихоми лише на кілю та центральній жилці луски;

- форма плеча: пряме (1), вузьке (2), скошене (3), виїмчасте (4), відсутнє (5);
- форма луски: овальна (1), видовжена (2);
- вдавленість у основі луски: наявна (1), відсутня (2), стан проміжний, важкий для визначення (3);
- ламкість колосового стрижня: неламкий (1), ламкий (2);
- жорсткість луски: м'яка (1), жорстка (2), дуже жорстка (3);
- рівномірність забарвлення луски: нерівномірне, коли на найбільш опуклій частини луски пігментація послаблюється (1), пігмент на лусці розподілений рівномірно (2);
- колір стебла під колосом: солом'яно-жовтий (1), фіолетовий (2);
- колір зернівки: червоний (1), темно-червоний (2), зеленуватий (3), зелений (4);
- стійкість до борошнистої роси: рослина сприйнятлива (1), рослина стійка (2).

У таблиці 3.3 наведено результати оцінки рослин F_4 , приклади морфотипів наведено на рисунку 3. Оскільки саме з цього покоління для самозапилення відбирали лише рослини, нащадки яких протягом 1-2 поколінь досягнуть кількості хромосом 42, рослинам цього покоління привласнили номери та дали морфологічний опис. З таблиці 3.3 видно, що все розмаїття рослин, які в перспективі дадуть цитологічно стабільні 42-хромосомні лінії, походять всього лише з 9 рослин F_2 з ініціальної кількості 41 рослина F_2 , що перезимували у полі та дали насіння F_3 . Серед них рослини №58 та 59 оцінювались за стійкістю до борошнистої роси балом 7, решта – балом 9. Саме тому у таблиці 3 всі лінії оцінюються градацією 2, як такою, що притаманна Авротіці, а не Аврорі. Спеціального добору стійких рослин ми не проводили, хоча можна вказати, що серед 98 рослин, які з загальної кількості 219 таких, що перезимували, досягли стадії колосіння, на якій робили оцінку стійкості, балом 7–9 було оцінено 88 рослин, решта — балом 6–5 (сприйнятливі). Від сприйнятливих рослин не було отримано нащадків F_3 .

Таблиця 3.3

Характеристика рослин (Авротіка х Аврора) F₄ за ознаками з поліморфним виразом у Аврори та Авротіки

Рослини F ₂			Рослини F ₃		Рослини F ₄ ¹⁾		кількість хромосом у F ₄	кількість хромосом у F ₅	Опушення зеленої рослини ²⁾	остистість	форма та щільність колосу	Воскова осуга	Колір стиглого колосу	Опушення луски	форма плеча	форма луски	Вдавленість основи луски	ламкість колосового стрижня	Жорсткість луски	рівномірність забарвлення луски	Колір стебла під колосом	Колір зернівки	Стійкість до борошнистої роси	Фертильність ³⁾
Аврора									1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
Авротіка									2	2	2	2	2	1	2	2	2	1(2)	2	2	2	2	2	
18	3.1	1.3					40	40-41	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	2	0,6
		1.6					41	41-42	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0,5
		1.7					42	41-42	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0,6
		1.8					42	–	2	1	2	1	1	1	5	2	1	2	1	1	2	1	1	0,7
50	5.2	8.1					42	41-42	3	1	2	2	1	1	4	2	2	1	2	2	1	3	2	0,8
		8.2					41	41	4	1	1	2	2	1	4	2	2	1	2	2	2	3	2	0,9
		8.3					41	40-41	3	1	2	2	1	1	4	2	2	1	3	2	1	3	2	0,6
		8.7					42	42	4	1	1	2	1	1	2	2	2	1	2	1	1	3	2	0,2
55	7.1	10.2					41	38-41	3	1	1	2	2	1	4	2	2	1	2	2	2	1	2	0,2
57	10.4	13.3					42	37-40	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	0,5

Продовження таблиці 3.3

Рослини F ₂	Рослини F ₃	Рослини F ₄ ¹⁾	кількість хромосом у F ₄	кількість хромосом у F ₅	Опушення зеленої рослини ²⁾	остистість	форма та щільність колосу	Воскова осуга	Колір стиглого колосу	Опушення луски	форма плеча	форма луски	Вдавленість основи луски	ламкість колосового стрижня	Жорсткість луски	рівномірність забарвлення луски	Колір стебла під колосом	Колір зернівки	Стійкість до бо-рошнистої роси	Фертильність ³⁾
		13.4	41	–	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	0,6
66	11.2	14.1	41	42	2	1	1	1	1-4	8	1	1	2	2	1	2	1	1	1	0,2
		14.2	44	43-44	3	1	1	1	1-4	8	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0,3
		14.3	41	42	2	1	2	1	4	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	0,1
		14.4	43	41-42	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0,7
		14.8	43	–	2		1	1	1-4	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,4
65	12.1	15.2	42	42	1	1	1	1	1	1	4	1	2	1	2	2	1	1	2	0,7
		15.3	41	40-41	1	1	1	1	1	1	4	1	2	1	2	2	1	1	2	0,5
		15.4	41	41	1	1	1	1	1	1	4	1	2	1	2	2	1	1	2	0,5
		15.5	41	41-42	1	1	1	1	1	1	4	1	2	1	1	2	1	1	2	0,5
	12.4	16.1	41	41-42	1	1	1	1	2	1	4	1	2	1	1	2	1	1	2	0,6
		16.2	41	40-41	1	1	1	1	1	1	4	1	2	1	1	2	1	1	2	0,6
		16.3	42	41	1	1	1	1	1	1	4	1	2	1	1	2	1	1	2	0,5

Продовження таблиці 3.3

Рослини F ₂	Рослини F ₃	Рослини F ₄ ¹⁾	кількість хромосом у F ₄	кількість хромосом у F ₅	Опушення зелені рослини ²⁾	остистість	форма та щільність колосу	Воскова осуга	Колір стиглого колосу	Опушення луски	форма плеча	форма луски	Вдавленість основи луски	ламкість коло-сового стрижня	Жорсткість луски	рівномірність за- барвлення луски	Колір стебла під колосом	Колір зернівки	Стійкість до бо- рошистої роси	Фертильність ³⁾
		16.4	40	41	1	1	1	1	1	1	4	1	2	1	1	2	1	1	2	0,5
		16.5	40	41	1	1	1	1	1	1	4	1	2	1	1	2	1	1	2	0,4
		16.6	40	41	1	1	1	1	1	1	4	1	2	1	1	2	1	1	2	0,4
		16.7	40	–	1	1	1	1	1	1	4	1	2	1	1	2	1	1	2	0,4
	12.6	17.2	40	41	1	1	1	1	2	1	4	1	2	1	1	2	1	1	2	0,6
		17.3	41	41-42	1	1	1	1	1	1	4	1	2	1	1	2	1	1	2	0,5
		17.4	42	–	1	1	1	1	1	1	4	1	2	2	1	2	1	1	2	0,5
		17.5	41	41	1	1	1	1	2	1	4	1	2	1	1	2	2	1	2	0,5
		17.6	41	–	1	1	1	1	1	1	4	1	2	1	1	2	1	1	2	0,4
		17.7	41	41	1	1	1	1	1	1	4	1	2	1	1	2	1	1	2	0,6
		17.8	41	40-41	1	1	1	1	1	1	4	1	2	2	2	2	1	1	2	0,6
		17.9	41	41-42	1	1	1	1	1	1	4	1	2	1	1	2	1	1	2	0,7

Продовження таблиці 3.3

Рослини F ₂	Рослини F ₃	Рослини F ₄ ¹⁾	кількість хромосом у F ₄	кількість хромосом у F ₅	Опушення зеленої рослини ²⁾	остистість	форма та щільність колосу	Воскова осуга	Колір стиглого колосу	Опушення луски	форма плеча	форма луски	Вдавленість основи луски	ламкість коло-сового стрижня	Жорсткість луски	рівномірність за- барвлення луски	Колір стебла під колосом	Колір зернівки	Стійкість до бо- рошнитої роси	Фертильність ³⁾
		24.5	41	40-41	2	3	1	2	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	2	1,2
	13.8	26.1	41	41-42	3	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,3	2	0,4
		26.2	41	41-42	3	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,3	2	1,1
		26.4	40	–	3	1	1	3	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1,0
	13.9	27.1	42	–	1	3	1	2	1	1	1	1	1	4	2	1	1	1	2	1,1
		27.3		41	–1	4	1	2	1	1	4	2	1	1	2	3	1	3	1	1,1
	13.10	29.1	42	42	4	5	1	3	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1,3	2	0,4
		29.3	42	42	2	4	1	3	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1,3	2	0,6
		29.5	42	40-42	2	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1,1
64	14.1	30.1	42	42	1	1	4	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	3	2	1,2
		30.2	42	41-42	1	1	1	3	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1,2
		30.3	42	41-42	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	3	2	1,0

Продовження таблиці 3.3

Рослини F ₂	Рослини F ₃	Рослини F ₄ ¹⁾	кількість хромосом у F ₄	кількість хромосом у F ₅	Опушення зеленої рослини ²⁾	остистість	форма та щільність колосу	Воскова осуга	Колір стиглого колосу	Опушення луски	форма плеча	форма луски	Вдавленість основи луски	ламкість коло-сового стрижня	Жорсткість луски	рівномірність за- барвлення луски	Колір стебла під колосом	Колір зернівки	Стійкість до бо- рошнистої роси	Фертильність ³⁾
		30.4	42	42	41	1	1	1	1	1	4	1	2	2	1	1	1	3	2	1,1
		30.5	42	42	1	1	1	1	1	1	4	1	2	2	1	2	1	3	2	1,2
	14.3	32.1	40	40-42	1	1	2	3	1	1	4	1	2	1	1	1	1	1	2	0,9
		32.3	40	41	1	1	2	3	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1,3
		32.4	40	41-42	1	1	2	1	1	1	4	1	2	2	1	1	1	1	2	1,2
		32.5	41	41	1	1	2	3	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2	1,8
		32.6	40	41	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2	3	1	1	2	1,4
		32.8	42	41-42	1	1	1	1	1	1	5	2	1	2	1	1	1	1	2	1,1
	14.6	34.4	41	41-42	1	1	2	1	2	1	4	1	1	1	1	1	2	1	2	0,7
	14.8	35.1	41	41-42	1	1	1	3	2	1	5	2	1	1	1	2	1	1	2	1,0
		35.2	41	40-42	1	1	1	3	1	1	5	1	1	1	1	1	1	1	2	1,1
		35.3	41	40-41	1	1	1	3	1	1	5	2	1	1	1	1	1	1	2	1,0

Продовження таблиці 3.3

Рослини F ₂	Рослини F ₃	Рослини F ₄ ¹⁾	кількість хромосом у F ₄	кількість хромосом у F ₅	Опушення зеленої рослини ²⁾		остистість	форма та щільність колосу	Воскова осуга	Колір стиглого колосу	Опушення луски	форма плеча	форма луски	Вдавленість основи луски	ламкість коло-сового стрижня	Жорсткість луски	рівномірність за-барвлення луски	Колір стебла під колосом	Колір зернівки	Стійкість до бо-рошністої роси	Фертильність ³⁾
		35.4	41	41	1	1	1	1	1	1	1	5	2	1	1	1	1	1	1	2	1,2
	14.10	36.1	41	40-42	1	1	1	3	2	1	1	5	2	1	1	1	1	1	1	2	0,4
		36.2	41	41	1	1	2	3	1	1	1	4	2	2	2	2	2	2	1	2	0,4
		36.3	41	40-41	1	1	1	3	1	1	1	5	2	1	1	1	1	1	1	2	0,7
		36.4	41	40-41	1	1	1	1	1	1	1	4	1	2	1	1	2	1	1	2	1,6
59	15.4	37.1	41	41	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	2	0,5
		37.2	40	41-42	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	1	2	1,2
		37.3	41	40-41	1	1	1	2	1	1	1	5	1	2	1	1	1	1	1	2	0,6
58	17.1	40.2	42	40-42	3	1	2	2	1	1	1	4	2	2	1	3	2	1	2	2	1,2
		40.3	42	42	3	1	2	2	1	1	1	4	2	2	1	3	2	1	2	2	1,0
		40.5	42	40-42	3	1	2	2	1	1	1	4	2	2	1	3	2	1	2	2	1

Продовження таблиці 3.3

Рослини F ₂	Рослини F ₃	Рослини F ₄ ¹⁾	кількість хромосом у F ₄	кількість хромосом у F ₅	Опушення зеленої рослини ²⁾	остистість	форма та щільність колосу	Воскова осуга	Колір стиглого колосу	Опушення луски	форма плеча	форма луски	Вдавленість основи луски	ламкість коло-сового стрижня	Жорсткість луски	рівномірність за- барвлення луски	Колір стебла під колосом	Колір зернівки	Стійкість до бо- рошнистої роси	Фертильність ³⁾
	17.2	41.2	42	41-42	3	1	2	2	1	1	5	2	2	1	3	2	1	2,3	2	1,2
		41.5	41	41	3	1	2	2	1	1	5	2	2	1	3	2	1	2,3	2	1
	17.3	42.1	–	42	3	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	3	1	2	2	1,1
		42.2	42	42	4	1	2	2	1	1	4	2	2	1	3	2	1	2	2	1,2
		42.3	–	42	4	1	2	2	1	1	4	2	2	1	3	2	1	2	2	1,3
		42.4	42	42	4	1	2	2	1	1	5	2	2	1	3	2	1	2	2	1,2
	17.4	43.1	42	39-42	4	1	2	2	1	1	5	2	2	1	3	2	1	2,3	2	1,3
		43.2	42	41-42	4	1	2	2	1	1	4	2	2	1	2	2	1	2,3	2	1,1
		43.3	42	41-42	4	1	1	2	1	1	4	2	2	1	2	2	1	2,3	2	1,4
		43.4	40	41-42	3	2	1	2	1	1	4	2	2	1	2	2	1	2,3	2	1,6
		43.5	40	41-42	2	1	1	2	1	1	4	2	2	1	2	2	1	2,3	2	0,9
	17.5	44.1	42	41-42	3	1	2	2	1	1	5	2	2	1	3	2	1	3	2	1,3

Продовження таблиці 3.3

Рослини F ₂	Рослини F ₃	Рослини F ₄ ¹⁾	кількість хромосом у F ₄	кількість хромосом у F ₅	Опушення зеленої рослини ²⁾	остистість	форма та щільність колосу	Воскова осуга	Колір стиглого колосу	Опушення луски	форма плеча	форма луски	Вдавленість основи луски	ламкість коло-сового стрижня	Жорсткість луски	рівномірність за- барвлення луски	Колір стебла під колосом	Колір зернівки	Стійкість до бо- рошнистої роси	Фертильність ³⁾
		44.2	41	42	3	1	1	2	1	1	4	2	2	1	2	2	1	3	2	1,4
		44.3	42	42	3	1	2	2	1	1	5	2	2	1	3	2	1	2	2	1,2
		44.4	42	42	3	1	2	2	1	1	4	2	2	1	3	2	1	2	2	1,4
		44.5	42	42	3	1	2	2	1	1	5	2	2	1	3	2	1	1	2	1,5
	17.6	45.2	42	41-42	4	1	1	2	1	1	4	2	2	1	2	2	1	2	2	0,9
		45.3	40	42	4	1	2	2	1	1	4	2	2	1	3	2	1	2	2	1,1
		45.4	42	42	4	1	2	2	2	1	4	2	2	1	3	2	1	1,2	2	0,5
		45.5	42	41-42	4	1	1	2	1	1	4	2	2	1	2	1	1	1	2	0,6
	17.7	46.1			6	1	1	2	2	1	4	2	2	1	2	2	2	1	2	1,4
		46.3	41	42	3	1	1	2	1	1	1	1	2	1	3	2	1	2	2	1,3
		46.4	42	41-42	5	1	1	2	1	1	1	1	2	1	3	2	1	2	2	1,5
		46.5	42	42	3	1	2	2	1	1	4	2	2	1	3	2	1	2	2	1,3

Продовження таблиці 3.3

Рослини F ₂	Рослини F ₃	Рослини F ₄ ¹⁾	кількість хромосом у F ₄	кількість хромосом у F ₅	Опушення зеленої рослини ²⁾	остистість	форма та щільність колосу	Воскова осуга	Колір стиглого колосу	Опушення луски	форма плеча	форма луски	Вдавленість основи луски	ламкість коло-сового стрижня	Жорсткість луски	рівномірність за- барвлення луски	Колір стебла під колосом	Колір зернівки	Стійкість до бо- рошнитої роси	Фертильність ³⁾
	17.8	47.2			3	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	1,4
		47.4	42	42	3	1	1	2	1	1	4	1	1	1	1	2	1	2	2	0,9
		47.5	42	42	3	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1	1	2	1,4
		47.6	41	–	3	1	1	2	1	1	1	1	2	1	3	2	2	4	2	1,5
		47.7	42	42	3	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1	4	2	1,3
		47.8	41	42	3	1	1	2	1	1	5	1	2	1	2	3	1	1	2	1,4
		47.9	41	–	3	1	1	2	1	1	5	1	2	1	2	3	1	1	2	1,2
		50.1	41	–	4	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	2	1,0
	19.3	51.1	41	41	4	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	0,8
	24.1	53.4	43	42-43	1	1	1	2	1	1	4	2	2	1	3	2	1	2	2	0,9
	26.7	55.3	40	40	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	0,8
	34.2	66.1	41	42	3	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	0,7

Продовження таблиці 3.3

Рослини F ₂	Рослини F ₃	Рослини F ₄ ¹⁾	кількість хромосом у F ₄	кількість хромосом у F ₅	Опушення зеленої рослини ²⁾	остистість	форма та щільність колосу	Воскова осуга	Колір стиглого колосу	Опушення луски	форма плеча	форма луски	Вдавленість основи луски	ламкість коло-сового стрижня	Жорсткість луски	рівномірність за- барвлення луски	Колір стебла під колосом	Колір зернівки	Стійкість до бо- рошистої роси	Фертильність ³⁾
	36.3	72.1	–	–	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0,2
		72.2	44	43-45	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	2	0,3
		72.3	42	42-43	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0,5
		72.4	43	–	1	1	1	2	1	1	5	2	1	1	1	3	1	1	2	0,1
		72.5	43	43	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1,0
77	26.2	89.6	40	41	3	1	1	2	1	1	2	2	2	1	2	2	2	1	2	0,8
	26.4	90.3	40	–	4	1	4	1	2	1	5	2	2	1	3	2	2	1	2	0,2
	26.5	91.4	42	42	3	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	1	2	0,9

Примітки: ¹⁾ ДНК рослин F₄, виділених жирним шрифтом, було вивчено через дот-блот гібридизацію (рис. 3.4).

²⁾ Градація «1» для кожної з ознак, наведених у шапці таблиці, відповідає фенотипу Аврори, опис всіх інших градацій наведено у тексті.

³⁾ Фертильність визначали як кількість зерен на один колосок колосу.

З таблиці 3.3 видно, що серед наявного розмаїття рослин F_4 не було таких, які хоча б за двома ознаками не відрізнялись від Аврори. Серед ознак, за якими більшість ліній схожа не з Авророю, а з Авротікою, опушення зеленої рослини, відсутність воскової осуги на колосі та вегетативних частинах рослини, форма луски та пов'язана з нею форма плеча, відсутність вдавленості у нижній частині луски та пов'язане з цим рівномірне забарвлення луски, без більш світлої найбільш опуклої її частини, колір зрілої зернівки. За такими ознаками, як форма та щільність колосу та жорсткість колоскової луски частки ліній, подібні чи до Аврори чи до Авротіки були приблизно однакові. За кольором соломини під колосом переважна більшість ліній були схожі з Авророю. Очевидно, частота нащадків F_4 з певними ознаками Авротіки прямо залежить від кількості нащадків F_3 – F_4 , які пішли від конкретної рослини F_2 . Так, від рослин F_2 №18 та №57 утворилось по одному нащадку F_4 . А від рослин №58 та №67 — 27 та 15 нащадків, відповідно. Звичайно, ознаки, притаманні останнім рослинам F_2 , будуть розповсюджені серед рослин F_4 та наступних поколінь інтрогресивних ліній.



Рис. 3.3. Зріле колосся Аврори, Авротіки та деяких ліній (1–11).

За ознаками ламкості колоскового стрижня, опушення луски, забарвлення зрілої луски та зернівки лінії демонстрували градації, не властиві жодній з батьківських форм. Так, ні Аврора, ні Авротіка не мають опушення на лусках

чи темно забарвлених лусок, чи зеленого кольору насінини, а серед ліній такі з'явилися. Диплоїдний егілопс, донор геному Т Авротіки, також має світлі луски і насіння не забарвлене у зелений колір. Щодо ламкості колоскового стрижня, Авротіка не була ламкою у першій генерації після свого створення. Після певної кількості генерацій зрілий колос амфідиплоїда став відламуватися від соломини при легкому натисканні, тобто з'явилася ламкість в одній точці, характерна для деяких дикорослих родичів пшениці. Пізніше ми стали реєструвати дедалі частіше факт розсипання колосу Авротіки на окремі колоски при його дозріванні. Тому у таблиці 3 Авротіка за цієї ознакою має подвійну характеристику.

3.1.4. Перевірка наявності генетичного матеріалу від виду *Aegilops mutica* в геномі інтрогресивних ліній пшениці за допомогою методу дот-блот гібридизації. Результати оцінки ліній, наведені у таблиці 3, дають змогу припустити, що вони мають у складі свого геному генетичний матеріал егілопсу, чим і пояснюється наявність у описаних ліній градацій ознак, не властивих сорту м'якої пшениці Аврора. Для первинної швидкої оцінки рослин покоління F₄ на наявність в їхньому геномі генетичного матеріалу *Aegilops mutica* тотальну ДНК, виділену з окремих рослин F₄, було використано для дот-блот гібридизації.

Метод дот-блот ґрунтується на гібридизації гомологічних послідовностей ДНК, використовується для аналізу геномів і може бути корисним для виявлення інтрогресій в геномі. На рисунку 3.4 представлені результати дот-блоту. Крапки в крайньому лівому стовпчику представляють ДНК Аврори (Au), та Авротіки (A-tica). Аврора, як видно на рисунку 4, не має сигналу гібридизації (відсутній фіолетовий колір), оскільки Аврора не має генетичного матеріалу від *Ae. mutica* (негативний контроль). Авротіка має Т геном від *Ae. mutica*, і вона має сигнал гібридизації (позитивний контроль).

Інші крапки на рисунку 3.4 представляють місця на мембрані, де була нанесена ДНК рослин F₄ (знизу підписано номер лінії). Майже всюди у наявності сигнал гібридизації (фіолетове забарвлення). Не дали позитивного

сигналу ДНК лише ліній 1.3, 8.1, 30.1 та 80.2. З них за морфологією не було оцінено лінію 80.2, решта відрізнялись від Аврори за кількома ознаками (табл 3.3). Отже, майже всі рослини покоління F_4 містять в своєму геномі інтрогресії, що походять з Т геному *Aegilops mutica*. Це, скоріше за все, пояснюється дуже вузьким горлечком, крізь яке пройшли нащадки від схрещування Авротіка х Аврора: з 515 насінин F_2 утворених під ізоляторами, нащадки F_4 пішли лише з 11 насінин.

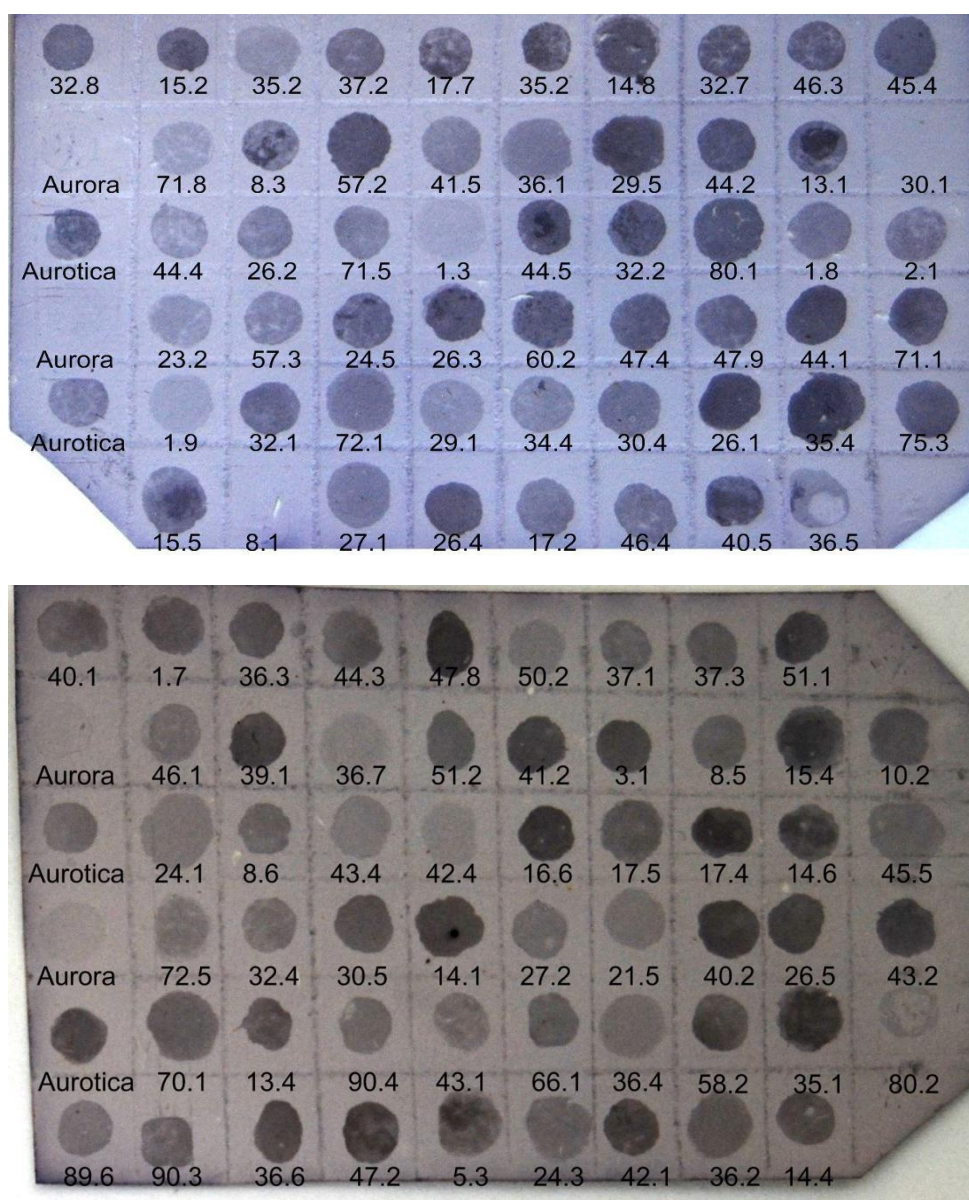


Рис. 3. 4. Дот-блот з ДНК гібридних рослин покоління F_4 від схрещування Аврори і Авротіки, з використанням у якості зонда геномної ДНК *Aegilops mutica*.

У якості зонда для дот-блот гібридизації використовували повногеномну ДНК *Aegilops mutica*. Тому позитивний сигнал гібридизації вказує лише на наявність в геномі лінії хроматину егілопса, не даючи жодної інформації про його хромосомну специфічність. Оскільки метою нашої роботи був пошук інтрогресій, які можна пов'язати з підвищеною зимостійкістю Авротіки, а на пшениці вже показано, що деякі пов'язані з цією ознакою гени локалізуються на хромосомах 5-ої гомологічної групи [201], було варто виконати аналіз ДНК ліній за мікросателітними локусами, що вважаються специфічними до хромосом цієї гомеологічної групи.

3.1.5. Мікросателітний аналіз рослин покоління F₄. Для аналізу наявності інтрогресій від *Ae. mutica* у складі хромосом 5 гомеологічної групи рослин покоління F₄ використали мікросателітні локуси, що за даними літератури є специфічними до хромосом цієї групи.

Спочатку потрібно було відібрати поліморфні мікросателітні локуси, тобто такі, за якими Аврора та Авротіка мають різні алелі. Було проаналізовано 19 SSR локусів (табл. 3.4) щодо їхнього поліморфізму між Авророю та Авротікою. Серед них 10 вважаються специфічними до 5A хромосоми, 3 – до 5B хромосоми пшениці, і 6 – до 5D хромосоми [118; 86]. Приклад електрофоретичних спектрів продуктів ампліфікації ДНК Аврори та Авротіки з праймерами до деяких мікросателітних локусів з тих, що були досліджені, представлено на рисунку 3.5.

Мікросателітні локуси, за якими не було різниці між Авророю та Авротікою, не бралися в подальшу роботу. А з мікросателітними локусами, що виявилися поліморфними для Аврори та Авротіки, можна було працювати далі – аналізувати спектри рослин покоління F₄ для виявлення, чи вони мають алель такий, як Аврора, чи такий, як Авротіка, або інший алель. Приклади електрофоретичних спектрів рослин покоління F₄, а також Аврори та Авротіки за мікросателітними локусами *Xcfd189-5D* та *Xbarc205-5D* представлені на рисунку 3.6. Видно, що ДНК деяких рослин F₄ дає спектр, подібний до Аврори, а інших – до Авротіки. За мікросателітним локусом *Xcfd189-5D* Авротіка має

нуль-алель (відсутній компонент у спектрі), і можна бачити, що частина ліній також має нуль-алель за цим локусом, тоді як інша частина ліній має компонент спектру з такою самою рухливістю, як компонент Аврори. А за локусом *Xbarc205-5D* Аврора і Авротіка мають компоненти з різною рухливістю: компонент спектру Авротіка характеризується більшою рухливістю, ніж компонент спектру Авротіка (рис. 3.6).

Таблиця 3.4

Поліморфізм за SSR локусами, специфічними до 5 групи хромосом, між Аворою та Авротікою

Мікросателітний локус	Поліморфізм між Аворою та Авротікою	Мікросателітний локус	Поліморфізм між Аворою та Авротікою
<i>Xwmc443-5A</i>	відсутній	<i>Xcfd156-5B</i>	у наявності
<i>Xwmc524-5A</i>	відсутній	<i>Xwmc537-5B</i>	відсутній
<i>Xwmc577-5A</i>	відсутній	<i>Xbarc216-5B</i>	відсутній
<i>Xbarc230-5A</i>	відсутній	<i>Xcfd189-5D</i>	у наявності
<i>Xbarc316-5A</i>	відсутній	<i>Xbarc144-5D</i>	у наявності
<i>Xgwm179-5A</i>	у наявності	<i>Xbarc205-5D</i>	відсутній
<i>Xgwm304-5A</i>	у наявності	<i>Xgwm182-5D</i>	відсутній
<i>Xgwm410-5A</i>	відсутній	<i>Xgwm234-5D</i>	відсутній
<i>Xgwm595-5A</i>	відсутній	<i>Xgwm272-5D</i>	відсутній
<i>Xgwm617-5A</i>	відсутній		

Як видно з рисунку 3.5, різниця у спектрах Аврора і Авротіка за певним локусом може полягати в тому, що Авротіка має зайвий компонент на спектрі, порівняно з Аворою (*Xcfd156-5B*), або у Авротіки може не вистачати певного компоненту спектру, порівняно з Аворою (*Xgwm179-5A*). Ці типи різниці між Аворою та Авротікою, а також взаємне розташування мікросателітних локусів на гомеологічних хромосомах 5 групи враховано і зображено на рисунку 3.7.

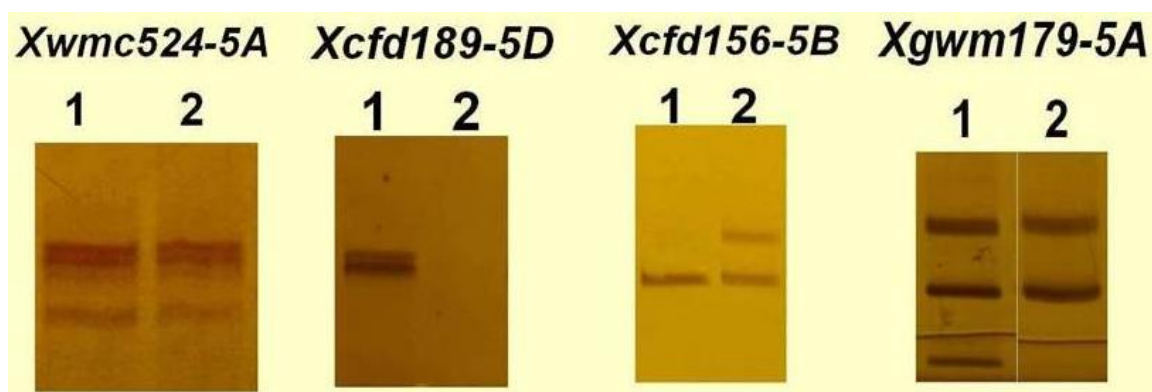


Рис. 3.5. Спектри електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації, утворених з праймерами до SSR-локусів з ДНК: 1 – Аврори, 2 – Авротіки. За локусом *Xwmc524-5A* немає різниці між спектрами Аврори та Авротіки; *Xcfd189-5D* – Авротіка має нуль-алель (не має продукту ампліфікації); *Xcfd156-5B* – Авротіка має подвійний компонент у спектрі, тоді як Аврора – один компонент; *Xgwm179-5A* – у Авротіки не вистачає одного (найлегшого) компонента, порівняно зі спектром Аврори. Тут та на інших рисунках зі спектрами компонентів ампліфікації розділення у поліакриламідному гелі, фарбування сріблом [32].

Результати аналізу електрофоретичних спектрів рослин покоління F_4 за чотирма мікросателітними локусами, поліморфними для Аврори та Авротіки, представлені в таблиці 3.5, де цифра «1» показує, що спектр ДНК лінії ідентичний спектру ДНК Аврори, цифра «2» – що спектр ДНК лінії ідентичний спектру ДНК Авротіка, а цифра «3» – що спектр відрізняється як від Аврори, так і від Авротіки. Там, де в таблиці 3.5 відсутня цифра для рослини з певним номером, не вдалось отримати продукт ампліфікації. Точно встановити причину відсутності продукту важко, можливо, це пов'язано з певною помилкою ПЛР.

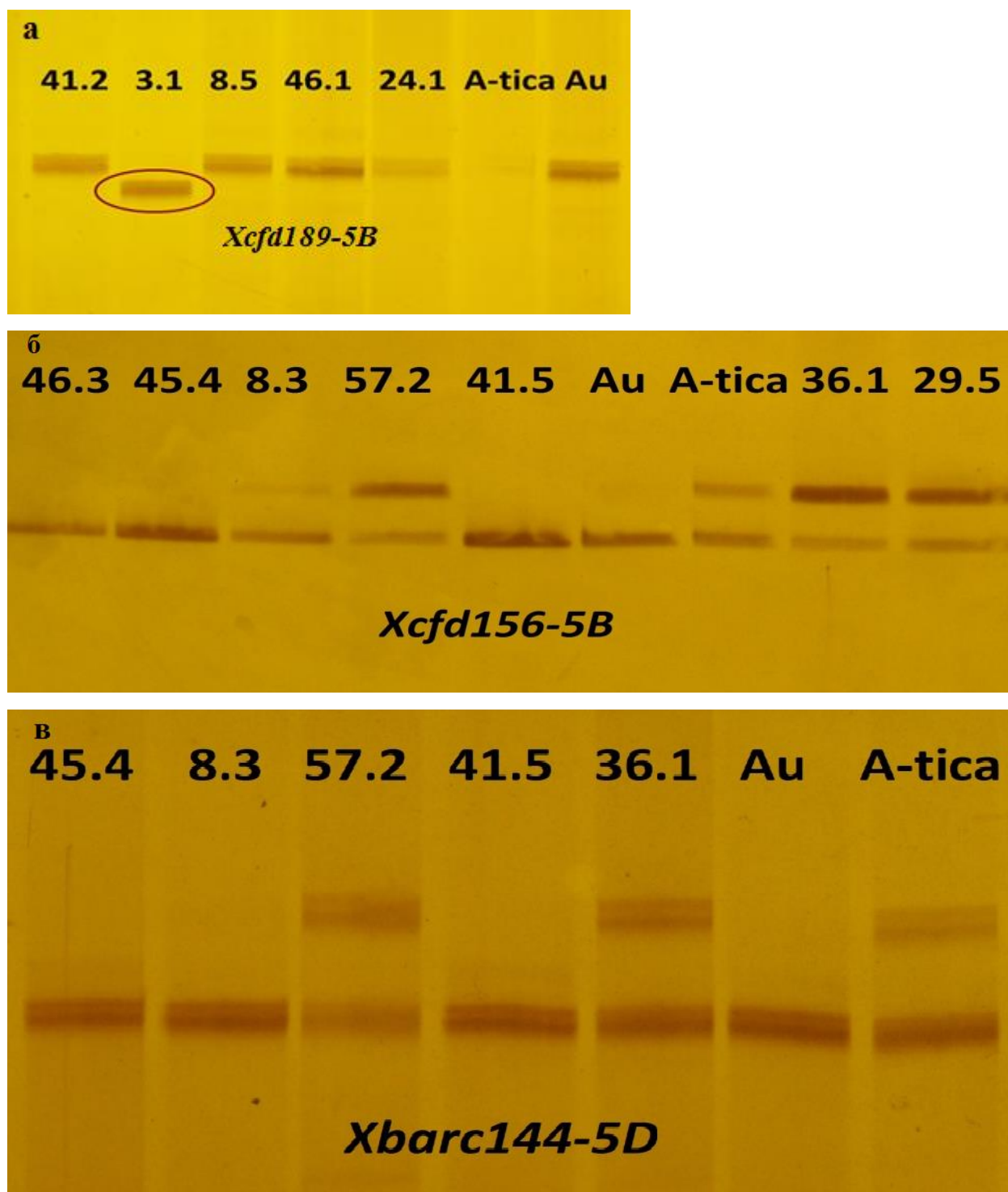


Рис. 3.6. Електрофоретичні спектри ДНК Аврори, Авротіки та деяких рослин покоління F₄ з праймерами до мікросателітних локусів *Xcfd189-5B* (а), *cfd156-5B* (б) та *Xbarc144-5D* (в): Au – Аврора, A-tica – Авротіка.

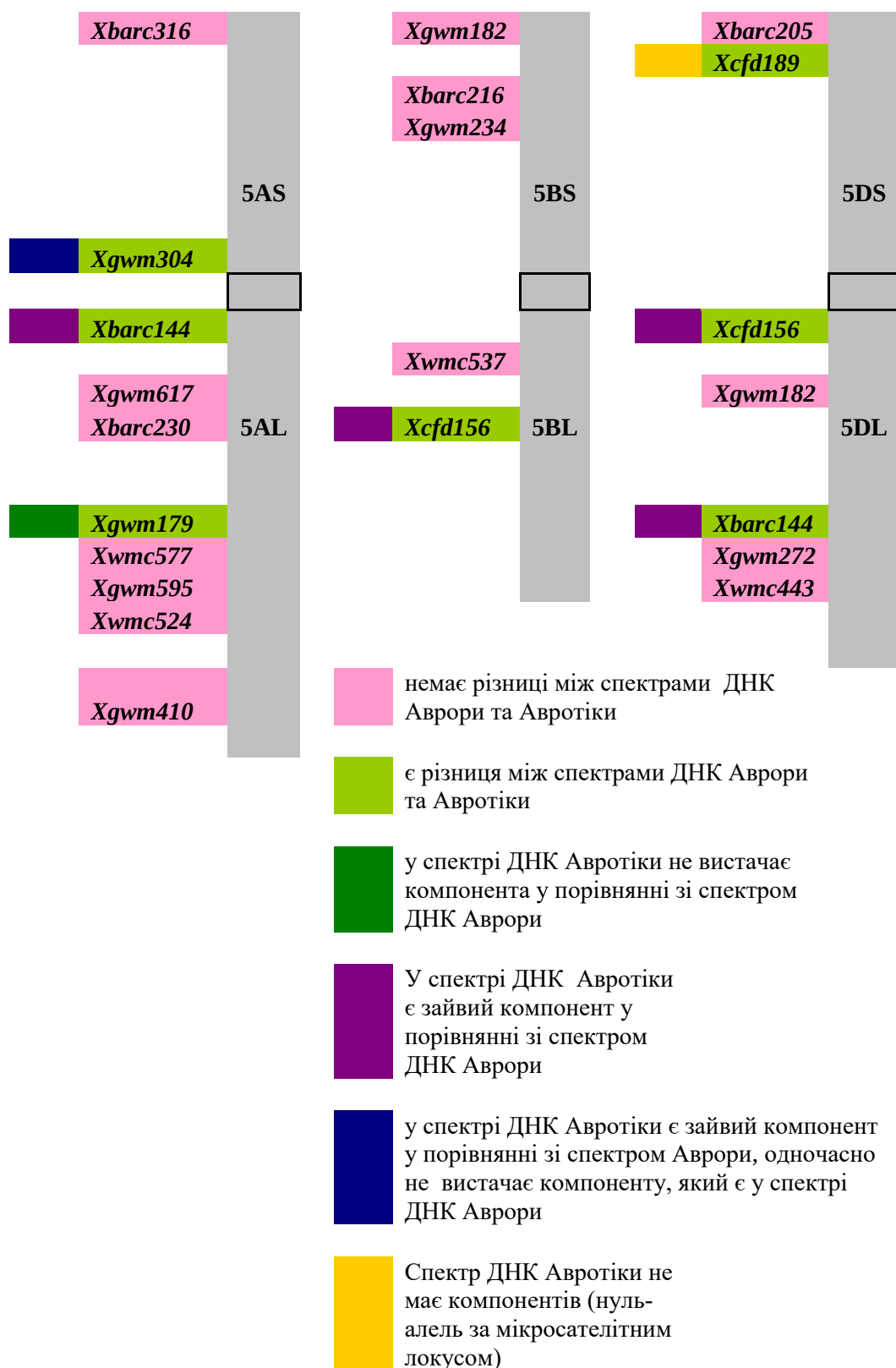


Рис. 3.7. Розташування досліджених мікросателітних локусів у гомеологічних хромосомах 5 групи та відомості про поліморфізм спектрів ДНК Аврори та Авротіка, отриманих при ампліфікації з праймерами цих локусів.

Локус *Xbarc144* є специфічним для двох хромосом, 5A та 5D, локуси *Xgwm182* та *Xcfd156*— для хромосом 5B та 5D [86, 118].

Таблиця 3.5

Результати аналізу електрофоретичних спектрів ДНК рослин покоління F₄ за чотирма мікросателітними локусами, поліморфними для Аврора та Авротіка

Номер рослини	<i>Xgwm179</i> - 5A	<i>Xcfd156</i> - 5B	<i>Xcfd189</i> - 5B	<i>Xbarc144</i> - 5D	Номер рослини	<i>Xgwm179</i> - 5A	<i>Xcfd156</i> - 5B	<i>Xcfd189</i> - 5B	<i>Xbarc144</i> - 5D
1.3	2	1	1	1	36.6	1	2	1	2
1.6	–	1	3	1	36.7	1	2	2	2
1.7	1	1	3	1	37.1	1	1	1	1
1.8	–	2	3	1	37.2	1	1	1	1
1.9	2	1	3	1	37.3	1	1	1	1
2.1	–	2	2	2	37.4	1	1	1	1
3.1	2	2	3	1	39.1	1	1	2	1
5.3	1	2	1	1	40.1	2	1	1	1
8.1	1	2	1	1	40.2	1	1	1	1
8.3	2	2	1	1	40.5	2	1	1	1
8.5	2	2	1	1	41.2	2	1	1	1
8.6	2	2	2	1	41.5	2	1	1	1
8.8	1	1	1	1	42.1	2	1	1	1
10.2	1	2	2	2	42.4	2	1	1	1
13.1	–	2	2	1	43.1	2	1	1	1
13.4	2	2	2	2	43.2	2	1	1	2
14.2	2	2	1	1	43.4	1	1	1	1
14.3	1	2	1	1	43.5	2	1	1	1
14.6	1	2	1	2	44.2	2	1	1	1
15.2	1	2	2	1	44.4	2	1	1	1
16.2	1	2	2	2	44.5	2	1	1	1

Продовження таблиці 3.5									
Номер рослини	<i>Xgwm179-5A</i>	<i>Xcfd156-5B</i>	<i>Xcfd189-5B</i>	<i>Xbarc144-5D</i>	Номер рослини	<i>Xgwm179-5A</i>	<i>Xcfd156-5B</i>	<i>Xcfd189-5B</i>	<i>Xbarc144-5D</i>
16.3	1	2	1	1	45.2	2	2	2	2
16.5	1	2	2	1	45.4	2	1	1	1
16.6	1	2	2	2	45.5	1	1	1	1
17.2	1	2	2	2	46.1	2	1	1	1
17.5	1	2	2	2	46.3	2	1	1	1
17.6	1	2	2	2	46.4	2	1	1	1
17.7	1	2	1	2	47.2	2	1	1	1
17.9	1	2	2	2	47.3	1	1	1	1
19.2	2	2	1	1	47.4	2	2	1	1
21.5	1	2	1	1	47.5	2	1	1	1
23.2	1	2	1	1	47.7	2	1	1	1
24.1	2	2	1	2	47.8	2	1	1	1
24.2	2	1	1	2	47.9	2	1	1	1
24.3	2	2	1	2	50.1	2	1	1	1
24.5	2	2	1	2	50.2	2	1	1	1
26.1	1	1	1	1	51.1	1	2	1	1
26.2	1	1	1	1	51.2	2	2	1	2
26.3	—	1	1	2	51.4	2	2	2	2
26.4	1	1	1	1	52.1	1	1	1	2
26.5	1	1	1	2	53.1	1	1	1	1
27.1	1	1	1	2	55.4	1	2	2	2
27.2	1	1	1	2	57.1	2	2	2	2
27.3	1	2	2	2	57.2	2	2	1	2
27.4	2	2	1	1	58.2	—	2	3	2
29.1	2	2	1	2	59.2	1	2	2	2

Продовження таблиці 3.5									
Номер рослини	<i>Xgwm179-5A</i>	<i>Xcfd156-5B</i>	<i>Xcfd189-5B</i>	<i>Xbarc144-5D</i>	Номер рослини	<i>Xgwm179-5A</i>	<i>Xcfd156-5B</i>	<i>Xcfd189-5B</i>	<i>Xbarc144-5D</i>
29.5	1	2	1	2	60.2	2	1	2	2
29.3	2	2	2	2	66.1	1	2	2	2
30.3	1	2	2	2	70.1	1	1	1	1
30.4	1	2	2	2	70.2	2	1	2	1
30.5	1	2	2	2	71.1	2	1	1	1
32.1	2	1	1	2	71.5	2	1	1	1
32.2	—	2	1	2	71.8	—	1	1	1
32.4	1	2	1	2	72.1	1	1	1	1
32.7	1	2	1	1	72.2	1	1	1	1
32.8	1	2	1	1	72.3	1	1	1	2
34.4	1	2	1	2	72.4	1	2	1	2
35.1	1	2	1	2	72.5	1	1	1	1
35.2	1	2	1	2	75.3	1	2	1	1
35.4	1	2	1	2	80.1	—	2	2	2
36.1	1	2	1	2	80.2	2	2	2	2
36.2	—	2	1	2	80.8	1	2	2	1
36.3	1	2	1	2	89.6	2	2	1	2
36.4	1	2	1	2	90.3	2	2	2	2
36.5	1	1	1	1	90.4	2	2	2	2

Компоненти спектрів, що відрізнялися як від Аврори, так і від Авротіки (позначено в таблиці цифрою «3») зв'язувалися з ДНК деяких ліній при ампліфікації з праймерами лише мікросателітного локуса *Xcfd189-5B* (рис. 3.6). За локусом *Xcfd189-5B* Авротіка має нуль-алель, Аврора має компонент з певною рухливістю. Одні лінії мають нуль-алель (як Авротіка), інші лінії мають

компонент з такою самою рухливістю, як Аврора (лінії 41.2, 8.5, 46.1 та 24.1 на рис.3.6), а решта ліній мають компонент з рухливістю більшою, ніж компонент Аврори, як лінія 3.1 на рис.3.6.

Хромосоми 5 гомеологічної групи можна зобразити, позначивши на них відповідне розташування мікросателітних локусів, за якими ці рослини було проскриновано (локуси, що виявилися поліморфними для Аврора та Авротіка), позначивши відповідним кольором ті мікросателітні локуси, за якими певна рослина має алель, характерний для Аврори, а іншим кольором локуси, які представлені для певної рослини покоління F_4 алелями, що характерні для Авротіки за цим SSR локусом. Іншим кольором (жовтим на рисунку) позначено мікросателітні локуси, за яким певна рослина мала компонент, що не є характерним ні для Аврори, ні для Авротіки (рис. 3.8).

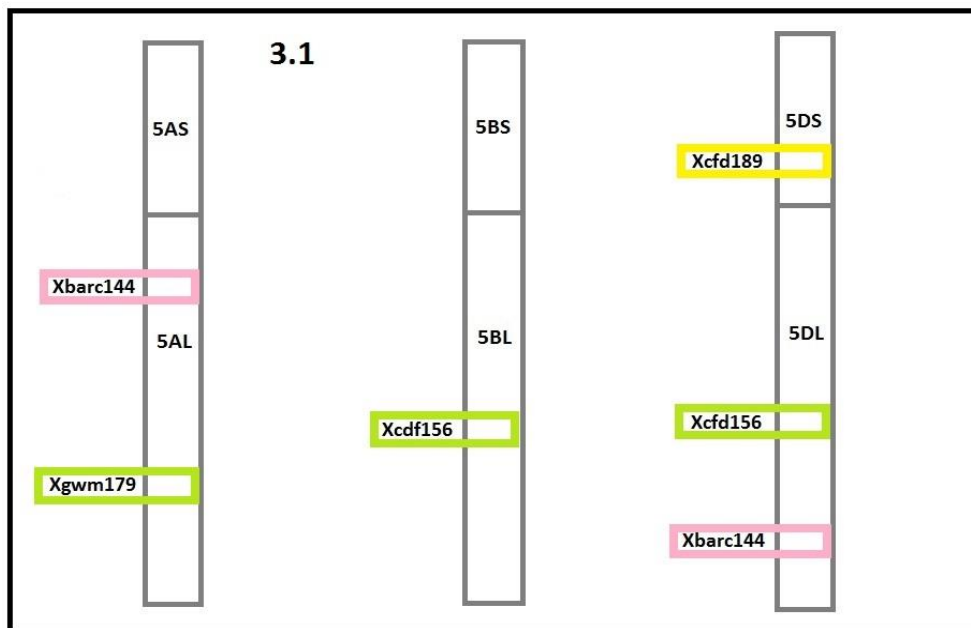
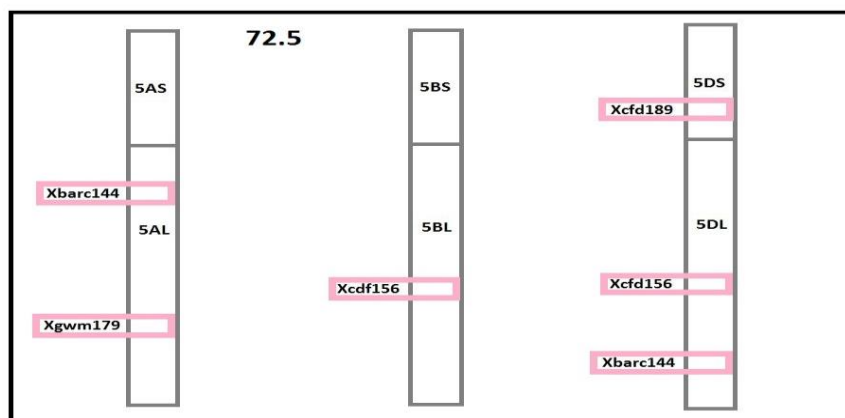
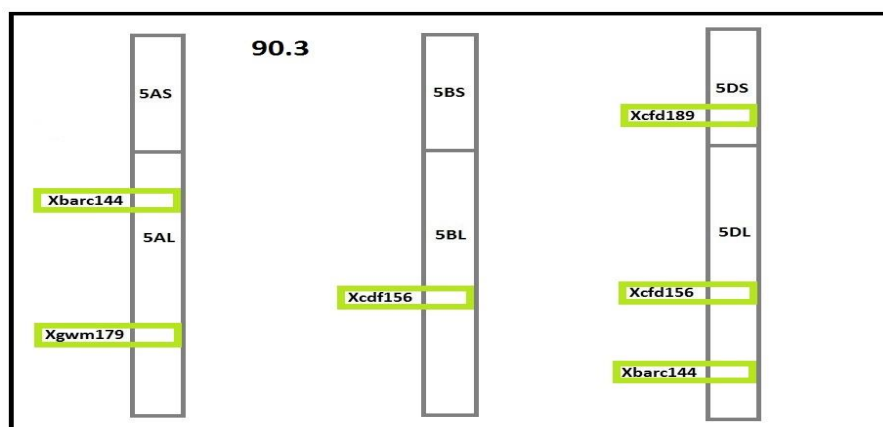


Рис. 3.8. Розташування на хромосомах 5 гомеологічної групи мікросателітних локусів, за якими було досліджено рослини покоління F_4 . 3.1 – номер рослини; рожевим кольором позначено мікросателітні локуси, за якими рослина 3.1 має такий алель, як Аврора; зеленим кольором позначено мікросателітні локуси, за якими лінія 3.1 має такий алель, як Авротіка; жовтим кольором позначено локус, за яким лінія 3.1 має такий алель, що відрізняється від Аврори і від Авротіки (компонент на електрофоретичному спектрі з відмінною рухливістю).

Серед рослин покоління F_4 були такі, що мали за всіма дослідженими мікросателітними локусами такі компоненти (алелі), що характерні для Аврори (рис. 3.9, а), а також такі, що мали за всіма дослідженими локусами такі алелі, як Авротіка (рис. 3.9, б).



(а)



(б)

Рис. 3.9. Мікросателітні локуси, за якими було досліджено рослини покоління F_4 : а – рослина номер 72.5, яка має за всіма дослідженими локусами такі компоненти (алелі), як Аврора (позначені рожевим кольором), б – рослина номер 90.3, яка має за всіма локусами компоненти Авротіки (зелений колір).

Номери рослин покоління F_4 , що за всіма SSR локусами були схожі на Аврору, а також тих, що були за всіма локусами схожі на Авротіку, перераховані в таблиці 3.6. Як видно з цієї таблиці, за дослідженими 4-ма мікросателітними локусами є більше таких рослин покоління F_4 , що мають всі алелі як Аврора, ніж таких, що мають всі алелі як Авротіка. В першому випадку

слід думати, що хромосоми 5-ої гомеологічної групи у даних рослин не перебудовані стосовно аналогічних хромосом сорту Аврору, принаймні в тих своїх частинах, де локалізовані мікросателітні локуси. В другому випадку лінії повторюють гаплотип Авротіки за кожної з трьох хромосом 5-ої гомеологічної групи, що є дивним. Теоретично, зміненою може виявитися хромосома лише 5D, а хромосоми 5A та 5B мають бути ідентичні хромосомам Аврори, адже Авротіка має тетраплоїдний компонент AABV цього сорту. Для більш детального вивчення питання для мікросателітного аналізу хромосом 5-ої гомеологічної групи було обрано значно більшу кількість мікросателітних локусів.

Таблиця 3.6

Рослини F₄, які за всіма дослідженими мікросателітними локусами мають гаплотип одного з компонентів схрещування. У дужках номер рослини F₂, оригінатора рослин F₄

Гаплотип Аврори		Гаплотип Авротіки
8.8 (50)	40.2 (58)	13.4 (57)
26.1 (67)	43.4(58)	29.3 (67)
26.2 (67)	45.5(58)	45.2(58)
26.4 (67)	47.2(58)	51.4(58)
36.5 (64)	53.1(58)	57.1(58)
37.1 (59)	70.1(58)	80.2(58)
37.2 (59)	72.1(58)	90.3 (77)
37.3 (59)	72.2(58)	90.4 (77)
37.4 (59)	72.5(58)	

3.1.6. Порівняння хромосом 5-ї гомеологічної групи Аврори та Авротіки з використанням специфічних до них 102 SSR локусів

Було проаналізовано 102 мікросателітні локуси, які вважаються специфічними до хромосом 5 гомеологічної групи пшениці [201; 187; 86; 118]. Цю частину роботи було виконано під час стажування в Канаді, в Лабораторії

цитогенетики Східного центру досліджень олійних та злакових культур Канадського інституту сільського господарства і продовольства, Оттава, Онтаріо.

Враховуючи локалізацію перевірених мікросателітних локусів у складі довгого чи короткого плеча відповідної хромосоми, було перевірено для короткого плеча 5А хромосоми (5AS) праймери до 18 SSR локусів, до довгого плеча 5А хромосоми (5AL) – 44 пари праймерів, до 5BS – 8, до 5BL – 20, до 5DS – 6, 5DL – 16 (табл 3.7). З таблиці видно, що деякі SSR-локуси специфічні не до однієї, а до двох чи трьох хромосом 5-ої групи.

Продукти ампліфікації було отримано з ДНК Аврори та Авротіки для кожної з 102 перевірених пар праймерів. Виходячи зі специфічності перевірених SSR локусів до кожної з хромосом 5-ї гомеологічної групи пшениці [187; 86; 118] та з геномного складу Авротіки, який впливає з її походження, що схематично зображено на рис. 3.10, ми очікували, що спектри ампліфікації з праймерами, специфічними до хромосом 5А та 5В не повинні відрізнятися для ДНК Аврори та Авротіки, оскільки геномний компонент AABB у цих генотипах має бути один і той самий. А з праймерами, специфічними до хромосоми 5D, суворо кажучи, ДНК Авротіки не повинна утворювати продукти, оскільки замість геному D вона має геном T (див. рис. 3.10). Це припущення було дійсним для 46 локусів специфічних до хромосоми 5А з 62 перевірених, 22 локусів специфічних до хромосоми 5В з 28 перевірених та 2 локусів з 33 для хромосоми 5D. На рис. 3.11 представлено електрофоретичні спектри Аврори і Авротіки за мікросателітними локусами, специфічними до 5А та 5В хромосом, за якими не спостерігалось різниці між Авророю та Авротікою (як і може очікуватися теоретично, оскільки Аврора і Авротіка мають однакові А і В геноми).

Таблиця 3.7

Перевірені SSR локуси, специфічні до хромосом 5 групи пшениці

5AL		5AS	5BL	5BS	5DL
<i>Xbarc186</i>	<i>Xgwm271</i>	<i>Xwmc713</i>	<i>Xgpw7309</i>	<i>Xgpw7180</i>	<i>Xcfd8</i>
<i>Xbarc358</i>	<i>Xbarc142</i>	<i>Xgwm205</i>	<i>Xbarc4</i>	<i>Xgpw4098</i>	<i>Xgpw5098</i>
<i>Xbarc360</i>	<i>Xwmc470</i>	<i>Xgwm154</i>	<i>Xwmc73</i>	<i>Xwmc740</i>	<i>Xgwm182</i>
<i>Xbarc100</i>	<i>Xwmc445</i>	<i>Xwmc654</i>	<i>Xcfa2070</i>	<i>Xgwm540</i>	<i>Xcfd57</i>
<i>Xbarc40</i>	<i>Xcfa2163</i>	<i>Xwmc489</i>	<i>Xgwm335</i>	<i>Xwmc376</i>	<i>Xcfd102</i>
<i>Xbarc1</i>	<i>Xcfa2155</i>	<i>Xcfa2190</i>	<i>Xwmc435</i>	<i>Xgwm544</i>	<i>Xgwm292</i>
<i>Xgwm304</i>	<i>Xwmc110</i>	<i>Xcfa2190</i>	<i>Xgpw7425</i>		<i>Xcfd29</i>
<i>Xgpw7007</i>	<i>Xgwm126</i>	<i>Xbarc197</i>	<i>Xgwm371</i>	5DS	<i>Xcfd183</i>
<i>X barc165</i>	<i>Xgwm179</i>	<i>Xwmc752</i>	<i>Xwmc537</i>	<i>Xwmc233</i>	<i>Xwmc765</i>
<i>Xwmc446</i>	<i>Xgpw2273</i>	<i>Xgwm129</i>	<i>Xcfd7</i>	<i>Xcfd18</i>	<i>Xgwm272</i>
<i>Xbarc141</i>	<i>Xcfd39</i>	<i>Xcfa2250</i>	<i>Xwmc99</i>	<i>Xgwm190</i>	<i>Xwmc443</i>
<i>Xgwm186</i>	<i>Xwmc524</i>	<i>Xwmc150</i>	<i>Xwmc160</i>	<i>Xcfd189</i>	<i>Xgwm654</i>
<i>Xbarc330</i>	<i>Xwmc727</i>	<i>Xcfd40</i>	<i>Xwmc508</i>		
<i>Xgwm156</i>	<i>Xcfa2149</i>	<i>Xbarc117</i>	<i>Xwmc783</i>		
<i>Xwmc371</i>	<i>Xgwm291</i>	<i>Xwmc805</i>	<i>Xgwm497</i>		
<i>Xcfd2</i>	<i>Xgwm6</i>		<i>Xwmc25-8</i>		
<i>Xbarc151</i>	<i>Xcfd47</i>				
<i>Xwmc388</i>	<i>Xwmc74</i>				
<i>Xcfd12</i>					
Специфічні для двох хромосом			Специфічні для трьох хромосом		
<i>Xgpw2243</i> (A,B)		<i>Xcfa2185</i> (A,D)	<i>Xgwm293</i> (A,B,D)		
<i>Xwmc415</i> (A,B)		<i>Xbarc316</i> (A,D)	<i>Xbarc232</i> (A,B,D)		
<i>Xgwm443</i> (A,B)		<i>Xcfa2104</i> (A,D)	<i>Xgdm68</i> (A,B,D)		
<i>Xcfa2141</i> (A,D)		<i>Xwmc289</i> (B,D)			

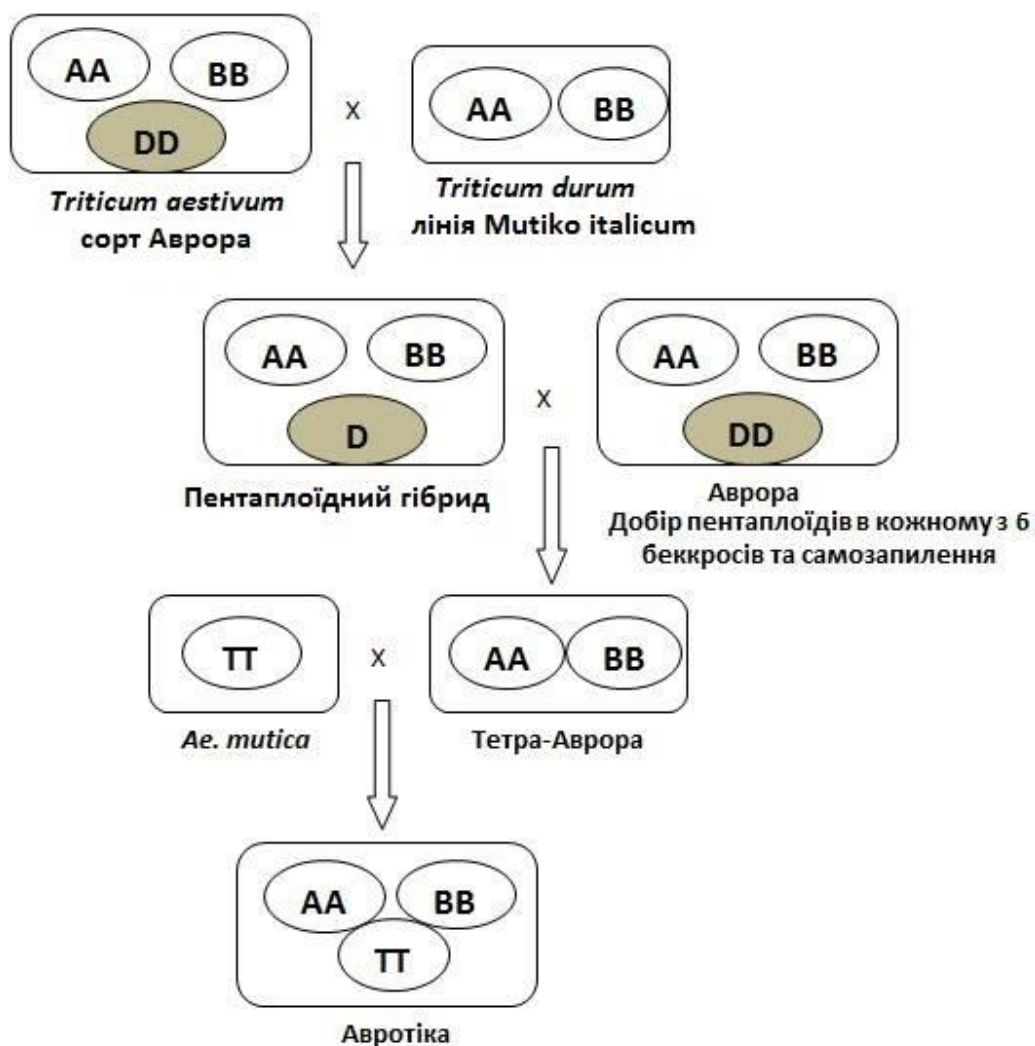


Рис. 3.10. Схема створення геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка та його очікуваний геномний склад. Схему складено за інформацією [7].

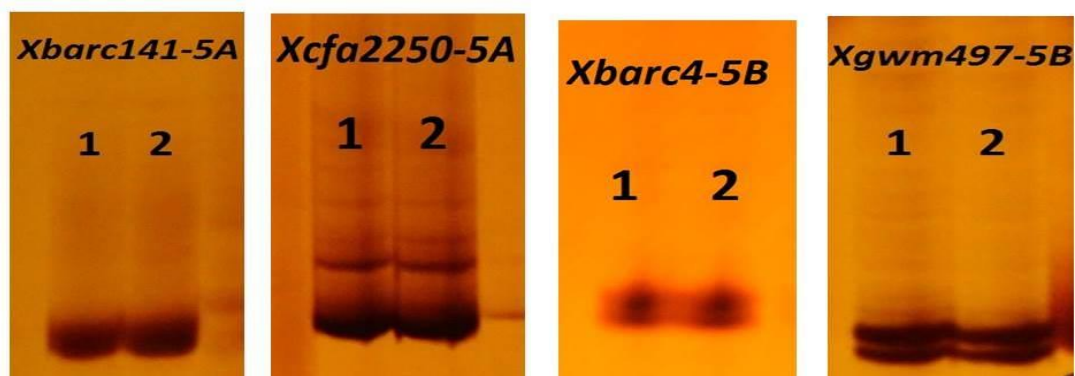


Рис. 3.11. Електрофоретичні спектри ампліфікації ДНК Аврори і Авротіки з праймерами до мікросателітних локусів, специфічних до 5А та 5В хромосом, за якими не спостерігалось різниці між Аворою (1) та Авротікою (2).

Щодо відхилення від очікування, що з праймерами до мікросателітних локусів, специфічних до 5D хромосоми пшениці, не мало б спостерігатися продукту ампліфікації з ДНК Авротіка, то таке відхилення досить легко пояснити. По-перше, хромосоми D та T геномів, відповідно до даних літератури, можуть кон'югувати майже регулярно [104; 157]. Отже, рівень гомології в них може бути достатнім, щоб пояснити, що мікросателітні локуси, ідентифіковані як специфічні до геному D, виявляються наявними в геномі T також. Гомологія між вказаними геномами (T і D) підтверджується і в нашій роботі: гібриди F₂ були самофертильними, чого ніколи не спостерігалось раніше для гібридів від схрещування інших геномно-заміщених амфідиплоїдів, в яких хромосоми третього субгеному не кон'югували з хромосомами D геному пшениці [7].

По-друге, існує добре відоме явище перенесення специфічності мікросателітних локусів між хромосомами в межах однієї і тої самої гомеологічної групи *Triticinae* [175; 189; 89; 90; 130]. Перенесення специфічності підтверджується і на нашому рослинному матеріалі: вісім пар праймерів із 102 вивчених специфічні до двох хромосом 5-ої гомологічної групи із трьох, а 3 пари – для всіх трьох. За нашими результатами, для хромосом D і T рівень перенесення специфічності виявляється більш високим, ніж між субгеномом D та іншими субгеномами пшениці. Це можна розглядати як певний доказ гомології між хромосомами D та T геномів, тим більш, що вони кон'югують [7; 104], отже дійсно мають високий рівень гомології.

Приклади різних типів відмінностей між Аворою і Авротікою можна побачити на рис. 3.12: за деякими мікросателітними локусами Авротіка має зайвий компонент (додатковий до того, що присутній у Аврора), а за іншими локусами у Авротіки не вистачає певного компоненту, порівняно зі спектром Аврори). Ще одним типом відмінностей у спектрах Аврори і Авротіки є такий випадок, коли Аврора і Авротіка просто мають компоненти з різною електрофоретичною рухливістю, Авротіка не має такого компоненту, як Аврора, але має інший (з іншою рухливістю), а Аврора не має такого

компоненту, як Авротіка (див. рис. 3.13). Інформацію по всіх мікросателітних локусах, інформативних в цьому дослідженні, узагальнено на рисунку 3.14.

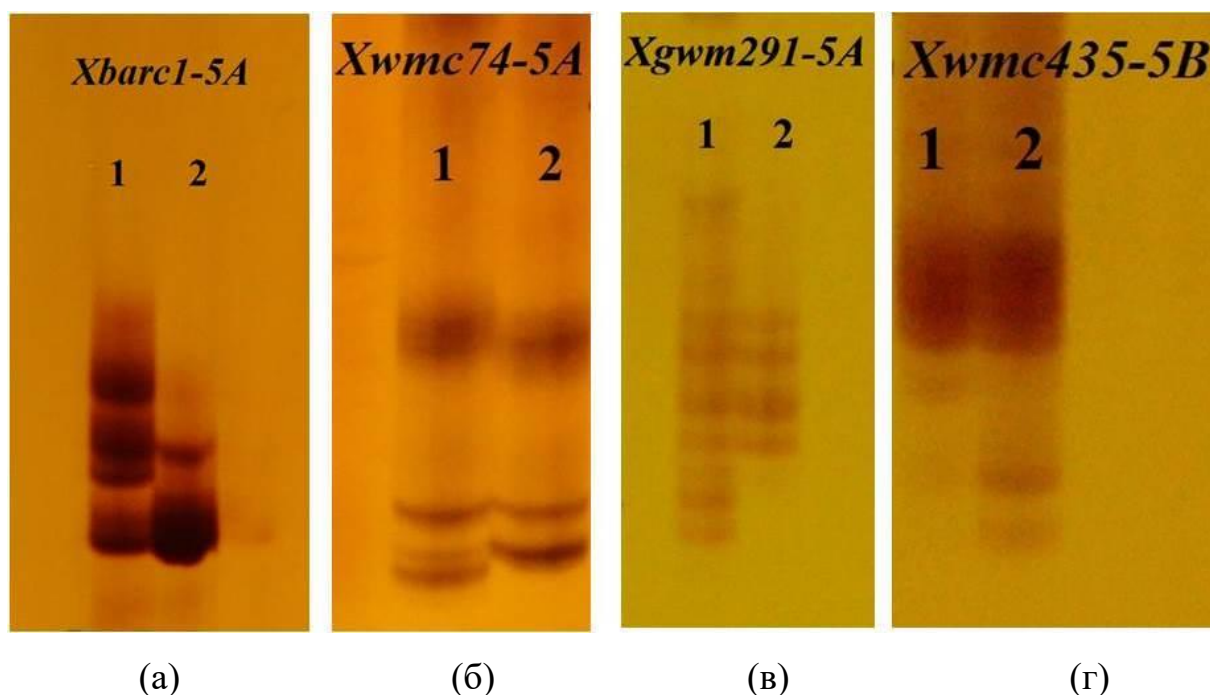


Рис. 3.12. Електрофоретичні спектри Аврори (1) та Авротіки (2) за мікросателітними локусами: *Xbarc1-5A*, *Xwmc74-5A*, *Xgwm291-5A*, *Xwmc-5B*. У спектрі Авротіки не вистачає компоненту, порівняно зі спектром Аврори – а, б, в; у спектрі Авротіки є зайвий компонент, порівняно зі спектром Аврори - г.

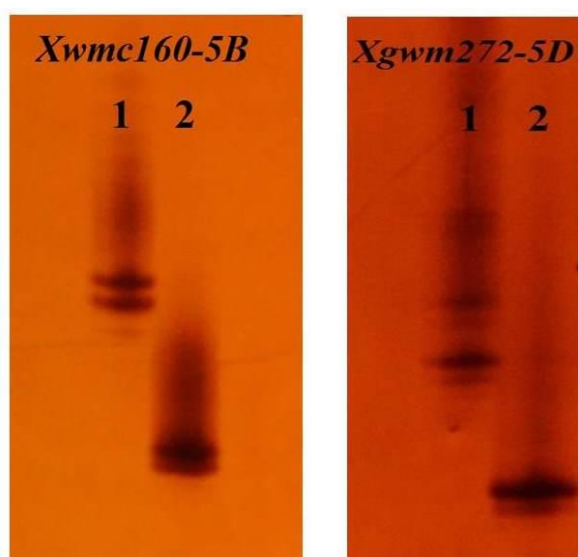


Рис. 3.13. Електрофоретичні спектри Аврори (1) та Авротіки (2) за мікросателітними локусами *Xwmc160-5B* та *Xgwm272-5D*, за якими Аврора та Авротіка мають компоненти з різною рухливістю.

Через спільну специфічність SSR-локусів для кількох хромосом 5-ї групи, в тому числі 5Т, ДНК Аврори та Авротіки може продукувати однакові спектри ампліконів з праймерами локусів, специфічних до трьох хромосом або для двох, одна з яких є хромосома 5D. Але спектри будуть різними, якщо SSR-локуси геному Т мають інший алель, отже у спектрі ДНК Авротіки з'явиться специфічний для неї компонент (рис. 3.12, 3.13). Саме так було для локусів *Xcfa2141* (5A/5D), *Xwmc289*(B,D), *Xgdm68*(5A/5B/5D) та *Xgwm293*(A,B,D). Якщо праймери локусів *Xwmc233*, *Xcfd18*, *Xcfd8*, *Xgpw5098*, *Xgwm292*, *Xcfd29*, *Xcfd183*, *Xwmc765*, *Xwmc443*, *Xgwm654* дають однаковий спектр з ДНК Аврори та Авротіки, це показує, що вказані локуси є специфічними не лише для D-генома, а і для Т-генома також, і алелі цих локусів однакові. Те саме стосується локусів *Xcfa2104*(A,D), *Xcfa2185*(A,D), *Xbarc316*(A,D), *Xbarc232*(A,B,D). Тому 14 перелічених SSR-локусів з 24, специфічних для хромосоми 5D (10 локусів) або для двох-трьох хромосом 5-ої групи, в тому числі для D (чотири локуси), не мають значення для ідентифікації інтрогресій D/Т. Жоден з них не дає можливості розрізнити ці хромосоми у геномі інтрогресивної лінії. Для цього можуть бути використані 9 локусів: *Xcfd189*, *Xcfd102*, *Xgwm190*, *Xgwm272*, *Xgwm182*, *Xcfa2141* (5A/5D) *Xgdm68*(A,B,D), *Xgwm293*(A,B,D) *Xwmc289*(B,D). На отриманих з відповідними праймерами спектрах ДНК Авротіка характеризується специфічним ампліконом. Те, що чотири з них дають продукт з геномами А та В, теоретично можна ігнорувати, оскільки за цією частиною генома Аврора та Авротіка мають бути однаковими і відмінності між цими спектрами слід пов'язувати з наявністю різних алелів згаданих мікросателітів в геномах D та Т. Локус *Xcfd57* не продукує амплікону з ДНК Авротіки, що дає змогу припустити відсутність (або перебудову) відповідної ділянки хромосом 5D. Але для 5Т-хромосоми цей локус не інформативний, оскільки не засвідчує наявності ДНК геному Т.

Щодо хромосом 5А та 5В, то за 12 локусами хромосоми 5А (32% від вивчених) та 3 локусами хромосоми 5В (14% вивчених) спостерігається різниця у спектрах ампліконів ДНК Аврори та Авротіки, хоча геноми АВ в них мають

бути однакові, зважаючи на походження Авротіки. Тут враховуються локуси, специфічні лише до одної, вказаної, хромосоми. Для локусів специфічних ще і до хромосоми 5D (*Xgdm68*(A,B,D), *Xgwm293*(A,B,D), *Xcfa2104*(A,D) та *Xwmc289* (B,D)), відмінність спектрів Аврори і Авротіки може виникати, якщо специфічність локусів для хромосоми 5D розповсюджується і на хромосом 5T. За локусами *Xwmc752*, *Xwmc150*, *Xcfd40*, *Xbarc117*, *Xwmc805*, *Xbarc1*, *Xgwm186*, *Xbarc142*, *Xgwm179*, *Xcfd39*, *Xgwm291*, *Xcfd47* (хромосома 5A) та *Xgwm544*, *Xcfd7*, *Xwmc160* (хромосома 5B) зареєстровані нами розбіжності в ампліконах Аврори та Авротіки можуть бути викликані будь-яким з трьох чинників. По-перше, під час виділення тетракомпоненту AABV із геному AABVDD м'якої пшениці, яке відбувалося через схрещування сорту Аврора з твердою пшеницею та шестикратним беккросуванням з Аворою пентаплоїдних гібридів попереднього покоління, звичайно відбувалася рекомбінація між хромосомами A та B геномів м'якої і твердої пшениці [6]. Через це ідентичність тетра-Аврори та Аврори за геномами AB могла дещо втратитися. По-друге, інформацію про перенесення специфічності задіяних у дослідженні мікросателітних локусів між хромосомами в межах однієї гомологічної групи було отримано не на Аврорі, а на інших генотипах [201; 187; 118; 86]. Можливо, що в геномі Аврори вказані локуси є специфічними не для однієї хромосоми 5-ої групи, а і для хромосоми 5D. Не можна виключити, що специфічність розповсюджується і на хромосому 5T Авротіки. По-третє, протягом останнього десятиріччя багатьма роботами, в тому числі на *Triticinae*, доведено, що процес амфідиплоїдації (Авротіка пройшла етап амфідиплоїдації) супроводжується численними і, можливо, спрямованими змінами у геномі [202; 134; 69], в тому числі зміни відбуваються у мікросателітних локусах [230]. Ми не аналізували гібридні рослини за локусами, специфічними лише для хромосоми 5A або 5B через те, що очікували заміщення/рекомбінацію за участю лише хромосоми 5D, оскільки в метафазі 1МКП гібрида Авротіка x Аврора мультивалентів не спостерігалось, а факт кон'югації між вказаними хромосомами встановлений.

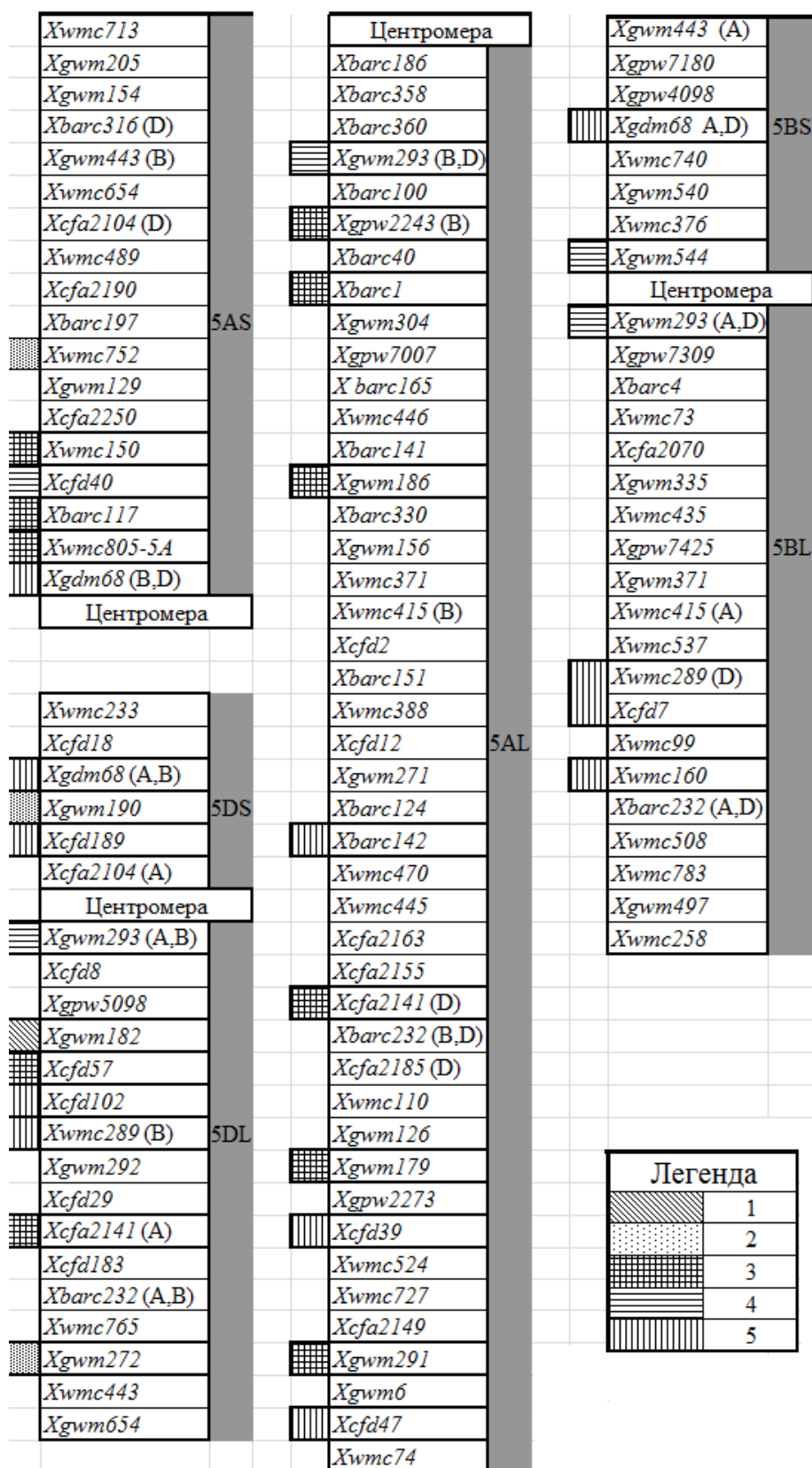


Рис. 3.14. Локалізація на хромосомах 5-ї гомеологічної групи пшениці мікросателітних локусів, інформативних для нашого дослідження, та порівняльна характеристика спектрів ДНК Аврори та Авротіки. 1 – спектр

Аврори не має компонентів, спектр Авротіки компонент має; 2 – спектр Авротіки має зайвий амплікон, одночасно не вистачає одного з двох, властивих спектру ДНК Аврори; 3 – в спектрі Авротіки не вистачає одного з компонентів, властивих спектру Аврори; 4 – у спектрі Аврори є компонент, додатковий до компонентів спектру Аврори; 5 – у спектрі Авротіки більше одного компоненту з іншою рухливістю, ніж у спектрі Аврори.

Отже, порівняльний мікросателітний аналіз генотипів м'якої пшениці (AABBDD) та отриманого через об'єднання її тетраплоїдного компонента AABB та геному TT *Ae. mutica* геномно-заміщеного амфідиплоїда із застосуванням праймерів до мікросателітних локусів, картованих на хромосомах А, В та D геномів, підтвердив можливість використання деяких SSR-локусів для ідентифікації в геномі амфідиплоїда хроматину 5-ої хромосом іншого геному (Т). Із 102 вивчених локусів, специфічних для трьох хромосом 5-ої гомологічної групи, виявлено 9, які мають діагностичну цінність для ідентифікації хроматину хромосоми 5Т за умов наявності у геномі інших хромосом тієї самої гомологічної групи: *Xcfd189*, *Xcfd102*, *Xgwm190*, *Xgwm272*, *Xgwm182*, *Xcfa2141* (5A/5D) *Xgdm68*(A,B,D), *Xgwm293*(A,B,D) *Xwmc289*(B,D). Діагностична значущість полягає у наявності у спектрі Авротіки ампліконів, що утворюються з праймерами вказаних локусів, компонентів, які помітно відрізняються за рухливістю від ампліконів, що утворюються з ДНК Аврори. Локуси *Xcfd57* та *Xcfa2141* мають обмежене значення для вивчення інтрогресивних ліній Авротіка/Аврора через відсутність амплікону, що специфічно утворюється з ДНК хромосоми 5Т. Крім того, 12 SSR-локусів з 22, локалізованих на хромосомі 5D, матимуть обмежене значення для ідентифікації інтрогресій D/Т у сполученні з іншими хромосомно-специфічними молекулярно-генетичними маркерами.

3.1.7. Мікросателітний аналіз рослин покоління F₅. Для скринування 234 42-хромосомних рослин F₅ від схрещування Авротіка х Аврора залучили сім SSR-локусів, що мають діагностичне значення для виявлення заміни

мікросателітного локусу, властивого хромосомі 5D на такий локус, властивий хромосомі 5T (рис. 3.15).

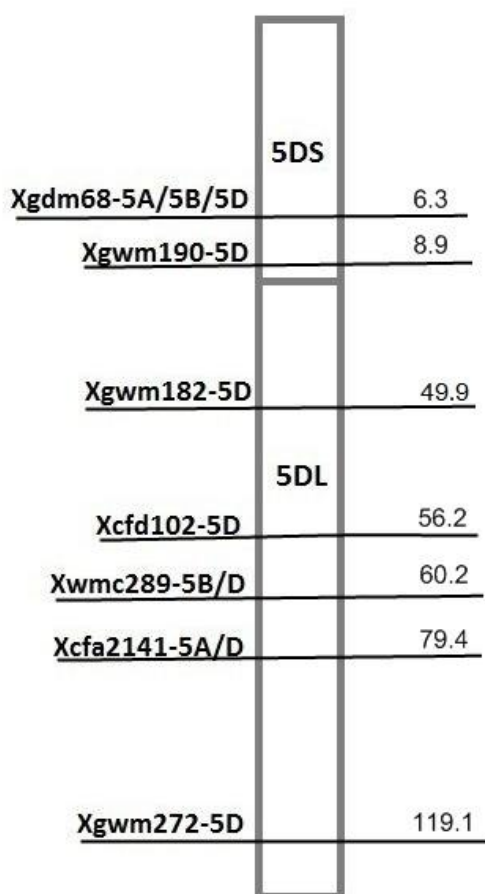
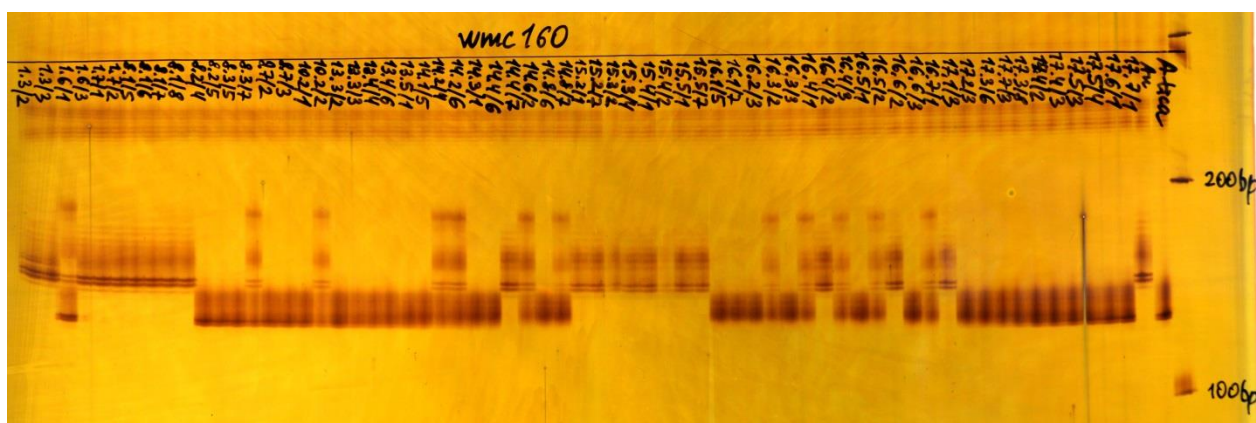


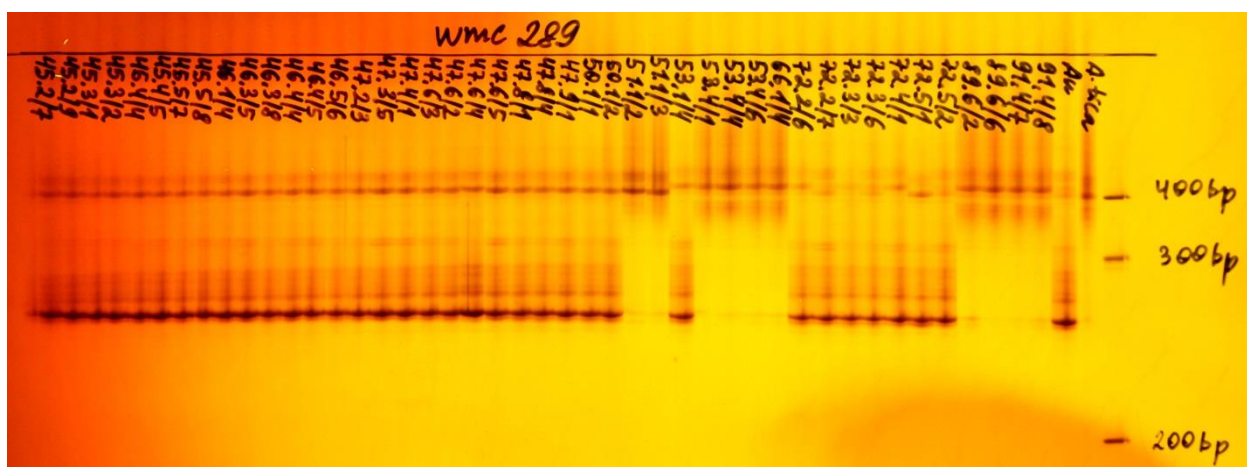
Рис. 3.15. Локалізація досліджених мікросателітних локусів на 5D хромосомі, відстань від дистального кінця короткого плеча показана в одиницях карти [187; 86; 118].

У спектрах рослин F_5 виявляли компоненти, характерні для Авротіки, для Аврори, а також компоненти відмінні як від спектру Аврори, так і від спектру Авротіки. Причому за певними локусами таких «відмінних» компонентів було кілька типів (з різною електрофоретичною рухливістю).

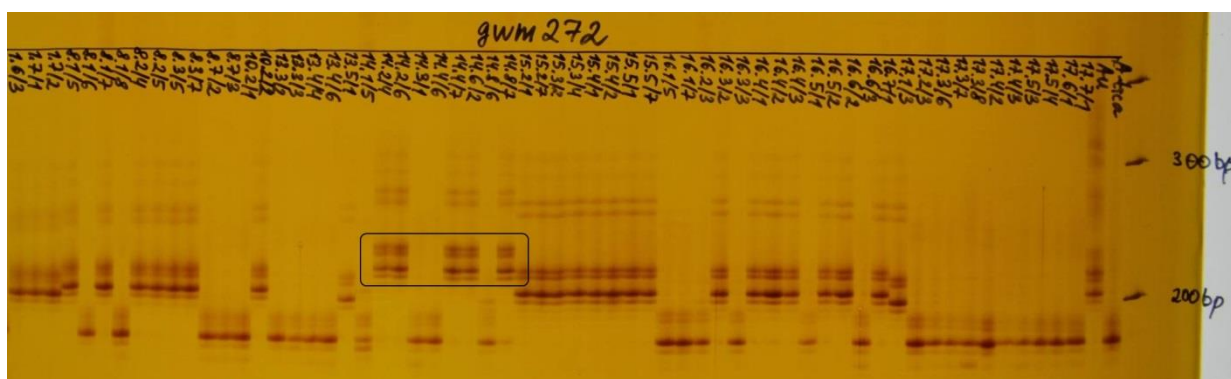
На рисунку 3.16 наведені приклади електрофоретичних спектрів рослин покоління F_5 , і можна бачити, що спектри певних рослин такі, як у Аврори, а інших – такі як у Авротіки.



(a)



(б)



(в)

Рис. 3.16. Електрофоретичні спектри рослин покоління F_5 за мікросателітними локусами *Xwmc160-5D* (а), *Xwmc289-5B(D)* (б) та *Xgwm272-5D*. Можна бачити, що за локусом *Xgwm272-5D* певні рослини F_5 (зокрема 14.2/4, 14.2/6, 14.4/7, 14.8/7) мають компонент з рухливістю відмінною як від Аврори (Au), так і від Авротіки (A-tica), одну групу таких компонентів на рисунку виділено рамкою.

Тепер якщо різним кольором виділити різні алелі (як це було показано для покоління F_4 у підрозділі 1.3.5), то можна побачити, як на хромосомах рослин покоління F_5 розміщуються алелі від Авротіки, від Аврори, а також інші (відмінні від обох батьківських форм, див. рис. 3.17). Це дозволить припустити наявність заміщеної хромосоми, заміну одного плеча, або наявність «мозаїчних» (рекомбінантних) хромосом.

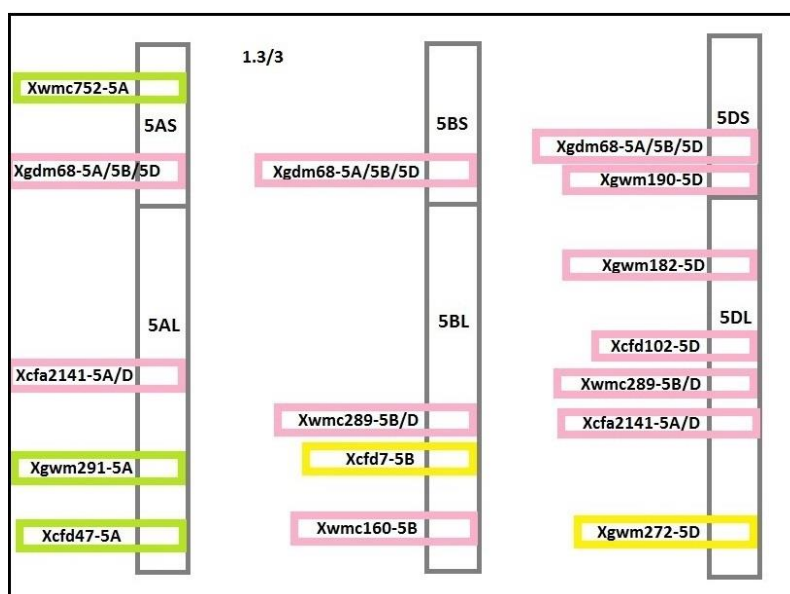


Рис. 3.17. Розташування на хромосомах 5 гомеологічної групи мікросателітних локусів, за якими було досліджено рослини покоління F_5 . 1.3/3 – номер рослини; рожевим кольором позначено мікросателітні локуси, за якими рослина 1.3/3 має такий алель, як Аврора; зеленим кольором позначено мікросателітні локуси, за якими лінія 1.3/3 має такий алель, як Авротіка; жовтим кольором позначено локус, за яким лінія 1.3/3 має такий алель, що відрізняється від Аврори і від Авротіки (продукти ампліфікації з іншою масою).

У спектрі деяких рослин за певними мікросателітними локусами з'являлися такі «нові», відмінні як від Аврори, так і від Авротіки. Поява цих нових алелів у мікросателітних локусах може бути пояснена мутаціями, частота виникнення яких є підвищеною в регіонах геному з повторами (такими є мікросателітні локуси).

Отже, аналіз рослин F_5 за 7 обраними мікросателітними локусами, які присутні як на короткому, так і на довгому плечах хромосоми 5D, виявив рослини, у яких хромосома 5D, як передбачається за отриманими результатами, не має інтрогресій (фрагментів хромосом Т геному), оскільки всі досліджені SSR локуси мають алелі, характерні для Аврори (позначені рожевим кольором на рисунку 3.18, (а)).

Інші рослини F_5 мали, за нашими результатами, заміщення (дисомне заміщення) хромосоми 5D (або інших хромосом 5-ї гомеологічної групи) на хромосому 5T, оскільки за всіма дослідженими SSR локусами на цій хромосомі вони мали алелі, характерні для Авротіки (походять з геному Т), приклад на рисунку 3.18 (б).

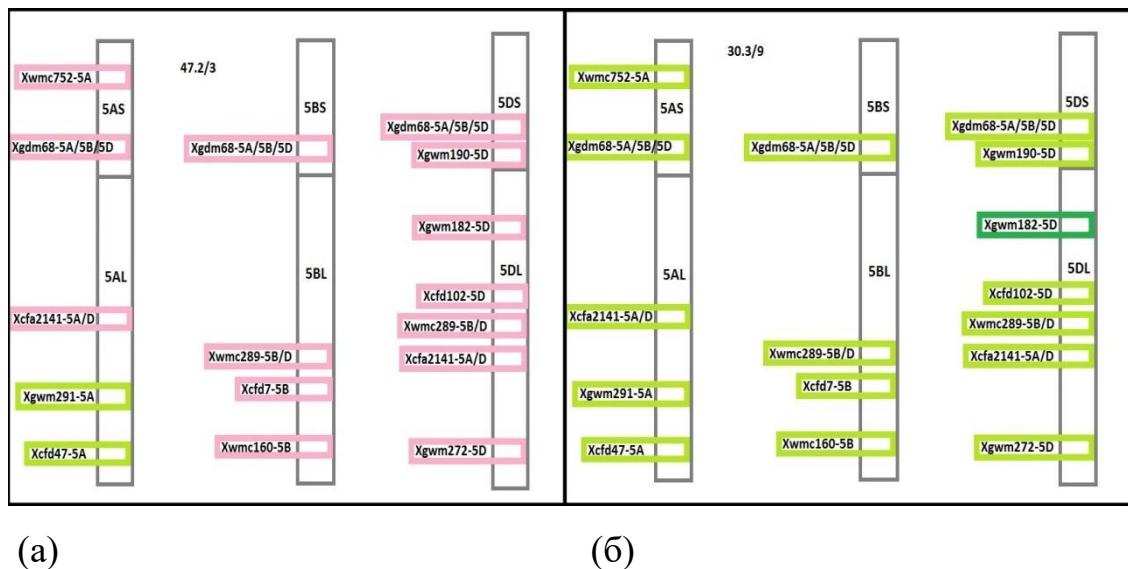


Рис. 3.18. Схематичне зображення хромосом рослин покоління F_5 , на яких показано розташування досліджених мікросателітних локусів та кольором показано алель, характерний для Аврори (рожевий колір), або для Авротіки (зелений колір). (а) Рослина номер 47.2/3 можливо (принаймні за результатами проведеного мікросателітного аналізу) має хромосоми 5B та 5D пшениці без змін, а у складі довгого плеча хромосоми 5A – можливо присутня транслокація від 5T хромосоми. (б) Рослина номер 30.3/9 має за всіма дослідженими SSR локусами, специфічними до 5 гомеологічної групи хромосом, алелі, характерні для амфідиплоїда Авротіка, що може вказувати на присутність хромосомних

заміщень (темно-зеленим кольором позначено нуль-алель, що також характерно для Авротіки).

Дуже часто (хоча були і виключення) однакову картину щодо наявності у хромосомах алелів від Аврори та від Авротіки (а також наявності «нових» компонентів спектру) мали рослини покоління F_5 , що мають спільне походження (нащадки однієї рослини покоління F_4), що відображається в їхньому номері, наприклад: 32.8/3, 32.8/4 – походять від однієї рослини покоління F_4 – 32.8 (див. рис. 3.19).

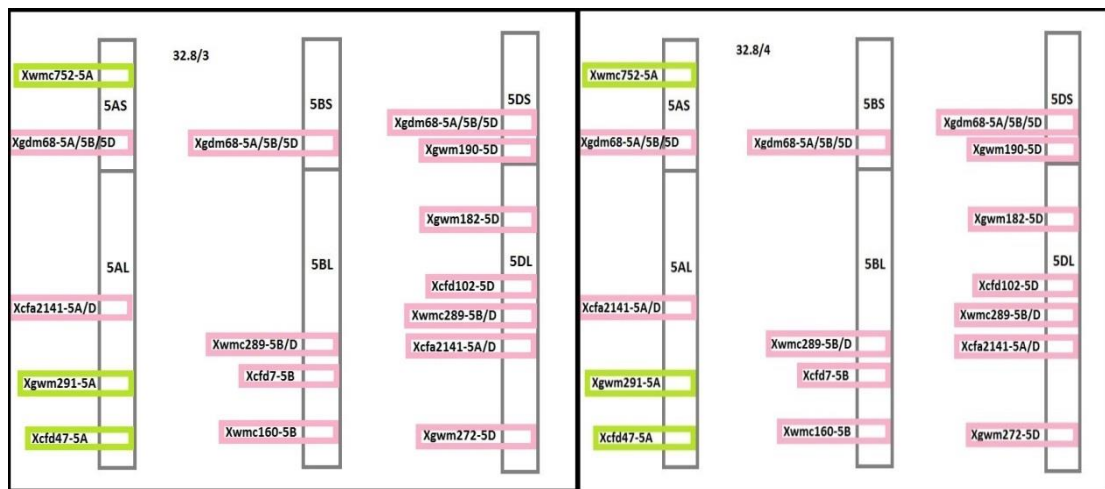
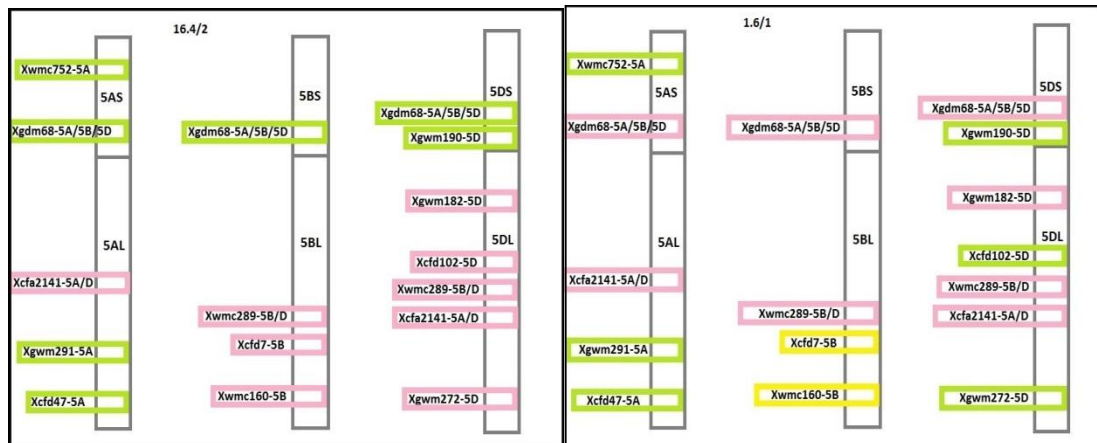


Рис. 3.19. Схематичне зображення хромосом 5-ї гомеологічної групи рослин 32.8/3, 32.8/4, що походять від однієї рослини 32.8, і мають однакове розташування на хромосомах алелів SSR локусів, характерних для Аврори, та для Авротіки. Можлива присутність транслокацій в дистальних частинах 5A хромосоми.

Було також ідентифіковано багато рекомбінантних хромосом 5D/5T. Деякі з них імовірно (за нашими результатами), мали заміщення одного плеча хромосоми 5D – довгого, чи короткого, на відповідне плече хромосоми 5T (рис. 3.20, (а)). Інші рослини можливо (відповідно до отриманих результатів) мали рекомбінантні хромосоми навіть з більш дрібними перебудовами – частини хромосоми 5D перемежуються з частинами хромосоми 5T (відповідні алелі – як у Аврори, чи як у Авротіки – за дослідженими SSR локусами). Це видно на рисунку 3.20 (б), де алелі, характерні для Аврори, позначені рожевим кольором, алелі, характерні для Авротіки, позначені світло-зеленим кольором.



(а)

(б)

Рис. 3.20. Схематичне зображення хромосом 5-ї гомеологічної групи рослин покоління F_5 . (а) Рослина 16.4/2 – можливо має довгі плечі хромосом 5B та 5D Аврори, а коротке плече цих хромосом заміщене генетичним матеріалом 5T хромосоми (або присутні транслокації). (б) Рослина 1.6/1 – має рекомбінантну («мозаїчну») хромосому 5D – алелі досліджених мікросателітних локусів від Аврори (рожевий колір) перемежуються алелями, характерними для Авротіки (зелений колір). У складі хромосоми довгого плеча хромосоми 5B присутні «нові» алелі, не характерні для батьківських форм (позначені жовтим кольором).

Рекомбінація могла відбутися у будь-якому поколінні, починаючи з F_2 . У формуванні кожної наступної гібридної генерації з попередньої брали участь лише фертильні рослини, тому розмах варіювання за кількістю хромосом неухильно звужувався і до F_5 дійшли нащадки лише 11 рослин з 98 вихідних рослин F_2 , а серед рослин F_5 для роботи було відібрано лише 42-хромосомні. Від F_2 до F_5 фертильними виявлялися рослини, кількості хромосом в яких коливалися близько 42, отже, вони формувалися з гамет з майже нормальним хромосомним складом. Тому можна думати, що серед тих 11 рослин F_2 , що їхніх нащадків F_5 ми тепер аналізуємо, $\frac{3}{4}$ рослин мали принаймні одну хромосому 5T (8 рослин з 11), $\frac{1}{4}$ могла бути сформована за участю лише 5D хромосом (3 рослини з 11). Порівняння спектрів ампліконів ДНК рослин F_5 показало, що фактично хромосому 5T містили у геномі десять рослин F_2 , чиїх нащадків F_5 ми аналізували за допомогою мікросателітів. Це не суперечить

очікуваній кількості (за двобічним точним критерієм Фішера, $P=0,589$). Результати мікросателітного аналізу ми наводимо лише для рослин, які пішли від рослин F_2 з хромосомою 5T (табл. 3.8).

Якщо хромосоми 5D та 5T кон'югують, між ними може відбуватися рекомбінація, і серед нащадків наступних поколінь мають бути не лише такі, що несуть інтактну хромосому 5T, а і рослини з рекомбінантною хромосомою 5D/5T. Рекомбінація могла відбуватися при формуванні гамет як гібридами F_1 , так і кожної наступної генерації. Зміст таблиці 3.8 дає можливість висловити припущення про рослини F_2 – F_4 щодо хромосоми 5T: чи були вони моно- чи дисомно заміщеними 5D/5T. Крім того, з таблиці легко виявляються рослини з рекомбінантними хромосомами 5D/5T. Про наявність у рослини F_2 пари нерекомбінантних хромосом 5T може свідчити лише повторення такого хромосомного складу у поколінні F_5 , отже і у всіх проміжних генераціях, які ми не аналізували. Такою рослиною, зважаючи на нащадків, була тільки рослина F_2 № 57 (табл. 3.8). Хоча вона могла мати і іншу структуру, просто за нащадками, які збереглися, це не можна встановити. Інші 9 рослин обов'язково мали або дві інтактні хромосоми, 5D та 5T, або одна з них чи обидві разом були рекомбінантні і включали алелі мікросателітних локусів, властивих обох хромосомам. Відрізнити ці випадки за нашими результатами не можна: якщо рослина F_2 мала дві інтактні хромосоми 5D та 5T, рекомбінація між ними з утворенням рекомбінантної хромосоми могла відбуватися при формуванні гамет будь-якої наступної генерації, а ми вивчали лише F_5 . Серед рослин F_3 потенційно могли мати хоча б одну нерекомбінантну хромосому 5T лише № 5.2, № 10.4, №11.2, № 12.4, № 12.6 та № 14.1 (табл. 3.8). При цьому рослина № 10.4 могла мати дисомне хромосомне заміщення 5D/5T, тому що всі її перевірені нащадки F_5 характеризуються саме такою структурою. П'ять інших рослин F_3 , схоже, мали одну інтактну хромосому 5T та перебудовану з незначним (рослини 11.2, 12.6, 14.1) чи значним (рослина 5.2) включенням фрагментів хромосоми 5D. Серед нащадків перелічених рослин F_3 у F_5 через

Таблиця 3.8

Результати мікросателітного аналізу рослин F₅ за хромосомами 5D та 5T

Покоління				Мікросателітні локуси ¹⁾						
F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	1	2	3	4	5	6	7
18	3.1	1.3	2	D ²⁾	D	D	D	D	D	N
			3	D	D	D	D	D	D	N
		1.6	1	D	T	D	T	D	D	T
			3	D	D	D	D	D	D	N
		1.7	1	D	D	D	D	D	D	N
			2	D	D	D	D	D	D	N
50	5.2	8.1	5	D	D	D	D	D	D	D
			6	D	D	D	D	D	D	T
			7	D	D	D	D	D	D	D
			8	D	D	D	D	D	D	T
		8.2	4	T	T	T	T	T	T	D
			5	T	T	T	T	T	T	D
		8.3	5	T	T	T	T	T	T	D
			7	T	D	D	D	D	D	D
		8.7	2	T	T	T	T	T	T	T
			3	T	T	T	T	T	T	T
55	7.1	10.2	1	T	T	T	T	T	N	T
			2	D	D	D	D	D	D	D
57	10.4	13.3	2	T	T	T	T	T	T	T
			3	T	T	T	T	T	T	T
		13.4	4	T	T	T	T	T	T	T
			6	T	T	T	T	T	T	T
66	11.2	14.1	5	T	D	T	T	T	D	G
		14.2	4	D	D	D	D	D	D	N2
			6	D	D	D	D	D	D	N2
		14.3	1	T	T	T	T	T	T	T
		14.6	2	T	T	T	T	T	T	N2
		14.4	6	T	D	T	T	T	T	T
			7	T	T	T	T	T	T	N2
		14.8	6	T	D	T	T	T	T	T
			7	T	T	T	T	T	T	N
65	12.1	15.2	1	T	T	D	D	D	D	D
			7	T	T	T	T	T	D	D
		15.3	2	T	T	T	T	T	D	D

Продовження таблиці 3.8											
Покоління				Мікросателітні локуси ¹⁾							
F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	1	2	3	4	5	6	7	
65	12.1	15.3	4	T	T	T	T	T	D	D	
		15.4	1	T	T	D	D	D	D	D	
			2	T	T	T	T	T	D	D	
		15.5	1	T	T	D	D	D	D	D	
			7	T	T	D	D	D	D	D	
		12.4	16.1	5	T	T	T	T	T	T	T
	7			T	T	T	T	T	T	T	
	16.2		3	T	T	T	T	T	T	T	
	16.3		2	T	T	D	D	D	D	D	
			3	T	T	T	T	T	T	T	
	16.4		1	T	T	D	D	D	D	D	
			2	T	T	D	D	D	D	D	
			3	T	T	D	D	D	D	D	
	16.5		1	T	T	T	T	T	T	T	
			2	T	T	D	D	D	D	D	
	16.6		2	T	T	D	D	D	D	D	
			3	T	T	T	T	T	T	T	
	16.7		1	D	G	D	D	D	D	D	
	12.6		17.2	3	T	T	T	T	T	T	T
			17.3	6	T	T	D	T	T	T	T
				7	T	T	T	T	T	T	T
		8		T	T	T	T	N	T	T	
		17.4	2	T	T	T	T	T	T	T	
			3	T	T	D	T	T	T	T	
		17.5	3	T	T	T	T	D	T	T	
			4	T	T	T	T	T	T	T	
		17.6	1	T	T	T	T	T	T	T	
		17.7	1	T	T	T	T	T	T	T	
			3	T	T	T	T	T	T	T	
		17.8	3	D	T	T	D	T	T	T	
		17.9	2	T	T	D	T	T	T	T	
			5	T	T	T	T	T	T	T	

Продовження таблиці 3.8										
Покоління				Мікросателітні локуси ¹⁾						
67 F ₂	13.1	19.2	1	D	N	T	T	T	T	D
	13.3	21.1	5	T	D	D	T	T	D	D
			9	T	D	T	T	T	D	D
	F ₃	F ₄	F ₅	1	2	3	4	5	6	7
67	13.3	21.3	2	D	N	D	G	D	D	D
			3	D	N	D	G	D	D	D
		21.4	8	D	N	D	D	D	D	D
			9	D	N	D	D	D	D	D
		21.5	3	D	N	D	D	D	D	D
			4	D	N	D	D	D	D	D
	13.5	23.1	3	D	N	D	D	D	D	D
			4	D	N	D	D	D	D	D
		23.2	7	D	N	D	G	D	D	D
			9	D	N	D	G	D	D	D
	13.6	24.1	1	D	N	D	D	D	D	T
			4	D	N	G	D	D	T	T
		24.2	1	D	N	D	D	D	D	T
			5	D	N	D	D	D	D	T
		24.3	4	D	N	T	T	T	N	T
			6	D	N	T	T	T	N	T
		24.4	5	D	N	D	D	D	D	T
			10	D	N	D	D	D	D	T
		24.5	5	D	N	D	G	D	T	T
			6	D	N	D	G	D	D	T
			8	D	N	D	G	D	D	T
			9	D	N	D	G	D	D	T
	13.8	26.1	4	D	D	D	D	D	T	T
		26.2	2	D	N	D	D	D	D	T
			7	D	N	D	D	D	D	N
	13.9	27.1	1	D	N	D	D	D	D	T
	13.10	29.1	1	D	N	T	T	T	N	D
			3	D	N	T	T	T	D	D
		29.3	3	D	N	T	T	D	N	T

64			4	D	N	T	T	T	N	T
			6	D	N	T	T	T	N	T
			7	D	N	D	T	T	N	T
		29.5	1	D	N	D	T	T	N	T
			3	D	N	T	T	T	N	T
		14.1	30.2	1	D	D	D	T	T	T
			30.2	5	D	D	T	T	T	T
			30.3	9	T	T	T	T	T	T
			30.4	2	T	T	T	T	T	T
				9	T	T	D	T	T	T
			30.5	4	T	T	T	T	T	T
				5	T	T	D	T	T	T
				8	T	T	T	T	T	T
		14.2	31.4	5	D	D	D	D	D	D
			31.6	5	D	D	T	T	T	T
64	14.3	32.1	2	D	D	D	N	T	D	T
			3	D	D	D	N	D	D	D
			32.2	7	D	D	T	T	T	T
		32.3	1	D	D	T	T	D	T	D
			2	D	D	T	T	T	T	T
			3	D	D	D	N	D	D	D
		32.4	1	D	D	D	N	D	D	D
			2	D	D	T	T	T	T	T
			6	D	D	D	N	D	D	D
		32.5	1	D	D	T	T	T	T	T
			8	D	D	D	D	D	D	D
		32.6	4	D	D	T	T	T	T	T
			3	D	D	D	D	D	D	D
		32.8	4	D	D	D	D	D	D	D
			3	D	D	T	T	T	T	T
		14.6	34.4	4	D	D	D	T	T	T
			34.4	3	D	D	T	T	T	T
		14.8	35.1	1	D	D	T	T	T	T
				7	D	D	T	T	T	D
			35.2	2	D	D	T	T	T	T
				6	D	D	T	T	T	T
			35.3	3	D	D	T	T	T	T
				4	D	D	D	T	T	T
			35.4	3	D	D	T	T	T	T

F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	4	D	D	T	T	T	T	T
				1	D	D	T	T	T	T	T
				2	D	D	D	T	T	T	T
64	14.10	36.1	36.2	3	D	D	T	T	D	T	T
				4	D	D	D	N	D	D	D
		36.4	36.3	1	D	D	D	N	D	D	D
				5	D	D	D	N	D	D	D
				1	T	D	D	D	D	D	D
				2	T	D	D	D	D	D	D
58	19.2	50.1	50.1	1	T	D	D	D	D	D	D
				2	T	D	D	D	D	D	D
	19.3	51.1	51.1	2	D	T	D	D	T	T	T
				3	T	T	D	T	T	T	T
	24.1	53.1	53.1	4	T	D	D	T	D	D	N
				1	T	D	D	D	T	T	T
		53.4	53.4	4	T	D	D	T	T	T	T
				6	D	T	D	T	T	T	T
				6	D	T	D	T	T	T	T
				6	D	T	D	T	T	T	T
	34.2	66.1	66.1	4	D	T	D	T	T	T	T
	36.3	72.2	72.2	6	D	D	D	T	D	D	D
				7	D	D	D	D	D	D	D
		72.3	72.3	3	D	D	D	D	D	D	D
				6	D	D	D	D	D	D	D
		72.4	72.4	1	D	D	D	D	D	D	T
				1	T	D	D	D	D	D	D
		72.5	72.5	2	T	D	D	D	D	D	D
				2	T	D	D	D	D	D	D
77	26.2	89.6	89.6	2	T	T	D	D	T	T	T
				6	T	D	D	T	T	T	T
	26.5	91.4	91.4	7	D	T	D	T	T	T	T
				8	D	T	D	T	T	T	T

Примітки: ¹⁾ Цифрами 1–7 позначені локуси: *Xgdm68*, *Xgwm190*, *Xgwm182*, *Xcfd102*, *Xwmc289*, *Xcfa2141*, *Xgwm272*, відповідно;

²⁾ D, T – алелі, властиві однойменним геномам, N – новий аллель, G – гетерозигота.

мікросателітний аналіз знайдено рослини, які можна вважати дисомно-заміщеними лініями 5D/5T (F₂-F₃-F₄/F₅): 50-5.2-8.7/2,3; всі нащадки 57-10.4; 6.6-

11.2-14.3/1; 65-12.4-16.1/5,7; 65-12.4-16.2/3; 65-12.4-16.3/3; 65-12.4-16.5/1; 65-12.4-16.6/3; 65-12.6-17.2/3; 65-12.6-17.3/7; 65-12.6-17.4/2; 65-12.6-17.5/4; 65-12.6-17.6/1; 65-12.6-17.7/1,3; 65-12.6-17.9/5; 64-14.1-30.3/9; 64-14.1-30.5/4,8;(табл. 3.8). Серед їхніх батьківських рослин F_4 лише 50-5.2-8.7; 527-10.4-13.3 та 13.4; 65-12.6-17.6 та 17.7; 64-14.1-30.3 могли бути дисоміками з заміщенням хромосом 5D на пару нерекомбінантних хромосом 5T. Проте довести цей факт не можна через замалу кількість їхніх нащадків F_5 , перевірених мікросателітним аналізом. Те, що всі інші рослини F_3 та F_4 , не згадані щойно, мали у своєму геномі рекомбінантні хромосоми 5D/5T, які сполучали фрагменти цих хромосом у різних комбінаціях, очевидно із таблиці 3.8.

Звертає на себе увагу велика кількість рекомбінантних хромосом 5D/5T серед нащадків F_5 , які могли утворитися в будь-якому поколінні, починаючи з F_2 . Це підтверджує висловлене припущення [104; 157] про гомологію геномів D та T та переводить геном T диплоїда *Amblyopyrum muticum* до групи тих геномів субтриби *Triticinae*, які можуть кон'югувати з хромосомами принаймні одного з субгеномів м'якої пшениці. Такі геноми є дуже цінними для інтрогресивної гібридизації, тому що не вимагають застосування спеціальних методів для включення у пшеничні хромосоми маленьких фрагментів гомологічної хромосоми спорідненого геному через рекомбінацію, як це спостерігається для хромосом однойменних геномів. Проблема отримання суперкоротких транслокацій від гомологічних хромосом, які можуть нести корисні гени у дуже маленькому обсягу чужинного хроматину постійно обговорюється у літературі [107; 177]. Знайдені нами рослини з рекомбінантними хромосомами 5D/5T є перспективним матеріалом для подальшої роботи як з інтрогресивної гібридизації, так і з генетичного аналізу.

З іншого боку, можливість рекомбінації хромосом D та T ускладнює процес ідентифікації ліній з чужинним дисомним заміщенням. Коли D-хромосоми не кон'югують з хромосомами чужинного геному, для ідентифікації заміщень хромосом D геному на хромосоми геномів S, S^{sh} , U трьох видів

егілопсу, відповідно, *Aegilops speltoides*, *Ae. sharonensis*, *Ae. umbellulata*, можна було використовувати 1-2 біохімічних маркери на хромосому у сполученні з урахуванням кількості унівалентів у метафазі 1 гібрида між реципієнтним генотипом (Аврора) та 42-хромосомною лінією інтрогресивного походження [1]. Коли хромосоми донорного (Т) та реципієнтного (D) геномів кон'югують та формують рекомбінантні хромосоми з частотою, як видно з результатів даного дослідження, яка помітно перевищує частоту збереження у поколіннях нерекомбінантних хромосом, пошук таких хромосом вимагає скринування рослинного матеріалу з використанням кількох маркерних локусів на хромосому. Маркери мають перекривати обидва хромосомних плеча, бажано, у дистальних та проксимальних від центромери ділянках. Хоча наше дослідження побудовано саме за таким планом і кожна рослина досліджена за 7 локусами, за якими відрізняються спектри ампліконів, які дають хромосоми 5D та 5T, немає жодної впевненості, що хромосоми, вказані нами як інтактні (див. вище) є такими насправді. Хромосоми цілком можуть бути рекомбінантними в ділянках, не перекритих SSR-локусами. Тому рослини, діагностовані нами як дисомні чужинно-заміщенні 5D/5T, слід лише вважати такими за даними аналізу та мати на увазі, що розширення спектру мікросателітних локусів може спростувати висунуте припущення про геномну структуру вивчених рослин.

У таблиці 3.8 крім позначок D та T, які відповідають геномам, зустрічається позначка «N». Вона показує такий амплікон спектру, якій з даною парою праймерів не має компонентів ні Аврори, ні Авротики і позначається як «новий». Скорочення «N2» показує, що для даного локусу виявлено два різних нових алеля. Такий локус був лише один, *Xgwm272*. Появу нових алелів мікросателітних локусів простіше за все пояснити мутацією, частота яких підвищується у геномних локусах, які утворюються повторами, а SSR-локуси саме такими локусами є. Мутації можуть виникати або за рахунок не зовсім реципрокної рекомбінації між парою хромосом навіть в тому випадку, коли в вихідних хромосомах SSR-локус представлений однаковими алелями. Або за рахунок перебудови більшої ділянки хромосом під час рекомбінації,

молекулярний механізм яких позначають широким терміном конверсія [73]. Із семи мікросателітних локусів, за якими перевірялись рослини F_5 , нові алелі не сформували лише локуси *Xgdm68*(A,B,D) та *Xgwm182*. У перевіреному матеріалі тричі виник новий один і той самий у всіх рослинах алель локусу *Xgwm272*: рослини F_3 18-3.1, F_4 66-11.2-4.8 та 67-13.8-26.2 (табл. 3.8). Мутація у локусі *Xcfa2141*(A, B, D) виникла у рослин F_2 67-13.6 та F_4 55-7.1-10.2; 67-13.10-29.1, 3, 5. Мутація у локусі *Xwmc289*(B, D) виникла у рослині F_4 65-12.6-17.3, мутація за локусом *Xcfd102* та за локусом *Xgwm190* — у рослині F_2 №64. Звичайно, вказуючи рослини, про які ми думаємо, що саме там з'явився новий алель, ми спираємось на мікросателітний аналіз ДНК лише рослин F_5 та можемо помилятися через те, що бачимо не всіх нащадків гібридів різних генерацій, а лише їхню частину, а саме найбільш фертильних нащадків з кількістю хромосом, яка задовольняє програму створення чужинно-заміщених ліній. Цілком можливо, що вказані мутації виникли ще у гаметах F_1 .

Появу нових алелів ми спостерігали не лише для хромосом D та T, а і для хромосом субгеномів A і B. Ми не наводимо ці дані, оскільки вони не стосуються пошуку інтрогресій D/T, хоча і наводять на думку, що мікросателітні локуси через свою високу мутаційну активність [200; 169] можуть ускладнювати інтерпретацію результатів мікросателітного аналізу та знижувати впевненість у адекватності зроблених висновків. В цьому плані превеликий жаль викликає неінформативність даних про кон'югацію хромосом у мейозі гібриду F_1 від схрещування лінії, що досліджується, з реціпієнтним генотипом Аврора. Результати вивчення таких гібридів у сполученні з маркуванням хромосом є надійним доказом наявності чужинного заміщення цілої хромосоми пшениці або її плеча [1]. При створенні інтрогресивних ліній за участю генома, хромосоми якого кон'югують з хромосомами D генома пшениці, потрібно шукати інші можливості підтвердження адекватності висновків, зроблених на підставі мікросателітного аналізу ДНК інтрогресивних ліній.

Порівняння спектрів ампліконів, отриманих із ДНК Аврори та Авротіки з праймерами мікросателітних локусів, специфічність яких обмежувалась однією–трьома хромосомами 5-ої гомологічної групи хромосом пшениці, дало змогу вказати ті з них, які мають діагностичну цінність для пошуку рослин з заміщенням 5D/5T та рекомбінацій 5D/5T серед 42-хромосомних нащадків F_5 гібрида Авротіка х Аврора. Серед 234 рослин знайдено 24 з дисомним заміщенням 5D/5T, які є нащадками 5 рослин F_4 від двох рослин F_2 . Значна кількість рослин містить рекомбінантну хромосому 5D/5T. Рекомбінація могла відбутися в будь-якому поколінні, починаючи з F_2 . Мікросателітний аналіз інтрогресивного матеріалу має певні обмеження через підвищену мутаційність SSR-локусів та потенційне розширення хромосомної специфічності цих локусів на кілька членів однієї і тієї самої гомологічної групи хромосом. Знайдені рослини з рекомбінантними хромосомами 5D/5T є перспективним матеріалом для подальшої роботи.

3.1.8. Порівняння результатів мікросателітного аналізу рослин поколінь F_4 та F_5 і результатів дот-блот гібридизації. Не від усіх рослин покоління F_4 (які було проаналізовано за обраними мікросателітними локусами та методом дот-блот гібридизації щодо наявності генетичного матеріалу від *Aegilops mutica*) було отримано нащадків покоління F_5 . Тим не менше, для тих рослин, для яких було отримано нащадків наступного покоління, можна було порівняти результати, отримані з використання різних методів (дот-блот і аналіз SSR локусів) у двох послідовних поколіннях рослин (F_4 та F_5). На прикладі рослини (лінії) номер 72.5 показано досить добре узгодження результатів.

За результатами мікросателітного аналізу (F_4) можна було припустити, що ця рослина не має інтрогресій у складі хромосом 5-ї гомеологічної групи (рис. 3.21, а), алелі всіх досліджених мікросателітних локусів є такими, що характерні для сорту Аврора (позначені рожевим кольором).

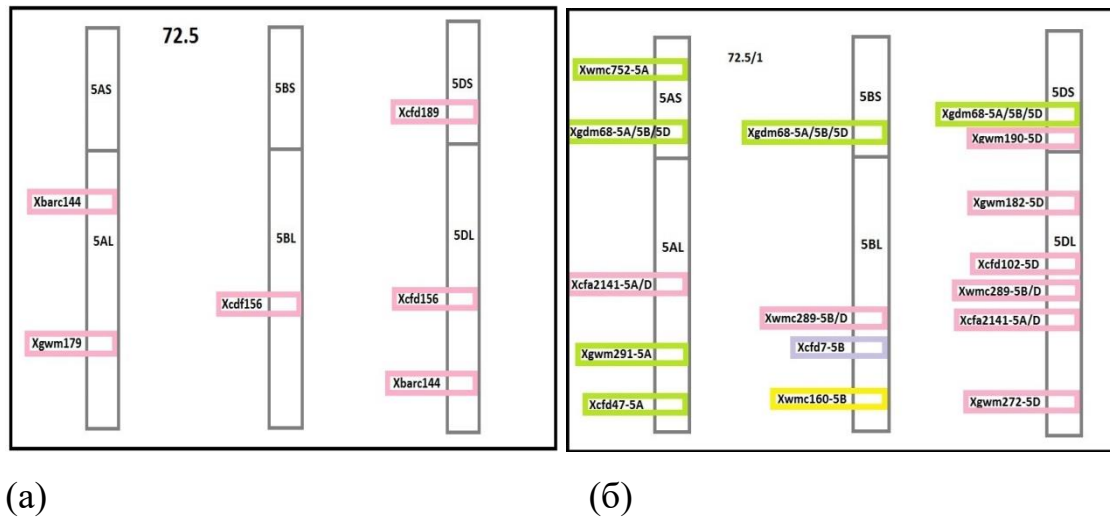


Рис. 3.21. Схематичне зображення хромосом 5-ї гомеологічної групи рослини 72.5 (покоління F_4) та рослини 72.5/1, що належить до її нащадків наступного покоління (F_5). Рожевим кольором позначені SSR локуси, що мали алелі такі, як Аврора; зеленим кольором такі – як Авротіка, жовтим і фіолетовим – «нові» алелі, не характерні ні для Аврори, ні для Авротіки.

З покоління F_5 було проведено мікросателітний аналіз двох рослин - 72.5/1 та 72.5/2, проте для них було отримано абсолютно ідентичні результати аналізу SSR локусів, тому на рис. 3.21 наведено схематичне зображення хромосом лише рослини 72.5/1. Для аналізу рослин покоління F_5 була можливість використати більшу кількість мікросателітних локусів, що дозволило побачити наявність інтрогресій (чи перебудов у мікросателітних локусах), які не можна було побачити при аналізі рослини F_4 з використанням меншої кількості мікросателітних локусів (див. рис. 3.21, б). Тим не менше, можна говорити про узгодження результатів SSR аналізу, порівнюючи розташування досліджених локусів на хромосомах рослин F_4 та F_5 : SSR локуси, що містять алелі чужинного походження (від Т геному, зелений колір на рисунку) у рослини 72.5/1 розташовані в тих ділянках хромосом 5-ї групи, які не містили досліджених мікросателітних локусів у рослини попереднього покоління (72.5) – дистальні ділянки хромосоми 5А, коротке плече та дистальна частина довгого плеча хромосоми 5В, та дистальна частина короткого плеча хромосоми 5D.

Отже, як і передбачалося, дослідження більшої кількості мікросателітних локусів, що локалізовані в різних частинах хромосоми, дозволяє більш точно ідентифікувати наявність інтрогресій, особливо невеликого розміру (які зокрема можуть утворюватись через здатність хромосом D і T геномів до рекомбінації).

Щодо результатів дот-блот, то ДНК рослини 72.5 утворювала сигнал гібридизації з міченою ДНК *Aegilops mutica* в якості зонда (див. рис. 3.22), що вказує на наявність в геномі рослини 72.5 генетичного матеріалу T генома, що узгоджується з результатами мікросателітного аналізу з використанням більшої кількості SSR локусів (для двох рослин покоління F₅ - 72.5/1 та 72.5/2 – нащадків 72.5).

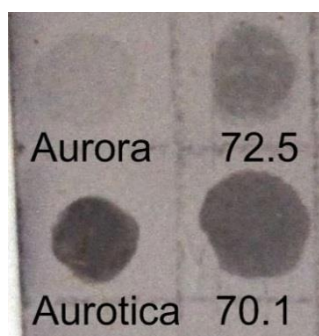


Рис.3.22. Фрагмент мембрани з результатами дот-блот гібридизації, на якому видно позитивний результат (фіолетове забарвлення), отриманий з ДНК рослини 72.5.

3.2. Порівняльне вивчення Аврори, Авротіки та інтрогресивних ліній за показниками морозостійкості

3.2.1. Визначення вмісту вільного проліна в листках загартованих рослин Аврора та Авротіка. Накопичення вільного проліна в листках рослин пшениці під час процесу загартовування вважається одним з механізмів підготовки рослини до переживання наступного морозного стресу [197]. Тобто, відповідно до даних літератури, більш морозостійкі рослини мають накопичувати більшу кількість вільного проліна внаслідок загартовування, і

вільний пролін може виконувати захисну функцію при наступній дії низьких температур нижче нуля (морозний стрес), діючи переважно як осмопротектор [63]. Отже, ми вирішили перевірити, чи такий механізм, як накопичення вільного проліну, бере участь у забезпеченні вищої морозостійкості Авротіки, порівняно з Аворою.

Для визначення вільного проліна використовували метод, запропонований Bates і колегами [33]. За нашою початковою гіпотезою, Авротіка, як більш морозостійка, мала б накопичувати більшу кількість вільного проліну протягом процесу загартовування, ніж Аврора. Проте були отримані протилежні результати. Визначення вільного проліна в листі рослин Аврори та Авротіки проводилося після того, як рослини пройшли загартовування протягом трьох тижнів. За умови, коли рослини загартовувалися в холодильнику зі світлом (3°C, 15 годинний світловий день), кількість проліна, що накопичилася в листках Аврори та Авротіки виявилася протилежною до очікуваної: в листках Аврори накопичилася більша кількість проліна, ніж в листках Авротіки. Для визначення кількості проліна, що накопичується в листках, проводиться реакція і подальше вимірювання поглинання за довжини хвилі 520 нм, за цієї довжини хвилі поглинає забарвлена комплексна сполука, що утворює пролін з кислим нінгідрином.

При загартовуванні рослин Аврори і Авротіки на вулиці в період з кінця березня до початку квітня 2014 року, визначення вільного проліна не показало значної різниці між Аворою та Авротікою – вміст проліна виявився приблизно однаковим, або більшим у Аврори. Визначення проводилось у наважках листків по 0,5 г. Візуально не було видно різниці між Аворою та Авротікою за інтенсивністю утвореної забарвленої сполуки через не дуже значну відмінність вмісту проліна. На рисунку 3.23 представлено фотографію пробірок з проведеною реакцією для виявлення вільного проліна у листках загартованих рослин Аврора та Авротіка.

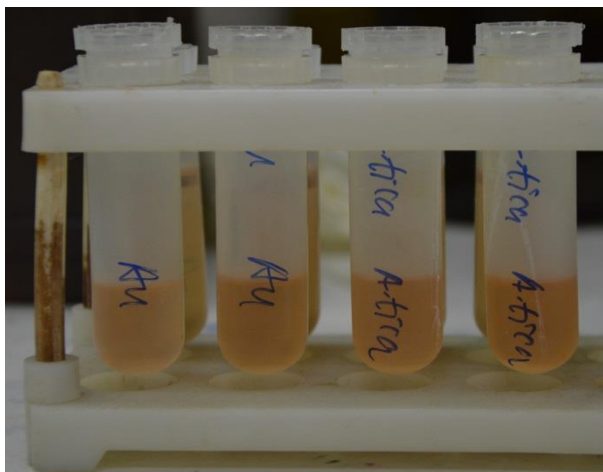


Рис. 3.23. Реакція для виявлення вільного проліна в листках рослин пшениці: перші дві пробірки зліва (Au) – сорт м'якої пшениці Аврора, третя та четверта пробірки (A-tica) – геномно-заміщена форма Авротіка.

У таблиці 3.9 наведено дані величини поглинання за 520 нм (довжина хвилі, яку поглинає забарвлена комплексна сполука, утворена проліном з нінгідрином), отримані для Аврори і Авротіки, та розрахований вміст вільного проліна в рослинній тканині. Як видно з наведених результатів, Аврора має більший вміст вільного проліна, ніж Авротіка: за критерієм рангів R Вілкоксона-Уайта, $R=6$, $u=1,96$, що вказує на статистично достовірну різницю на рівні значущості 0,05 [5]. Це не узгоджується з теоретичним уявленням, що більш зимостійка форма (Авротіка) повинна мати більший вміст вільного проліна.

Таблиця 3.9

Вміст вільного проліна в листках Аврори і Авротіки

Зразок	Поглинання за 520 нм	Вміст вільного проліна (мкмоль/ грам тканини)
Аврора 1	0,516	2,15
Аврора 2	0,745	3,64
Аврора 3	0,613	2,77
Авротіка 1	0,186	0,69
Авротіка 2	0,227	1,03
Авротіка 3	0,191	0,86

Можна зробити висновок, що накопичення вільного проліна в листках під час процесу холодового загартовування не належить до тих механізмів, що забезпечують вищу зимостійкість геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка, порівняно з сортом Аврора.

3.2.2. Визначення електричної провідності (витікання електролітів) для Аврори та Авротіки

Метод базується на тому, що ступінь пошкоджень клітин внаслідок дії стресового чинника (низької температури) корелює з кількістю електролітів, що витікають з пошкоджених клітин у деіонізовану воду внаслідок порушення цілісності мембрани [56]. Для визначення електричної провідності, листки загартованих рослин Аврори та Авротіки розрізали на фрагменти довжиною приблизно 2 см і поміщали в пробірки з деіонізованою водою. Пробірки з листками заморожували в термостаті протягом 1,5 години за -3°C , а потім температуру знижували до -10°C і витримували пробірки з листками ще годину, після чого пробірки діставали з термостата та залишали танути протягом 20 годин. Електричну провідність визначали за допомогою кондуктометра, і вимірювали у мікросіменсах (μS). Після вимірювання провідності листки витримували на водяній бані протягом 15 хвилин за 100°C для подальшого визначення максимальної кількості електролітів, що витікають з таких «вбитих» листків, і розрахунку відносної провідності, що вважається більш точним показником, ніж абсолютна провідність. Формула для розрахунку відносної провідності (RC–relative conductivity): $RC=(R_1-R_0)/(R_2-R_0)$, де R_1 – електрична провідність зразка (в мікросіменсах, μS) після проморожування, R_2 – електрична провідність зразка після 15 хвилин за 100°C , R_0 – електрична провідність деіонізованої води (в нашому випадку – $1,0 \mu\text{S}$) [166].

Дані абсолютної електричної провідності та відносної провідності для Аврори та Авротіки наведені в таблиці 3.10. Як видно з таблиці, Авротіка має

більшу відносну провідність, ніж Аврора і це підтверджується статистично при порівнянні середніх значень показників провідності за t-критерієм. Для провідності «після заморожування», «після 15 хв за 100 °C» та «відносної провідності» значення t становили 6,16, 8,24, та 6,30, відповідно при $t_{\text{табл.0,01}} = 2,98$ для $df=12$.

Таблиця 3.10

Витікання електролітів (електрична провідність) з листків Аврори та Авротіки після заморожування

Статистичні показники	Значення провідності для Аврори			Значення провідності для Авротіки		
	Після заморожування, μS	Після 15 хв за 100 °C, μS	Відносна провідність, RC	Після заморожування, μS	Після 15 хв за 100 °C, μS	Відносна провідність, RC
	76,5	788	0,096	271	676	0,4
	113,2	767	0,146	305	665	0,45
	81,2	764	0,105	169	682	0,246
	60,1	839	0,070	256	692	0,369
	97,3	808	0,119	145	661	0,218
	64,1	798	0,079	261	674	0,386
	92,1	744	0,123	333	626	0,531
Арифметичне середнє±ст. похибка	83,5±7,11	786,9±12,0	0,105±0,010	248,6±25,86	668±8,001	0,371±0,041
Стандартне відхилення	18,81	31,74	0,026	68,42	21,19	0,11
$W^{(1)}$	1,07	1,06	1,09	1,10	1,10	1,11

Примітка $^{(1)}W$ – емпіричне значення критерія Шапіро-Уїтні, табличне значення для 0,73 для $n = 7$ (тестується альтернативна гіпотеза).

Оскільки за нашими результатами виходить, що Авротіка, що є більш зимостійкою формою, має більші показники відносної електричної провідності, порівняно з Авророю, то можна зробити висновок, що вища зимостійкість Авротіки забезпечується іншими механізмами, відмінними від певних особливостей клітинної мембрани, що забезпечували б менше витікання електролітів після низькотемпературного стресу.

3.2.3. Визначення морозостійкості рослин пшениці через відростання після заморожування

Прямі методи оцінки морозостійкості (коли оцінюється безпосередньо здатність рослин переживати дію низьких негативних температур) вважаються більш точними, порівняно з непрямими методами (як визначення вмісту вільного проліна та визначення електричної провідності), тобто такі результати мають краще відображати здатність рослин виживати в польових умовах. При роботі з такою ознакою як морозостійкість, досить зручно було б розробити метод, який би давав змогу оцінювати рослини на морозостійкість в лабораторних умовах (саме в умовах певної лабораторії), давав би відтворювані результати, надавав би можливість добре бачити різницю за морозостійкістю між контрастними генотипами, і, що важливо, досить добре відповідав би здатності рослин переживати зиму в польових умовах. В нашому дослідженні вирішили використати прямий лабораторний метод визначення морозостійкості через підрахунок відсотку відростання рослин (вузлів кущіння) після поступового ($1^{\circ}\text{C}/\text{год}$) заморожування в спеціальному термостаті. Методику і умови заморожування було запозичено у Brian Fowler [70] зі змінами. Для заморожування, як і запропоновано Fowler, брали саме вузли кущіння (crowns), тобто корінці відрізалися, так, щоб залишилося приблизно 2-3 см коренів, і листки обрізалися, щоб залишалося 3 см (від місця, де листки відходять від стебла). Заморожували вузли кущіння в пробірках з вологим піском (також, відповідно до Fowler), причому дуже важливим було підібрати необхідний

ступінь зволоження піску, бо якщо пісок є надто вологим, утворюється лід, що викликає механічне пошкодження рослин і не залишає їм шансів на виживання. Кількість рослин, що вижили, оцінювали (за відростанням) через 3 тижні після заморожування рослин. Важливим було також попереднє витримування рослин протягом 12-13 годин (overnight) за -3°C перед наступним поступовим ($1^{\circ}\text{C}/\text{год}$) зниженням температури до необхідної; в цей час, як вважається, відбувається додаткове загартовування рослин.

На рисунку 3.24 показано відростання рослин Авротіки після експерименту заморожування.



Рис. 3.24. Відростання Авротіки після заморожування.

Експеримент із заморожуванням вузлів кущіння та відростанням для Аврори та Авротіки було проведено тричі (табл. 3.11). Результати трьох експериментів збігались не повністю. Статистично значуща різниця між відростанням Аврори та Авротіки була лише у першому експерименті. Однак між першим та третім експериментом статистично значущої різниці не було

Таблиця 3.11

Результати експериментів з проморожування-відростання паростків Аврори та Авротіки

Зразок	1 експеримент ¹⁾			2 експеримент			3 експеримент		
	+	–	P	+	–	P	+	–	P
Аврора	16	44	0,0005	6	54	0,27	17	43	0,071
Авротіка	2	58		2	58		8	52	

Примітка: ¹⁾ «+» - паростки відросли, «–» - паростки не відросли, P – значення двобічного точного критерію Фішера при порівнянні розподілів «+»/«–» для Аврори та Авротіки.

(за точним критерієм Фішера імовірність різниці між 2–58 та 8–52 становить 0,09, між 16–44 та 17–43 P=1,0, тобто різниці немає в обох випадках). Після об'єднання результатів першого та третього експериментів формується чотирипільна таблиця.

	+	–
Аврора	10	110
Авротіка	33	87

Імовірність однаковості таблиць за точним критерієм Фішера 0,00016, тобто різниця у відростанні Аврори та Авротіки є на користь Авротіки.

На жаль, не вийшло оцінити виживання інтрогресивних ліній, використовуючи цей метод, оскільки при роботі з паростками ліній часто всі рослини певної партії гинули (не виживали, не спостерігалось відростання).

Можна зробити висновки, що умови такого лабораторного проморожування значною мірою відрізняються від польових умов, є досить штучними і не враховують певних інших факторів, що впливають на рослини в полі. Крім того, рослини піддавалися проморожуванню на досить ранній стадії розвитку (стадія трьох листків), в той час як в полі рослини переживають зимові низькі температури вже на більш розвиненій стадії, коли відбулося

кущіння рослин. Отже, краща зимостійкість Авротіки, яка спостерігається в польових умовах, має бути пов'язана з іншими механізмами, які можуть краще проявлятися в польових умовах. Тим не менше, варто зазначити, що виживання Авротіки після лабораторного проморожування, як видно з наведених результатів, все ж завжди було кращим, ніж у Аврори, і жодного разу не спостерігалось виживання Аврори за умови загибелі всіх рослин Авротіки.

Найбільш цікавим спостереженням, що нам вдалось зробити при отриманні паростків Аврори та Авротіки та підготовці їх до проморожування, було те, що паростки Авротіки у порівнянні з паростками Аврори формують кореневу систему, яку можна назвати більш міцною та розвиненою у порівнянні з корінцями Аврори, за умови вирощування паростків за дії низьких позитивних температур (4°C).

3.3. Архітектоніка кореневої системи Авротіки як можливий чинник її підвищеної зимостійкості

Під час проведення експериментів з проморожування досліджуваних рослин (оскільки для проморожування рослини виймалися з землі та поміщалися в пробірки), було помічено відмінності кореневої системи Аврори і Авротіки, а саме, Авротіка характеризувалася більшим розвитком кореневої системи. Сучасними роботами показано, що, з одного боку, формування кореневої системи залежить від умов зростання, зокрема, температури ґрунту, причому реагує на градієнт температури від поверхні ґрунту вниз [71] і оптимальна температура для розвитку коренів є видоспецифічною [116]. З іншого боку, від розвитку кореневої системи залежить толерантність рослин до абіотичних чинників, зокрема до низьких температур, яка може забезпечуватися, серед іншого, більшим розвитком вегетативної наземної маси завдяки більш розвиненій кореневій системі [67; 211; 212]. Відомо, що зародок злаків теплого клімату, таких як кукурудза, рис, *Brachypodium*, утворює лише один первинний корінець, а зародок злаків помірного клімату, а саме пшениця,

жито, овес, ячмінь, утворюють від трьох до шести первинних корінців [51]. Більш того, серед злаків, що культивуються, озимі форми притаманні лише тим видам злаків, які утворюють три та більшу кількість первинних корінців. Отже, розвиток кореневої системи не є ознакою, нейтральною для здатності рослин переносити зимові стресові умови.

Мичкувата коренева система однодольних рослин, зокрема злаків, формується з коренів двох різних джерел виникнення. По-перше, вже згадані осьові ембріональні (насінневі чи зародкові, *seminal*) корінці, які утворюються при проростанні насіння з ембріональної кореневої меристеми, як первинні (*primary roots*), так і наступні (рис. 3.25). Вони дають бокові корені різного порядку (*lateral roots*), і так формується насіннева частина кореневої системи, більш заглиблена. Друга хвиля осьових коренів, постембріональних, виникає пізніше, з вузла кущіння, який формується вище зернівки, що проростала. Вони називаються пагоновими коренями (*shoot-born roots*), чи вузловими коренями (*nodal roots*). Так само, як ембріональні корені, ці корені утворюють бічні розгалуження кількох порядків і беруть участь у формуванні повної кореневої системи злаків [55; 171; 143]. Серед вузлових коренів ті, що формуються під землею, мають назву коренів, що ростуть з вузла кущіння (*crown roots*), а ті, що утворюються над землею, називаються опорними коренями (*brace roots*) [171].

Відомо, що здатність злакової рослини перенести зимові стреси на пряму пов'язана зі ступенем кущистості. Для рослини, яка не сформувала вузол кущіння та, відповідно, корені, що від нього походять, імовірність вижити взимку знижується [17; 3]. Можна припустити, що частина кореневої системи, яка формується насінневими коренями та розташована глибше у ґрунті, зимує більш успішно у порівнянні з коренями, що походять від вузла кущіння, та забезпечує зимостійкість рослини в цілому, якщо ця частина кореневої системи розвивається міцно. Саме тому більш міцний, за візуальною оцінкою, розвиток кореневої системи у Авротіки у порівнянні з Аворою зробив цю ознаку цікавою для вивчення її можливого зв'язку з підвищеною зимостійкістю Авротіки.

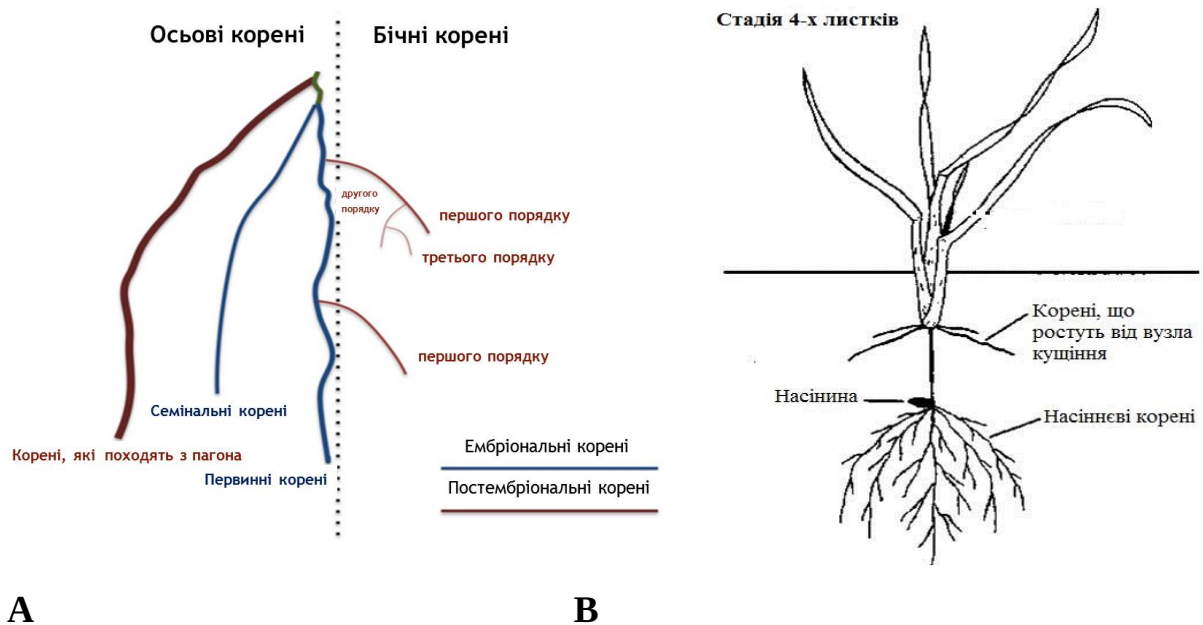


Рис. 3.25. А. Схема будови кореневої системи [за 116]. В. Будова кореневої системи однодольних на прикладі пшениці [199].

Для перевірки припущення про можливий зв'язок підвищеної зимостійкості Авротіки з її більш розвинутою кореневою системою було проведено дослідження та порівняння характеристик кореневої системи сорту Аврора, геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка та інтрогресивних ліній, їхніх похідних.

3.3.1. Характеристика кореневої системи Аврори, Авротіки та інтрогресивних ліній F₅. Для вивчення розвитку кореневої системи серед інтрогресивних ліній Аврора/Авротіка було обрано ті лінії, які було вивчено за структурою геному щодо хромосом 5-ої гомеологічної групи (див. пункт дисертації 3.1.7). Це пов'язано з тим, що для пшениці вже показано участь хромосом цієї гомеологічної групи у формуванні ознаки морозостійкості [208; 192]. На нашому рослинному матеріалі можна було перевірити, чи є зв'язок між розвитком кореневої системи та структурою хромосом 5-ої гомологічної групи, встановленої нами за даними вивчення специфічних для Авротіки та Аврори алелів мікросателітних локусів (SSR-локусів), локалізованих на хромосомах цієї гомеологічної групи хромосом [98].

Розвиток кореневої системи вивчали на рослинах, вирощених у пакетах з ґрунтовою сумішшю, та рослинах, вирощених у польових умовах. У першому випадку рослини не зимували, а вивчалися відразу після досягнення онтогенетичної стадії кушіння.

В дослідженнях будови і розвитку кореня часто використовують поняття архітектури кореневої системи (Root System Architecture, RSA). Архітектура кореневої системи формується за рахунок ембріональних та постембріональних осьових та бічних коренів, і може бути описана як 3D конфігурація кореневої системи, що включає такі характеристики кореневої системи як довжина коренів, діаметр коренів, характер галуження, різні типи коренів, кут росту коренів, а також довжина і густина кореневих волосків [171]. Бічні корені складають основну масу кореневої системи рослини та виконують такі основні функції як поглинання мінеральних компонентів живлення та розвиток симбіозу з мікроорганізмами. Утворення бічних коренів визначається розвитком рослини, але воно може також залежати від впливу умов довкілля і бути пристосуванням до несприятливих умов. Бічні корені є схожими за анатомією, але звичайно меншими в діаметрі, ніж їхній материнський корінь, через меншу кількість кортикальних шарів клітин та пучків ксилеми і флоєми [27; 105].

В нашому дослідженні кореневу систему оцінювали за трьома показниками: максимальна довжина (довжина найбільш довгого кореня з числа осьових), кількість осьових коренів з рослини, об'єм рідини, яку витісняє коренева система при зануренні її у рідину. Остання ознака розглядалась нами як така, що може долучити до характеристики архітектоніки кореневої системи товщину коренів та кути відходження бокових коренів. Адже на сьогодні накопичені чіткі вказівки на залежність кутів відходження бокових коренів від умов формування кореневої системи через варіювання швидкості росту осьового кореня та закладання точок ініціації росту бокових коренів [152].

При вирощуванні у польових умовах враховували кількість стебел рослини навесні, як ознаку, яка непрямым чином може давати оцінку обсягу тієї

частини кореневої системи, яка сформувалась за рахунок постембріональних коренів

3.3.1.1. Оцінка кореневої системи рослин, вирощених у пакетах з ґрунтовою сумішшю у світловій кімнаті у 2015 році після проходження природного загартовування. Перевірка розподілу варіантів кожної з вивчених ознак на відповідність нормальному розподілу [5] показала наявність відповідності для кожної з трьох вивчених ознак. Тому статистичну обробку результатів виконали з застосуванням параметричних критеріїв перевірки статистичних гіпотез.

Перш за все порівнювали Аврору та Авротіку. Незважаючи на те, що візуально коренева система Авротіки виглядала як більш міцна у порівнянні з кореневою системою Аврори, не було виявлено різниці між ними за ознаками довжина найдовшого кореня (критерій Стюдента $t=0,97$, $p>0,05$) та кількість осьових коренів ($t=0,17$, $p>0,05$) (табл. 3.12). Для ознаки об'єм витісненої рідини різниця між середніми арифметичними була значущою ($t=4,81$, $k = 18$, $p<0,01$). З цього виникло припущення, що генотипи Аврори та Авротіки відрізняються за архітектурою формування кореневої системи. Можливо, що Авротіка утворює більшу кількість бічних розгалужень ембріональних/постембріональних коренів, або корені мають більшу товщину, або бічні корені відходять від основного кореня під іншим кутом, від чого змінюється об'єм, який займають корені при зануренні їх у рідину.

Результати дисперсійного аналізу (табл. 3.13) підтвердили наявність неоднорідності між оціненими зразками за ознакою об'єм рідини, що витісняється коренями. Для пошуку ліній, які за вивченою ознакою відрізняються від Аврори та не відрізняються від Авротіки, використали критерій Даннета для порівняння середніх значень груп дисперсійного комплексу з контрольною групою (Аврора чи Авротіка) [5].

Таблиця 3.12

Показники розвитку кореневої системи рослин, вирощених у пакетах у світловій кімнаті у 2015 році

Генотип	Арифметичне середнє ($\bar{X}$) ¹⁾ та стандартне відхилення (S_x) за ознаками кореневої системи		
	Максимальна довжина кореня	Кількість коренів	Обсяг витісненої рідини
Аврора	21,4±5,79	5,09±1,22	0,16±0,022
Авротіка	25,0±10,27	5,0±1,12	0,35±0,117
8.7/3-1	23,8±7,11	5,67±2,21	0,37±0,125
21.4/6-1	25,7±5,91	6,78±2,69	0,31±0,089
21.5/2-1	21,7±3,15	6,4±1,19	0,26±0,069
23.1/3-1	23,4±5,31	6,44±1,59	0,32±0,050
23.2/3-3	26,3±5,02	4,22±1,39	0,19±0,108
24.1/1-1	22,6±9,67	5,33±0,87	0,24±0,110
24.2/2-1	18,9±4,77	5,8±1,58	0,19±0,042
24.3/4-1	18,7±4,10	6,2±1,64	0,23±0,050
24.4/1-1	27,0±6,47	5,4±1,33	0,28±0,120
24.4/9-1	27,5±8,60	7,0±1,50	0,50±0,056
26.1/3-1	21,4±6,95	7,0±1,87	0,31±0,149
26.2/9-1	22,3±5,28	6,2±2,05	0,20±0,075
29.5/5-1	23,8±5,27	6,4±1,13	0,36±0,171
30.2/3-1	26,5±4,94	7,3±0,71	0,43±0,087
30.2/9-1	27,0±7,32	6,22±1,72	0,38±0,071
40.5/3-1	30,3±3,61	6,78±1,39	0,43±0,093
41.2/2-1	31,7±5,76	6,6±1,33	0,38±0,106
42.1/1-1	28,6±9,79	7,0±1,15	0,46±0,146
42.1/9-1	29,5±5,11	6,6±0,88	0,52±0,115
43.1/7-1	33,2±11,05	6,9±1,36	0,49±0,055

Генотип	Арифметичне середнє ($\bar{X}$) ¹⁾ та стандартне відхилення (S_x) за ознаками кореневої системи		
	Максимальна довжина кореня	Кількість коренів	Обсяг витісненої рідини
46.4/3-1	31,7±7,70	7,4±1,06	0,37±0,089
43.5/10-1	28,4±4,10	6,1±1,45	0,30±0,083
44.1/2-1	21,6±5,57	5,9±1,46	0,33±0,119
44.2/1-1	28,0±9,56	6,6±1,61	0,37±0,170
45.3/1-2	29,4±6,25	6,1±1,27	0,41±0,118
46.3/8-1	24,7±4,38	5,1±1,27	0,29±0,117
47.4/1-1	30,6±5,94	6,1±1,83	0,33±0,087
53.1/1-2	26,0±5,69	6,6±1,30	0,37±0,110
72.2/3-1	26,0±6,89	6,3±1,38	0,34±0,069
72.5/1-1	19,5±8,07	6,2±1,64	0,29±0,117
91.4/2-1	24,8±6,42	5,6±1,77	0,31±0,092
91.4/4-1	24,4±5,08	4,8±1,09	0,25±0,043
Групові арифметичні середні ± похибка	25,65±0,66	6,15±0,128	0,33±0,015

Примітка: ¹⁾ показники розраховані на вибірках 7-10 рослин кожного генотипу.

Від Аврори в бік більшого розвитку ознаки відрізнялися лінії, середнє значення яких було $\geq 0,32$: 8.7/3-1, 23.1/3-1, 29.5/5-1–46.4/3-1, 44.1/2-1–45.3/1-2, 47.4/1-1–72.2/3-1. Ті самі лінії не відрізнялися від Авротіки або відрізнялися від неї в більший бік за об'ємом рідини, що витісняється.

Таблиця 3.13

Результати дисперсійного аналізу мінливості інтрогресивних ліній, вирощених у пакетах у 2015 році, за ознакою об'єм рідини, що витісняється

Джерело мінливості	Сума квадратів	Кількість ступенів свободи	Дисперсія	Значення F	
				фактичне	Табличне
Загальна	4,99	295	0,0169		$F_{0,05}=1,46$ $F_{0,01}=1,7$
Факторіальна	2,32	33	0,0704	6,92	
Залишкова	2,66	262	0,0102		

Всі досліджувані лінії раніше отримали характеристику щодо наявності в їхніх хромосомах 5-ої гомеологічної групи мікросателітних маркерів з алелями, властивими Аврорі чи Авротиці [11]. У таблиці 3.14 зведено дані про обсяг витісненої рідини для вивчених ліній за результатами вивчення структури хромосом 5-ої групи щодо наявності алелів, специфічних для Авротіки, а не для Аврори, для хромосом 5A, 5B та 5D. Назва мікросателітного локуса у таблиці 3.14 вказана саме в тому випадку, коли лінія мала алель, специфічний для Авротіки. Якщо алель специфічний Аврорі, назву мікросателітного локуса не вказували.

Таблиця 3.14

Номери мікросателітних локусів (у клітинках), специфічних для хромосом 5-ої гомеологічної групи¹⁾, за якими досліджувані лінії характеризуються алелями, властивими Авротіці

Хромо- сома	Номер лінії (обсяг рідини, що витісняється коренями)									
	8.7(0,4²⁾)	21.4(0,31)	21.5(0,26)	23.1(0,32)	23.2(0,19)	24.1(0,24)	24.2(0,19)	24.3(0,23)	24.4-5(0,28)	24.4-10(0,5)
5A	752	752	752	752	752	752	752	752	752	752
	291	291	291	291	291	—	—	—	—	—
	47	47	47	47	47	47	47	47	47	47
5B	289	—	—	—	—	—	—	289	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	160	—	—	—	—	160	—	160	—	—
5D	190	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	182	—	—	—	—	—	—	182	—	—
	102	—	—	—	—	—	—	102	—	—
	272	—	—	—	—	272	272	272	272	272

Продовження табл. 3.14

Хромо- сома	Номер лінії (обсяг рідини, що витісняється коренями)										
	26.19(0,31)	26.2(0,23)	29.5(0,4)	30.2-1(0,4)	30.2-5(0,4)	40.5(0,4)	41.2(0,4)	42.1-5(0,5)	42.1-7(0,5)	43.1(0,5)	46.4(0,4)
5A	—	752	752	752	752	752	—	—	—	752	752
	291	—	291	291	291	291	291	291	291	291	291
	47	47	47	47	47	47	47	47	47	47	47
5B	—	—	289	289	289	—	—	—	—	—	—
	—	—	7	7	7	—	—	—	—	—	—
	—	—	160	160	160	—	—	—	—	—	—
5D	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	182	182	—	—	—	—	—	—
	—	—	102	102	102	—	—	—	—	—	—
	272	272	272	272	272	—	—	—	—	—	—

Продовження табл. 3.14

Хромо-сома	Номер лінії (обсяг рідини, що витісняється кореннями)										
	43.5(0,3))	44.1(0,3)	44.2(0,4)	45.3(0,4)	46.3(0,29)	47.4(0,3)	53.1(0,4)	72.2(0,3)	72.5(0,3)	91.4-7(0,31)	91.4-8(0,25)
5A	752	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	291	291	291	291	291	291	291	291	291	291	291
	47	47	47	47	47	47	47	47	47	47	47
5B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	289	289
	—	—	—	7	—	—	—	—	7	7	7
	—	—	—	160	—	—	—	—	—	160	160
5D	—	—	—	—	—	—	—	—	—	190	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	102	102	—	102	—
	—	—	—	—	—	—	272	—	—	272	—

¹⁾ повна назва SSR-локусів: *Xwmc* 752, *Xgwm* 291, *Xcfd* 47, *Xwmc* 289, *Xwmc* 160, *Xgwm* 190, *Xcfd* 102, *Xgwm* 272 [Єфіменко, 2014]

²⁾ жирним шрифтом позначено показники, що статистично відрізняються від показника Аврори в більший бік.

Було припущено, що формування у інтрогресивних ліній кореневої системи типу Авротіки зі збільшеним об'ємом рідини, що витісняється, може бути пов'язано з включенням чужинного генетичного матеріалу (геном Т Авротіки) до однієї з хромосом 5-ої гомеологічної групи. Для перевірки цього припущення порівнювали кількості ліній з великим чи малим об'ємом рідини, що витісняється кореневою системою, які мають чи не мають специфічних (маркерних) для хромосоми 5Т алелів мікросателітних локусів замість маркерів, специфічних для субгеномів А, В та D пшениці (табл. 3.15).

Таблиця 3.15

Перевірка однорідності розподілів ліній по групах за ознакою обсяг витісненої рідини та наявності маркерів хромосоми 5Т для мікросателітних локусів, специфічних до хромосом трьох субгеномів пшениці

Специфічність SSR-локусів	Фактори, що враховуються при групуванні ліній	Високий показник за обсягом витісненої рідини	Низький показник за обсягом витісненої рідини	Значення точного критерію Фішера
до субгеному А	Маркери хромосоми 5Т наявні	12	6	P=0,03
	Маркери хромосоми 5Т відсутні	4	10	
до субгеному В	Маркери хромосоми 5Т наявні	4	2	P=0,30
	Маркери хромосоми 5Т відсутні	12	13	
до субгеному D	Маркери хромосоми 5Т наявні	3	1	P=0,25
	Маркери хромосоми 5Т відсутні	13	15	

Отримані результати свідчать, що формування більш розвиненої кореневої системи, якщо ступінь розвитку оцінювати за обсягом рідини, яка витісняється коренями при їхньому зануренні у посудину з рідиною, статистично значуще пов'язано з наявністю маркерів (алелів SSR-локусів) хромосоми 5Т замість маркерів хромосоми 5А. Ці результати можна розглядати як вказівку на можливий зв'язок з хромосомою 5А пшениці гена (генів), які якимось чином беруть участь у формуванні кореневої системи пшениці.

3.3.1.2. Оцінка кореневої системи рослин, вирощених у полі за умов проходження природного загартовування. Насіння тих самих ліній, що їхнє дослідження описано у попередньому підпункті, було висіяне у полі під зиму для проходження всіх стадій онтогенезу за природних умов. При цьому їх можна було оцінити не тільки за ознаками розвитку кореневої системи, а і за кущистістю та успішністю зимування. Успішність зимування оцінювали як кількість рослин, які після зими збереглися та перейшли до стадії колосіння. Ці рослини оцінювали також за кількістю продуктивних стебел (продуктивна кущистість) (табл. 3.16).

Таблиця 3.16

Показники розвитку кореневої системи та кущистості рослин, вирощених у польових умовах

Генотипи	Арифметичне середнє ($\bar{X}$) та стандартне відхилення (S_x) за ознаками кореневої системи			Кущистість ($\bar{X} \pm S_x$)	Відношення об'єм / кущистість
	Кількість коренів	Максимальна довжина	Обсяг витісненої рідини		
Аврора	20,2±6,14	19,6±2,97	1,3±0,45	5,7±2,06	0,22
Авротіка	16,2±4,14	19,5±6,78	1,6±0,38	2,9±1,30	0,55
8.7/3-1	15,0±3,67	19,8±5,21	1,0±0,11	3,0±1,13	0,33
21.4/6-1	26,4±9,32	15,0±2,92	2,7±1,04 ¹⁾	2,7±1,11	1 ²⁾

Генотипи	Арифметичне середнє ($\bar{X}$) та стандартне відхилення (S_x) за ознаками кореневої системи			Кущистість ($\bar{X} \pm S_x$)	Відношення об'єм / кущистість
	Кількість коренів	Максимальна довжина	Обсяг витісненої рідини		
21.5/2-1	25,2±6,65	15,8±2,68	1,9±0,78	3,8±2,04	0,5
23.1/3-1	31,0±9,35	16,8±2,77	2,3±1,18 ¹⁾	4,3±1,93	0,53 ²⁾
23.2/3-3	20,2±4,97	13,9±3,78	1,8±0,68	4,1±2,59	0,44
24.1/1-1	32,4±6,94	15,8±2,77	3,1±1,59 ¹⁾	3,0±1,21	1,03 ²⁾
24.2/2-1	28,2±6,26	15,4±2,61	2,4±1,17 ¹⁾	2,3±1,18	1,04 ²⁾
24.3/4-1	26,6±1,14	15,2±2,17	2,6±0,23 ¹⁾	3,1±1,2	0,84 ²⁾
24.4/1-1	34,8±7,09	16,5±1,73	3,4±0,64 ¹⁾	3,7±1,83	0,92 ²⁾
24.4/9-1	26,4±6,99	12,4±1,67	2,34±0,66 ¹⁾	4,2±1,59	0,56 ²⁾
26.1/3-1	26,6±7,23	17,1±2,40	1,7±0,85	3,9±2,06	0,43
26.2/9-1	22,2±9,49	14,1±3,65	1,1±0,53	5,0±1,9	0,22
29.5/5-1	21,6±7,23	19,2±5,45	2,1±0,99	6,2±2,59	0,34
30.2/3-1	20,8±4,57	19,4±3,09	1,6±0,8	5,7±2,06	0,28
30.2/9-1	26,5±8,96	23,0±2,00	2,5±1,37 ¹⁾	6,0±2,77	0,42
40.5/3-1	18,0±4,69	16,8±2,39	1,4±0,68	6,5±2,39	0,22
41.2/2-1	24,8±3,42	1,2±1,30	1,8±0,78	6,5±2,32	0,28
42.1/1-1	22,5±4,72	16,8±4,62	1,5±0,27	4,8±2,04	0,31
42.1/9-1	22,0±4,64	17,8±2,77	2,5±0,34 ¹⁾	5,2±2,42	0,48
43.1/7-1	23,8±9,14	19,0±4,06	2,5±1,25 ¹⁾	4,4±2,43	0,57 ²⁾
46.4/3-1	19,6±7,96	17,6±2,04	1,2±0,55	4,4±2,74	0,27
43.5/10-1	17,4±0,89	18,7±2,20	1,5±0,30	3,5±1,76	0,43
44.1/2-1	23,8±3,35	17,3±3,49	2,2±0,31	3,1±1,36	0,71 ²⁾
44.2/1-1	21,4±2,70	17,7±2,22	1,94±0,38	3,2±1,20	0,66 ²⁾

Генотипи	Арифметичне середнє ($\bar{X}$) та стандартне відхилення (S_x) за ознаками кореневої системи			Кущистість ($\bar{X} \pm S_x$)	Відношення об'єм / кущистість
	Кількість коренів	Максимальна довжина	Обсяг витісненої рідини		
45.3/1-2	17,4±3,91	18,8±2,17	1,1±0,39	3,7±1,87	0,3
46.3/8-1	21,3±6,65	18,9±6,34	1,7±0,53	3,2±2,08	0,53
47.4/1-1	22,8±9,42	20,6±5,73	1,8±1,04	4,8±2,64	0,37
53.1/1-2	14,2±3,70	16,6±2,97	0,9±0,34	3,9±1,73	0,23
72.2/3-1	22,2±4,21	19,6±2,77	1,3±0,38	5,1±2,46	0,25
72.5/1-1	21,6±6,54	18,5±2,19	1,3±0,54	3,6±1,99	0,36
91.4/2-1	19,8±2,68	18,0±2,55	1,4±0,24	3,4±1,62	0,41
91.4/4-1	22,0±3,32	16,9±0,89	1,9±0,53	3,7±1,56	0,51 ²⁾

Примітки: ¹⁾ об'єм витісненої рідини не відрізняється від такого показника для Авротіки; ²⁾ відношення об'єм / кущистість перебільшує межеву величину 0,5 (пояснення у тексті).

Порівняння Аврори та Авротіки за вивченими ознаками показало, що зберігається відсутність різниці між ними за максимальною довжиною коренів ($t=1,7$, $p>0,05$), кількістю коренів ($t=0,04$, $p>0,05$) і немає різниці за обсягом витісненої рідини ($t=1,6$, $p>0,05$). Останній факт має природне пояснення. Коли рослини вирощували в пакетах, була можливість оцінити дійсно повний обсяг коріння, оскільки пакет розрізали та відмивали від ґрунту всю масу корінців. При оцінці рослин, вирощених у полі, рослину викопували лопатою, частина корінців залишалася в ґрунті, і ми не мали можливості оцінити ознаку з такою самою точністю, як у попередньому випадку. Тим не менш, дисперсійний аналіз за участю всіх досліджуваних ліній, Авротіки та Аврори показав, що гетерогенність серед оцінених рослин все ж присутня (табл. 3.17). Значущість

показника F свідчить, що різниця за обсягом рідини, що витісняється, зберігається між окремими інтрогресивними лініями навіть тоді, коли такої різниці не виявлено для коренів Аврори та Авротіки.

Таблиця 3.17

Результати дисперсійного аналізу мінливості інтрогресивних ліній, вирощених у польових умовах, за ознакою об'єм рідини, що витісняється

Джерело мінливості	Сума квадратів	Кількість ступенів свободи	Дисперсія	Значення F	
				фактичне	табличне
Загальна	133,13	166	0,8		F _{0,05} =1,53 F _{0,01} =1,83
Факторіальна	59,85	33	1,81	3,29	
Залишкова	73,28	133	0,55		

За кількістю продуктивних стебел (кущистість, табл. 3.16) Аврора значуще перевершує Авротіку ($t=3,64$, $p<0,01$). Якщо взяти до уваги одночасно дві ознаки, об'єм рідини, що витісняється кореневою системою (позначимо далі як «об'єм коренів»), та кущистість, та охарактеризувати лінії їхнім співвідношенням, отримуємо виразний результат (табл. 3.16). Аврора відрізняється від Авротіки за співвідношенням об'єм коренів/кущистість у менший бік вдвічі: 0,23 та 0,55, відповідно. Якщо за межеву величину показника взяти 0,5 і відмітити у таблиці 3.16 лінії, які за цим співвідношенням не відрізняються від величини 0,5 або її перебільшують, можна порівняти результати цієї відносної оцінки розвитку кореневої системи з прямою оцінкою, виконаною через вимірювання об'єму рідини, що витісняється. Зрозуміло, що відношення об'єму коренів (витісненої рідини) до кущистості характеризує масу коренів, яка припадає на масу продуктивних стебел рослини. У таблиці 3.16 відмічено лінії, які перебільшують межевий показник за кожною з оцінок, прямою та відносною. Маємо 10 ліній зі збільшеним об'ємом коренів. З них 8 ліній характеризуються рівнем відношення обсяг/кущистість більше ніж 0,5. І навпаки, 8 рослин із 11, що характеризуються високим показником відношення

об'єм коренів/кущистість відхилялись від межевого значення у більший бік при оцінці об'єму витісненої рідини коренями. Використання двобічного точного критерію Фішера для перевірки чотирипільної таблиці (табл. 3.18). дає значення $P=0,00106$, тобто розподіл варіант по групах класифікації не є випадковим.

Таблиця 3.18

Розподіл інтрогресивних ліній за двома ознаками: об'єм коренів та відношення об'єму коренів до кількості стебел рослини

	Об'єм коренів великий	Об'єм коренів малий
Відношення об'єм коренів/кущистість $>0,5$	8	3
Відношення об'єм коренів/кущистість $<0,5$	2	19

При двох спробах оцінки ознаки, вирощування у пакетах та вирощування у полі, 23 лінії з 32 вивчених виявили відхилення від Аврори у бік збільшення об'єму рідини, що витісняється. Проте лише чотирьох з них, це лінії 23.1/3-1, 30.2/9-1, 42.1/9-1 та 43.1/7-1, отримали однакову оцінку в обох випадках (табл 3.19). Вміст цієї таблиці чітко показує, що інформативним для характеристики рослин щодо міцності розвитку кореневої системи є не просто об'єм коренів, а те, яка кількість цього об'єму припадає на продуктивне стебло.

Щоб зрозуміти, чи відбивається об'єм коренів, який припадає на продуктивне стебло рослини, на її здатності перенести зимовий стрес, потрібно отримані дані зіставити з результатами оцінки здатності інтрогресивних ліній до перезимівлі.

Таблиця 3.19

Лінії, які відрізняються від Аврори в бік більш міцного розвитку кореневої системи при різних оцінках цієї ознаки (позначено як «+»)

Оцінку ліній зроблено за умов	Номери ліній															
	8.7/3-1	21.4/6-1	21.5/2-1	23.1/3-1	23.2/3-3	24.1/8-1	24.2/2-1	24.3/4-1	24.4/1-1	24.4/9-1	26.1/3-1	26.2/9-1	29.5/5-1	30.2/3-1	30.2/9-1	40.5/3-1
Вирощування рослин у пакетах	+			+									+	+	+	+
Вирощування рослин у полі		+		+		+	+	+	+	+					+	
Визначення співвідношення об'єм/кущистіс ть		+		+		+	+	+	+	+						
Оцінку ліній зроблено за умов	Номери ліній															
	41.2/2-1	42.1/1-1	42.1/9-1	43.1/7-1	46.4/3-1	43.5/10-1	44.1/2-1	44.2/1-1	45.3/1-2	46.3/8-1	47.4/1-1	53.1/1-2	72.2/3-1	72.5/1-1	91.4/2-1	91.4/4-1
Вирощування рослин у пакетах	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+			
Вирощування рослин у полі			+	+												
Визначення співвідношення об'єм/кущистіс ть				+			+	+								+

3.3.2. Оцінка перезимівлі рослин, вирощених у полі за умов проходження природного загартовування. Аврора, Авротіка та 32 лінії, вирощених у полі, отримали оцінку за зимостійкістю як кількість рослин у рядку, які успішно перезимували та дійшли до стадії колосіння (табл. 3.20). Зразки було висіяно в двох повторностях, у таблиці наведено середнє значення з двох рядків, закруглене у більший бік. Зима 2014-15 року, яку пережили рослини, була сприятливою, принаймні в тій місцевості, де рослини зростали,

тому Аврора перезимувала добре. Оцінка пере зими в ліній коливалася від $30 \pm 10,2\%$ до $90 \pm 6,7\%$.

Таблиця 3.20

Кількість рослин Аврори, Авротіки та інтрогресивних ліній, які перезимували та досягли стадії колосіння

Зразок	Кількість рослин	Зразок	Кількість рослин	Зразок	Кількість рослин
Аврора	12	26.1/3-1	13	44.1/2-1	16
Авротіка	15	26.2/9-1	11	44.2/1-1	9
8.7/3-1	12	29.5/5-1	15	45.3/1-2	16
21.4/6-1	13	30.2/3-1	15	46.3/8-1	15
21.5/2-1	6	30.2/9-1	20	47.4/1-1	11
23.1/3-1	13	40.5/3-1	14	53.1/1-2	12
23.2/3-3	11	41.2/2-1	15	72.2/3-1	14
24.1/1-1	16	42.1/1-1	12	72.5/1-1	7
24.2/2-1	15	42.1/9-1	18	91.4/2-1	17
24.3/4-1	16	43.1/7-1	16	91.4/4-1	18
24.4/1-1	15	46.4/3-1	17		
24.4/9-1	17	43.5/10-1	13		

Серед 11 ліній (21.4/6-1, 23.1/3-1, 24.1/1-1, 24.2/2-1, 24.3/4-1, 24.4/1-1, 24.4/9-1, 43.1/7-1, 44.1/2-1, 44.2/1-1, 91.4/4-1), які характеризуються високим показником за відношенням об'єм коренів /кущистість (табл 3.16), всі лінії, крім лінії 44.2/1-1, показали більш високий відсоток рослин, що вижили, порівняно з показником Аврори, хоча статистично на маленьких вибірках це не доводиться. Лінія 44.2/1-1 має досить низьку кущистість, тому відношення об'єм/кущистість є великим незважаючи на відносно невелике значення чисельнику. Серед ліній, які за відношенням об'єм коренів/кущистість наближаються до Аврори, лінії 46.4/3-1, 45.3/1-2 та 91.4/2-1 характеризуються

високим відсотком виживання. Дві перші з них мали високий показник об'єму коренів при вирощуванні у пакетах, але не в полі.

Отримані результати дають змогу припустити, що стійкість рослин ліній до зимових стресових умов пов'язана з об'ємом кореневої системи відносно об'єму продуктивної кущистості. Збільшення цього співвідношення впливає позитивно на потенціал зимостійкості рослин, навіть якщо це відбувається за рахунок зменшення кількості продуктивних стебел. Це припущення підтверджується статистично значущим коефіцієнтом кореляції Спірмена ($r_s=0,45$ при табличних значеннях 0,35 на рівні для $p=0,05$ та 0,45 для $p=0,01$) між кількістю рослин, що перезимували (табл 3.20) та відношенням об'єму витісненої рідини до продуктивної кущистості (табл 3.16). Коли рослини вирощували у пакетах, Авротіка значуще перевищувала Аврору за обсягом витісненої рідини за абсолютним показником. Ми вважаємо, що в цьому випадку змогли зробити більш точний вимір ознаки через меншу втрату коренів при викопуванні рослини із землі, особливо більш заглибленої її частини. За умов вирощування в полі, різниці між Авророю та Авротікою за обсягом витісненої рідини вже не реєстрували і ми це пов'язуємо з систематичною помилкою досліду, втрати коренів нижнього ярусу, яка більш значною є для Авротіки. Перевагу перед Авророю Авротіка набуває лише за відносним показником, обсяг кореневої системи, що припадає на продуктивне стебло.

Оскільки Аврора і Авротіка, які помітно та постійно відрізняються за здатністю переживати зимові стреси, не відрізняються одна від одної за максимальною довжиною коренів та їхньою кількістю, але відрізняються за об'ємом рідини, яку витісняють їхні корені при зануренні у посудину з рідиною, об'єм кореневої системи Авротіки збільшується за рахунок іншої, у порівнянні з Авророю, архітектурою кореневої системи.

Можливо, бічні корені Авротіки, які відходять від центральних коренів, більш численні, та відходять під іншим кутом, а також є товстішими. Не можна виключити, що у формуванні кореневої системи Авротіки провідна роль належить ембріональним кореням та їхньому подальшому розвитку у

порівнянні з Авророю, більш висока кущистість якої, може бути пов'язана з переважним розвитком постембріональних коренів. Вони розташовані більш поверхнево та можуть виявляти більшу залежність від зимових стресів, ніж більш заглиблені ембріональні корені.

Принаймні один з генів, що беруть участь у формоутворенні коренів, може бути розташований на 5А хромосомі пшениці. За нашими даними оцінки зимостійкості та розвитку кореневої системи, зіставленими з результатами мікросателітного аналізу, виконаного на тих самих лініях (табл. 3.14 та 3.20) підвищеною зимостійкістю характеризуються лінії, в геномі яких відбулася заміна генетичного матеріалу сорту Аврори, розташованого на хромосомі 5А, на чужинний генетичний матеріал Авротіки. Мікросателіти, які вивчалися, розташовані у середині короткого плеча хромосоми 5А (локус 752) та на дистальному кінці довгого плеча (локуси 291 та 47). Алель локусу 291, специфічний для Авротіки, реєструвався у різних ліній, як з високим показником об'єму витісненої рідини, так і з низьким. Однак у ліній з високим показником за цією ознакою він реєструвався завжди без жодного виключення. Це дає змогу припустити, що відбулося або чужинне заміщення 5А/5Т, або утворилася рекомбінантна хромосома, яка включає до свого вкладу фрагменти обох хромосом. Зв'язку між мікросателітними локусами, специфічними до хромосом 5В та 5D, розвитком кореневої системи та зимостійкістю в дослідженні не спостерігалось [98].

3.3.3. Спроба ідентифікації генів-кандидатів на участь у формуванні кореневої системи. Розвиток коренів – складний морфогенетичний процес. Розвиток бічних коренів організований у чотири стадії: 1 – ініціація бічних коренів, 2 – формування примордіїв бічних коренів, 3 – розвиток меристеми бічного кореня та відділення бічного кореня від материнського кореня, 4 – видовження бічного кореня. Всі стадії можуть впливати на кількість та радіальну орієнтація бічних коренів [105], включають певні події, і всі вони пов'язані з регуляцією експресії генів. Тому першим кроком у ідентифікації

генів-кандидатів був пошук у науковій літературі інформації про гомологів таких генів, що вже встановлені для інших рослинних видів.

Одна з груп транскрипційних факторів, що регулюють розвиток кореня *Arabidopsis*, це Auxin Response Factor (ARF). Активність ARF залежить від наявності у клітині ауксину. За відсутності ауксину або його низької концентрації, AUX/IAA білки, негативні регулятори ауксин-залежних генів, зв'язуються з ARF, інактивуючи їх. Коли концентрація ауксину в клітині зростає, фактори ARF вже не зв'язані з Aux/IAA білками, вони є вільними для того, щоб розпізнавати і зв'язуватися з ARE (auxin-responsive elements), що знаходяться в промоторах цільових генів, активуючи або пригнічуючи їхню експресію. За високих концентрацій ауксину AUX/IAA білки направляються на деградацію до SCF^{TIR}E3-убіквітин лігазного комплексу [83, 88]. Регулятори AUX/IAA-ARF відіграють важливу роль на першій стадії розвитку бічних коренів (ініціація), коли відбуваються зміни в перициклі материнського кореня у *Arabidopsis*. Вони забезпечують специфікацію клітин, які будуть давати початок бічним кореням (LR founder cells) [83]. Ця специфікація відбувається за рахунок осциляцій вмісту ауксину. Ауксин є основним гормоном сигналювання для регуляції розвитку примордіїв бічних коренів, що забезпечується через формування градієнту ауксину. Цей градієнт підтримується завдяки антагоністичній дії цитокінінів, що впливають на локалізацію експортерів ауксину – білків PIN [83].

Друга група транскрипційних факторів, що впливають на ініціацію коренеутворення, це SHORTROOT (SHR) та його цільовий білок SCARECROW (SCR). Вони не лише беруть участь у специфікації та визначенні локалізації стовбурових клітин та центру спокою апікальної частини кореня (QC), визначаючи тим самим радіальну структуру кореня, а і впливають на ініціацію первинних коренів, діаметр кореня, беруть участь в регуляції поділу клітин та їхнього диференціювання для подальшого розвитку бічних коренів [117; 170].

Для стадії відділення бічного кореня від материнського кореня важливими є гени, що кодують ензими, які забезпечують розм'якшення

клітинної стінки, зокрема, фосфоліпаза A2 (PLA2), пектинметилтрансферази (PME), полігалактуроноза (PG), експанзин (EXP17) та глікозилгідролаза (GLH17) [27].

На стадії елонгації бічних коренів, яка відбувається вже після їхнього відділення від материнського кореня, важливою є третя група транскрипційних факторів це DELLA, що включають білки арабідопсис GIBBERELLIN INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GAI (RGA) та RGA-LIKE1, RGA-LIKE2, RGA-LIKE3 (RGL1, RGL2, RGL3), білок рису SLENDER RICE (SLR) та його гомолог у ячменю. Ці білки є негативними регуляторами гіберелін-залежного шляху та негативно регулюються ауксином. Убіквітинування та деградація цих DELLA транскрипційних факторів за присутності ауксину та гібереліну дозволяє відбутися поділу та елонгації клітин кореня. Видовження (елонгація) впливає на довжину і кут росту бічних коренів, їхній потенціал до розгалуження і все це є важливими характеристиками архітектури кореневої системи. У *Arabidopsis* відомо три гени – *PLETORA 1* і *2* (*PLT1*, *PLT2*) та *CLAVATA3* (*CLV3*), які є необхідними для підтримання центру спокою та ніші стовбурових клітин кореня, що забезпечують видовження бічного кореня. У мутантів за цими генами не зберігаються стовбурові клітини і центр спокою і, відповідно, припиняється елонгація кореня [27; 105].

На іншому модельному об'єкті, *Oryza sativa*, через позиційне клонування було ідентифіковано низку генів, які також визнані важливими для формування кореневої системи. Це *PHOSPHORUS UPTAKE 1* (*PUP1*), пізніше назву було змінено на *PHOSPHORUS-STARVATION TOLERANCE 1* (*PSTOL1*), за даними сиквенсу кодує рецептор-подібну цитоплазматичну кіназу [76]. За умов надекспресії цього гена, збільшується вміст фосфору в рослині та покращується врожайність на 60% за умов нестачі фосфору в ґрунті. Дія цього гена проявляється через його позитивний вплив на ранні стадії розвитку коренів, внаслідок чого рослини з надекспресією цього гена мають загалом більш розвинену кореневу систему – більша довжина та поверхня коренів, що сприяє кращому поглинанню з ґрунту фосфору та інших компонентів

мінерального живлення (нітроген, калій тощо). Цей ген експресується в зоні ініціації коренів у вузлу кущіння та зоні кореневої меристеми вузла кущіння в основі пагону. Така локалізація вказує на те, що ген бере участь в регуляції формування та видовження коренів, що беруть початок з вузла кущіння [143; 76].

Другий секвенований ген, пов'язаний з розвитком коренів, це ген *DEEPER ROOTING 1 (DRO1)*, що контролює кут, під яким бічний корінь відгалужується від осового, а це впливає на глибину росту коренів. Ген *DRO1* кодує невідомий білок, що асоційований з плазмалемою. Експресія *DRO1* регулюється вже згаданими транскрипційними факторами *AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF)*. Дія гена *DRO1* полягає в збільшенні кута між коренями та горизонтом, що призводить до проникання коренів на більшу глибину, що може бути важливим для досягання глибоких ґрунтових вод за умов посухи. Вважається, що *DRO1* бере участь у реакції гравітропізму через вплив на елонгацію епідермальних клітин, що дозволяє кореням змінювати напрямок росту залежно від впливу сили тяжіння [204; 205].

Транскрипційний фактор *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 11 (WOX11)* контролює експресію різних *ARRs* (A-type Response Regulators), які є репресорами сигналювання за участю цитокінінів. *WOX11* регулює як ініціацію, так і розвиток коренів, що походять з вузла кущіння. Експресія *WOX 11* індукується ауксином та цитокінінами [237] та відбувається на ранніх стадіях розвитку примордіїв вузлових коренів, а також у апікальній меристемі пагона. Продукт гена репресує негативний регулятор розвитку вузлових коренів – ген *PR2*. У мутантів з нокаутом гена *WOX 11* інгібований ріст вузлових коренів, і навпаки, за надекспресії цього гена більш інтенсивно відбувається поділ клітин вузлових коренів і, отже, спостерігається більш інтенсивний їхній ріст [105].

Використання мутантів з різними порушеннями розвитку кореня дозволило ідентифікувати гени, які виконують різні біологічні функції в процесі розвитку коренів. Деякі з цих генів змінюють розвиток коренів через

вплив на склад клітинної стінки клітин кореня. Наприклад, ген *OsGLU3* кодує зв'язану з мембраною ендо-1,4-глюканазу. У мутантів за цим геном (*Osglu3*) зменшений вміст кристалічної целюлози в стінках клітин кореня та пригнічене видовження клітин кореня. Припускають, що *OsGLU3* впливає на розвиток кореня за умов нестачі Фосфора [235].

Для елонгації клітин важливе значення також мають експанзини. Ген *OsEXPANSIN8* (*OsEXPA8*) специфічно експресується в клітинах кінчика кореня. Рослини з надекспресією гена *OsEXPA8* мають загалом кращі характеристики росту. Такий кращий ріст характерний також для коренів, які є довшими та більше розгалуженими. Такий фенотип пов'язаний із загальним збільшенням здатності клітинної стінки до розтягнення [141].

Основним фітогормоном, що регулює розвиток бічних коренів, визнано ауксин. Зокрема, формування примордіїв бічних коренів регулюється через його градієнт [83]. Відносно нещодавно показано, що MADS box транскрипційні фактори родини AGL (AGAMOUS-LIKE) регулюють розвиток коренів через вплив на ауксин (його біосинтез чи транспорт). Ген *AGL21* кодує MADS box транскрипційний фактор, та експресується в корені, зокрема центральному циліндрі та примордіях бічних коренів. За надекспресії цього гена у рослин розвивається більша кількість і довші бічні корені, а у мутантів *agl21* спостерігається порушення розвитку бічних коренів [227]. *AGL21* позитивно регулює накопичення ауксину в примордіях бічних коренів через регуляцію біосинтезу ауксину, який стимулює ініціація і ріст бічних коренів [227].

Інший транскрипційний MADS box фактор – *XAL2/AGL14* – контролює транспорт ауксину в корені через транскрипційну регуляцію *PIN* генів. Мутанти *agl14* мають порушення меристеми кореня і росту коренів. Транскрипційний фактор *XAL2/AGL14* позитивно регулює експресію генів транспортерів ауксину *PIN1* та *PIN4* через безпосереднє зв'язування з їхніми регуляторними регіонами [79].

Зважаючи на важливу роль ауксину у розвитку бічних коренів і беручи до уваги наявність інформації про нуклеотидні послідовності генів *TaAGL14* та *TaAGL21* *T. aestivum*, було вирішено перевірити інтрогресивні лінії та їхніх прабатьків, Авротіку та Аврору, на наявність поліморфізму за згаданими генами. До дослідження включили також ген *BRI*, оскільки його можна розглядати серед генів-кандидатів, що можуть впливати на розвиток кореневої системи: він кодує рецептор брасиностероїдів, інших рослинних гормонів, які можуть впливати на розвиток коренів [91; 41]. Крім того, добре відомо, що морозостійкість злаків залежить від гена *CBF-A14*, який кодує транскрипційний фактор родини CBF (C-repeat Binding Factor) – один з родини транскрипційних факторів, що є основними транскрипційними регуляторами морозостійкості рослин [147]. Тому праймери було також розроблено до кодуючої частини цього гена пшениці.

3.3.3.1. Аналіз електрофоретичних спектрів Аврори та Авротіки за продуктами ампліфікації, утвореними з праймерами до генів *TaAGL14*, *BRI1*, *CBF-A14*. За результатами ПЛР з праймерами, підібраними з використанням програми Primer 3 [207; 120], різниці між продуктами ампліфікації, утвореними з обома парами праймерів до гена *BRI1* з ДНК Аврори та Авротіки, немає. Було проаналізовано три пари праймерів, до трьох різних частин гена *BRI1*. З третьою парою праймерів продукту виявлено не було. З іншими двома парами праймерів продукт був, але не було різниці між Аврора та Авротіка (рис.3.26).

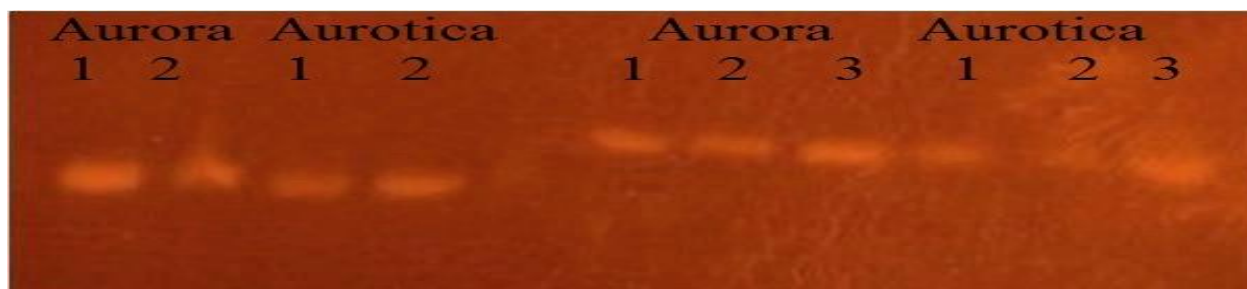


Рис 3.26. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації, утворені з ДНК Аврори та Авротіки з праймерами до гена *BRI1*. Au – Аврора, A-tica –

Авротіка. Спектри перших чотирьох треків отримано з праймерами до праймерів до першої частини гена, *BRI1.1-L*: CGCTCAATCTCTCCAGCAAC, *BRI1.1-R*: GATGCTGCCGGAGAGATAGT; спектри наступних шести треків – з праймерами до другої частини гена, *BRI1.2-L*: CAGCATCAATCTGGCTGCAT, *BRI1.2-R*: CGCCCAGTTCAGCTTTATCC.

Оскільки різниці між Аворою та Авротікою немає, інтрогресивні лінії з цими праймерами не аналізували. Відсутність різниці у послідовностях рецепторного гена *BRI1* у Аврори та Авротіки може свідчити про його високу консервативність через важливість незмінної структури рецептора для правильного функціонування.

З ДНК Аврори та Авротіки дали продукти ампліфікації всі пари праймерів, розроблених для генів *CBF-A14* та *AGL14*. Проте, між ДНК Аврори та Авротіки не було виявлено поліморфізму за спектрами продуктів, отриманих з праймерами до транскрипційних факторів *CBF-A14* (рис. 3.27) та *AGL14*. Отже, інтрогресивні лінії за цими генами не скринували.

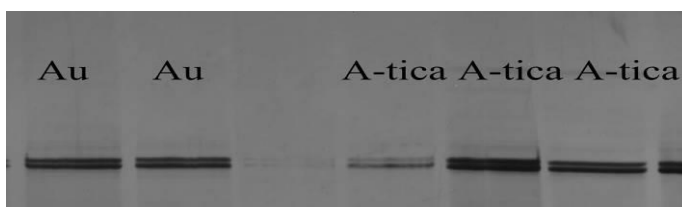


Рис. 3.27. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації, утворених з праймерами до гена *CBF-A14* з ДНК Аврори (Au) та Авротіки (A-tica).

3.3.3.2. Поліморфізм інтрогресивних ліній *Triticum aestivum*/Ae. mutica за геном *TaAGL21*, що бере участь у регуляції розвитку коренів, та їхня зимостійкість. Внаслідок аналізу електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації Аврори і Авротіки, утворених з розробленими праймерами до першої та другої частини гена *TaAGL21* (ген *AGL21* виду *Triticum aestivum*), було показано наявність поліморфізму (один компонент для Аврори та подвійний компонент для амфідиплоїда Авротіка, рис. 3.28) для продуктів ампліфікації, утворених з праймерами до другої частини гена *TaAGL21*

(*TaAGL21-2*). Ці праймери були використані для утворення продуктів ампліфікації з ДНК ліній – похідних Авротіки та аналізу продуктів ампліфікації щодо того, чи вони є схожі за масою на продукт Авротіки, чи на продукт Аврори. Праймери, що використовувались до другої частини гена *AGL21* мають таку послідовність:

TaAGL21-2-L AATGAAGACTCGGCGGTTTG

TaAGL21-2-R TTTTCTCGAGCGTTGTCAGC

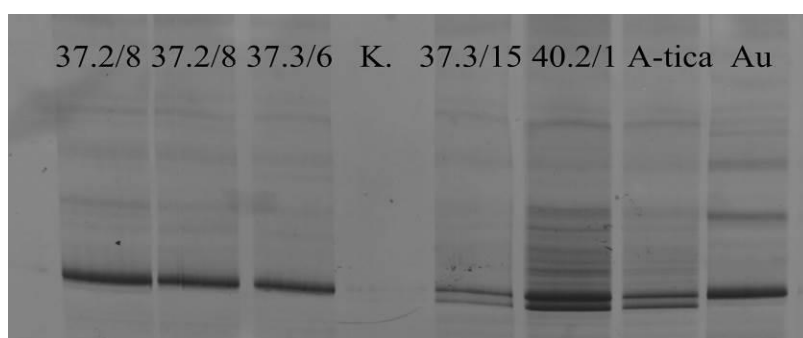


Рис. 3.28. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації з праймерами *TaAGL21-2*. Au – сорт Аврора, A-tica – Авротіка, 37.2/8, 37.3/6, 37.3/15, 40.2/1 – номери інтрогресивних ліній F₅–похідних Авротіки, К – контроль.

Як видно на рисунку 3.28, лінії 37.3/15, 40.2/1 мають спектри, схожі на спектр амфідиплоїда Авротіка (подвійний компонент), а лінії 37.2/8, 37.3/6 мають спектр схожий на Аврору (одинарний компонент спектру). Всього серед 250 проаналізованих рослин інтрогресивних ліній, що перезимували у 2014-2015 році (для багатьох ліній F₅ було проаналізовано більше, ніж одну рослину покоління), було виявлено 55 рослин, що утворювали з праймерами до гена *TaAGL21-2* продукт ампліфікації, що не відрізнявся від продукту Аврори, та 178 рослин, що утворювали такий продукт ампліфікації, як Авротіка. ДНК 17 рослин не дала продуктів ампліфікації. Велика кількість рослин, що мали алель Авротіки, може пояснюватися способом створення інтрогресивних ліній (див. підрозділ 3.1). Рослини F₂ було вирощено у полі для самозапилення. Звичайно, нащадків отримували лише від тих рослин попередньої генерації, які пережили

зимові стреси та виявились фертильними. Отже, під час створення ліній відбувався природний добір життєздатних рослин. Можливо, однією з ознак, яка підпадала під добір, була здатність рослин зимувати. Якщо зимостійкість пов'язана з формуванням кореневої системи, особливості якої залежать від експресії гена *TaAGL21* [227], можна припустити, що саме цим пояснюється, що серед інтрогресивних ліній співвідношення таких, що мають алель Аврори чи алель Авротіки відрізняється від очікуваного 1:1 на користь останніх. Інформацію про алелі за геном *TaAGL21* для ліній, що вивчались за розвитком кореневої системи, наведено у таблиці 3.20. Бачимо, що серед них, як і серед загального пулу інтрогресивних ліній, переважають рослини з алелем «2», властивим Авротіці.

Таблиця 3.20

Алелі інтрогресивних ліній, що вивчались за розвитком кореневої системи, за геном *TaAGL21*

Генотип	Алель гена <i>TaAGL21</i> ¹⁾	Генотип	Алель гена <i>TaAGL2</i>
Аврора	1	40.5/3-1	2
Авротіка	2	41.2/2-1	2
8.7/3-1	2	42.1/1-1	2
21.4/6-1	2	42.1/9-1	2
21.5/2-1	2	43.1/7-1	2
23.1/3-1	1	46.4/3-1	2
23.2/3-3	1	43.5/10-1	2
24.1/1-1	2	44.1/2-1	2
24.2/2-1	1/2 ²⁾	44.2/1-1	2
24.3/4-1	2	45.3/1-2	не визначено
24.4/1-1	1 / 2	46.3/8-1	2
24.4/9-1	1 / 2	47.4/1-1	2
26.1/3-1	2	53.1/1-2	не визначено

26.2/9-1	1	72.2/3-1	не визначено
29.5/5-1	2	72.5/1-1	не визначено
30.2/3-1	1	91.4/2-1	не визначено
30.2/9-1	1	91.4/4-1	не визначено

¹⁾ 1 – спектр як у Аврори, 2 – спектр як у Авротіки

168 ліній з тих, які було генотиповано за алелями гена *TaAGL21* було оцінено за здатністю зимувати в природних польових умовах. Таку здатність оцінювали як кількість рослин, що вижили до весни з тих, що були у рядку восени. Результати, наведені у таблиці 3.21, залишають враження, що краще зимують рослини з алелем гена *TaAGL21*, що є таким, як у Авротіки. Перевірка статистичної значущості гіпотези про те, що лінії, які мають алель гена *TaAGL21*, властивий амфідиплоїду Авротіка, зимують більш успішно у порівнянні з лініями, що мають алель Аврори, підтвердила наявність такої різниці. Порівняння розподілів ліній за класами з різною кількістю рослин, що вижили, методом Колмогорова-Смирнова дало величину $\lambda = 1,72$ при критичному значенні цього показнику 1,63, $p=0,01$ [16]. Зіставлення центральних тенденцій за ранговим критерієм Вілкоксона-Уїлкса підтвердило наявність різниці, оскільки $u = 3,54$ перевищує критичне значення 2,58, $p = 0,01$ [5].

Отже, лінії з алелем гена *TaAGL21*, властивим Авротіці, за успішністю у перенесенні зимових стресів перевищують лінії, яким властивий алель Аврори за цим геном. Можливо, ген можна використовувати як молекулярно-генетичний маркер зимостійкості при скринуванні популяцій, що розщеплюються, отриманих від схрещування інтрогресивних ліній *T. aestivum* / *A. muticum*.

Таблиця 3.21

Результат оцінки зимостійкості інтрогресивних ліній з різними алелями гена

TaAGL21

Кількість рослин, що вижили	Кількість ліній з алелем гена <i>TaAGL21</i>		Кількість рослин, що вижили	Кількість ліній з алелем гена <i>TaAGL21</i>	
	Аврори	Авротіки		Аврори	Авротіки
1	1	3	11	3	9
2	3	5	12	1	6
3	3	6	13	1	2
4	3	8	14	2	8
5	3	14	15	0	21
6	8	7	16	0	3
7	2	4	17	0	1
8	3	11	18	0	1
9	2	5	19	0	0
10	0	17	20	0	2

Оцінку ліній з різними алелями за геном *TaAGL21* було повторено у наступний польовий сезон, 2015-2016 року, коли умови перезимівлі були більш сприятливі через збереження снігового покриву протягом морозного періоду зими. Всього було оцінено 27 ліній, однак кожна з них висівалась на 5–10 рядках. Це дало можливість перевірити варіювання ознаки (кількість рослин, що перезимували) на нормальність розподілу варіантів та скористатися параметричним критерієм Стюдента для порівняння середніх значень за кількістю перезимуваних рослин серед ліній з різними алелями за геном *TaAGL21*. Статистично значущої різниці між лініями з алелем «1» $\bar{x} = 16,5 \pm 0,89$ та «2» $\bar{x} = 16,8 \pm 0,39$ не було ($t=0.31$). Отже, залежність зимостійкості рослин від алелю гена *TaAGL21* не є абсолютною. Вона опосередковується умовами перезимівлі рослин у природних умовах.

Серед цих 27 ліній обрали такі, що за даними оцінки у пакетах за умов природного загартовування виявили підвищений обсяг витісненої рідини. Серед них 7 ліній мали алель «2» за геном *TaAGL21* і середнє значення за перезимуванням $\bar{x} = 17,1 \pm 0,54$ та дві лінії з алелем «1» і середнім значенням $\bar{x} = 11,7 \pm 0,85$. Різниця між ними статистично значуща, $t=5,36$. Виходить, що зимостійкість рослин у якійсь мірі залежить від розвитку їхньої кореневої системи, що не є новиною [67; 211; 212], однак серед рослин з розвинутою кореневою системою краще зимують такі, що мають алель «2» за геном *TaAGL21*, властивий Авротіці. Можна припустити, що алель гена *TaAGL21*, властивий Авротіці, відповідає за утворення транскрипційного фактора, більш ефективного щодо синтезу ауксина. Однак можливо і те, що справа не у формуванні більш ефективного транскрипційного фактора, а в більш ефективній регуляції експресії самого гена *TaAGL21* через зміни у регуляторній частині алеля 2.

Ще одну спробу перевірити можливе залучення гена *TaAGL21* у перезимівлю рослин здійснили на рослинах F_2 від схрещування інтрогресивних ліній Аврора / *Ae. mutica*, отриманих для аналізу іншої важливої ознаки, якою характеризуються інтрогресивні лінії, стійкості до борошнистої роси. Серед розмаїття популяцій F_2 було обрано такі, що пішли від схрещування з м'якою пшеницею (алель «1» за геном *TaAGL21*) таких інтрогресивних ліній, що мали алель «2» за там самим геном. В кожній із таких 11 комбінацій за геном *TaAGL21* генотипували рослини одного рядка, яких восени було 20, а кількість тих, що збереглися, наведено у таблиці 3.22. Крім того, для кожної комбінації схрещування визначили генотип за геном *TaAGL21* у 5–10 паростків F_2 , що вирости у чашках Петрі із насінин (табл. 3.22). Вибірки в межах кожної окремої комбінації були замаленькі для статистичного порівняння. Тому їх спочатку перевірили за допомогою точного критерія Фішера на однорідність розщеплення для можливого об'єднання даних за різними комбінаціями схрещування. Для рослин, з поля найбільш контрастними розщепленнями були

0 «1»–8 «2» та 3 «1»–5 «2» і різниці між ними не було ($P=0,2000$ за двобічним критерієм). Отже, не було різниці і між менш контрастними розподілами, тому дані для всіх популяцій були об'єднані. Для рослин, що перезимували в полі, збереглося 18 з алелем «1» та 113 з алелем «2». Ці обсяги класів відрізняються від очікуваного моногібридного розщеплення 33 «1» та 98 «2», $\chi^2=8,86$. Для рослин, вирощених з насінин у чашках Петрі найбільш контрастними співвідношеннями були 0 «1»–8 «2» та 4 «1»–6 «2» і різниці між ними не було ($P=0,1373$ за двобічним критерієм). Після об'єднання даних по всіх популяціях отримали 19 «1»–75 «2», що не відрізняється від теоретично очікуваних обсягів класів 24 «1»–72 «2», $\chi^2=1,15$.

Таблиця 3.22

Кількості рослин F_2 з різними алелями за геном *TaAGL2*, що перезимували в полі, та вирощені в чашках Петрі

Комбінація схрещування	Рослини F_2 , що перезимували у полі			Паростки F_2 , що вирости в чашках Петрі		
	Зберегл ось до весни з 20 рослин	З алелем «1»	З алелем «2»	Проросло з 10 насінин	З алелем «1»	З алелем «2»
24.3/6 х Аврора	13 ¹⁾	3	9	9 ¹⁾	1	7
24.3/6 х Ніконія	11	2	7	10	2	7
24.5/5 х Аврора	13	1	12	8	0	7
24.5/5 х Ніконія	12	1	11	10	4	6
21.4/8 х Аврора	9	0	8	8	2	3
21.4/8 х Панна	8	3	5	10	1	9
24.1/7 х Аврора	14	0	12	10	2	6
24.1/7 х Панна	13	2	11	9	0	8
24.4/2 х Аврора	14	1	12	10	2	7
29.5/4 х Аврора	19	2	15	10	2	8
29.5/4 х Ніконія	14	3	11	10	3	7

Примітка: ¹⁾ ДНК деяких рослин не давала продукту ампліфікації, тому не всі рослини вдалось генотипувати і число у першому стовпчику не є сумою чисел в двох наступних.

На наш погляд, результати, наведені у таблиці 3.22, підтверджують наше припущення, що рослини з алелем «2» за геном *TaAGL2* мають якусь перевагу для збереження під час зимування у природних умовах перед рослинами з алелем «1». Розглядалось моногібридне розщеплення, тому що гетерозиготи «1/2» від гомозигот «2» за спектром ампліфікації не відрізняються (див. рис 3.28).

У цілому за результатами, наведеними у даному підпункту, можна припустити, що позитивний вплив алеля «2» гена *TaAGL2* на здатність рослин пережити зиму не є однозначним і залежить від умов зростання рослини у узимку, і, можливо, умов загартовування.

3.3.4. Вивчення різниці між Авророю, Авротікою та інтрогресивними лініями за ознаками кореневої системи та поліморфізмом за геном *TaAGL21* на рослинах, вирощених у пакетах без природного загартовування. Корені рослин, вирощених у пакетах до стадії кушіння, було досліджено повторно у 2016 році (табл. 3.23), але умови вирощування були іншими у порівнянні з дослідом 2015 року. У 2015 році пакети з паростками на стадії двох листків вирощувались на вулиці з початку жовтня, і вони формувались у природних умовах загартовування. Відповідно, за таких природних умов загартовування формувалась коренева система. У 2016 році рослини з самого початку проростання насінин знаходились у кімнаті штучного клімату при оптимальних для росту позитивних температурах і стадії загартовування не проходили. В обох випадках рослини вирощувались 2,5 місяці. Експеримент було здійснено з метою встановити, чи залежить розвиток кореневої системи від наявності/відсутності загартовування рослин і чи пов'язаний цей процес з алелем гена *TaAGL21*, властивим лініям. Порівнювали групові та генотипні арифметичні середні з таблиць 3.12 та 3.23.

Таблиця 3.23

Показники розвитку кореневої системи рослин, вирощених у пакетах у світловій кімнаті у 2016 році, та відомості щодо їхнього алелю за геном

TaAGL21

Генотип		Арифметичне середнє ($\bar{X}$) та стандартне відхилення (S_x) за ознаками кореневої системи			Алель за геном <i>AGL21</i> ¹⁾
Номер	Назва	Максимальна довжина	Кількість коренів	Обсяг витісненої рідини	
1	8.7/3-1	21,7±4,53	6,17±0,58	0,09±0,04	2
2	21.4/6-1	26,7±4,96	7,18±1,33	0,11±0,06	2
3	21.5/2-1	27,1±8,40	7,08±1,68	0,14±0,10	2
4	23.1/3-1	28,4±7,09	8,83±1,75	0,15±0,05	1
5	23.2/3-3	29,8±8,12	9,92±1,56	0,16±0,08	1
6	24.1/1-1	23,1±5,27	8,00±1,18	0,10±0,04	2
7	24.2/2-1	24,2±6,08	4,83±1,47	0,17±0,13	1 / 2
8	24.3/4-1	18,4±7,98	6,75±1,29	0,09±0,06	2
9	24.4/1-1	20,8±6,31	7,75±1,36	0,15±0,12	1 / 2
10	24.4/9-1	20,7±4,35	7,42±1,78	0,10±0,04	1/ 2
11	26.1/3-1	24,4±6,68	6,92±1,24	0,12±0,05	2
12	26.2/9-1	19,6±5,40	6,33±1,50	0,04±0,04	1
13	29.5/5-1	21,3±4,65	6,83±0,94	0,04±0,02	2
14	30.2/3-1	21,9±4,14	6,50±0,90	0,05±0,03	1
15	30.2/9-1	16,6±3,87	5,50±1,31	0,01±0,05	1
16	40.5/3-1	19,3±5,36	4,42±1,56	0,02±0,009	2
17	41.2/2-1	22,9±4,68	5,45±1,13	0,08±0,08	2
18	42.1/1-1	16,9±5,10	5,00±1,21	0,05±0,03	2

Генотип		Арифметичне середнє ($\bar{X}$) та стандартне відхилення (S_x) за ознаками кореневої системи			Алель за геном <i>AGL21</i> ¹⁾
Номер	Назва	Максимальна довжина	Кількість коренів	Обсяг витісненої рідини	
19	42.1/9-1	14,9±4,68	5,18±1,40	0,06±0,04	2
20	43.1/7-1	16,8±5,24	4,91±1,22	0,03±0,02	2
21	46.4/3-1	16±4,43	5,00±1,28	0,03±0,02	2
22	43.5/10-1	19,9±5,26	5,25±1,54	0,05±0,03	2
23	44.1/2-1	19,4±6,57	5,33±1,82	0,05±0,04	2
24	44.2/1-1	24,1±6,98	7,18±1,78	0,16±0,04	2
25	45.3/1-2	20,9±5,54	5,92±1,62	0,08±0,05	— ²⁾
26	46.3/8-1	18,8±5,46	5,36±1,57	0,06±0,02	2
27	47.4/1-1	21,5±7,63	5,67±1,37	0,15±0,09	2
28	53.1/1-2	20,1±4,13	7,00±1	0,20±0,15	—
29	72.2/3-1	20,3±4,85	4,67±1	0,09±0,05	—
30	72.5/1-1	18,1±5,39	3,64±1,57	0,02±0,01	—
31	91.4/2-1	19,9±3,87	5,17±1,58	0,02±0,01	—
32	91.4/4-1	18,7±3,80	5,75±1,60	0,06±0,06	—
33	Аврора	18,3±4,43	5,25±1,21	0,02±0,005	1
34	Авротіка	19,1±5,00	4,7±1,49	0,03±0,01	2
Групові арифметичні середні ± похибка		20,9±0,6	6,08±0,23	0,08±0,009	

Примітки: ¹⁾ 1 – спектр як у Аврори, 2 – спектр як у Авротики;

²⁾ не визначено

Ознака довжина коренів. За груповими арифметичними середніми довжина коренів була вище, коли рослини загартовувались у природних умовах

($t=5,33$, $df=66$, $t_{0,01}=2,66$). Далі порівнювали цей показник для двох груп рослин: тих, що мали алель «2» гена *AGL21* (19 інтрогресивних ліній та Авротіка, всього 20 зразків), та тих, що мали алель «1» за цим геном (5 інтрогресивних ліній та Аврора, всього 6 зразків). Статистично значущої різниці зареєстровано не було, проте результати оцінки для двох років були протилежними. За умов загартовування в природних умовах рослини з алелем «2» гена *AGL21* характеризувались дещо довшим коренем порівняно з рослинами з алелем «1» ($26,6 \pm 0,95$ та $24,5 \pm 0,99$, відповідно), без загартовування $20,7 \pm 0,76$ для рослин з алелем «2» та $22,4 \pm 2,23$ з алелем «1». Звичайно, за умов відсутності статистично достовірної різниці висновки зробити не можна. Проте ми розуміємо, що вибірки, особливо рослин з алелем «1» замалі для оперування кількісною ознакою, через це стандартні похибки формуються великими і знижуються значення критерію Стюдента. Певну інформацію про мінливість ознаки в різні роки дослідження дає порівняння нормованих відхилень для кожного зразка (генотипу) за два роки. Нормовані відхилення від групового середнього значення можуть бути односпрямованими, коли генотипні середні значення відхиляються від групового або в позитивний бік в обидва роки, або в негативний. Нормовані відхилення можуть бути різноспрямованими, коли в один рік відхилення позитивне, в другий негативне або навпаки. Коли відхилення односпрямоване, це означає, що у формування фенотипу переважний внесок дає генотип, а взаємодія генотип-середовище менш значуща. Різноспрямованість нормованих відхилень може бути наслідком як взаємодії генотип-середовище, так і значного внеску фактору випадковості при формуванні фенотипу [18].

Нормовані відхилення для всіх 34 генотипів наведено на рис. 3.29 для зразків з алелем «2» – на рисунку 3.30. При порівнянні всіх зразків було 18 різноспрямованими нормованими відхиленнями та 16 з односпрямованими. Статистично це не відрізняється від статистично очікуваних величин при випадкових коливань у мінливості ознаки 17–17 ($\chi^2=0,12$, $\chi^2_{0,05}=3,84$ для $df=1$).

Такий саме результат отримали для групи зразків з алелем «2»: 11 зразків з різноспрямованими відхиленнями, 9 – з односпрямованими, $\chi^2=0,20$.

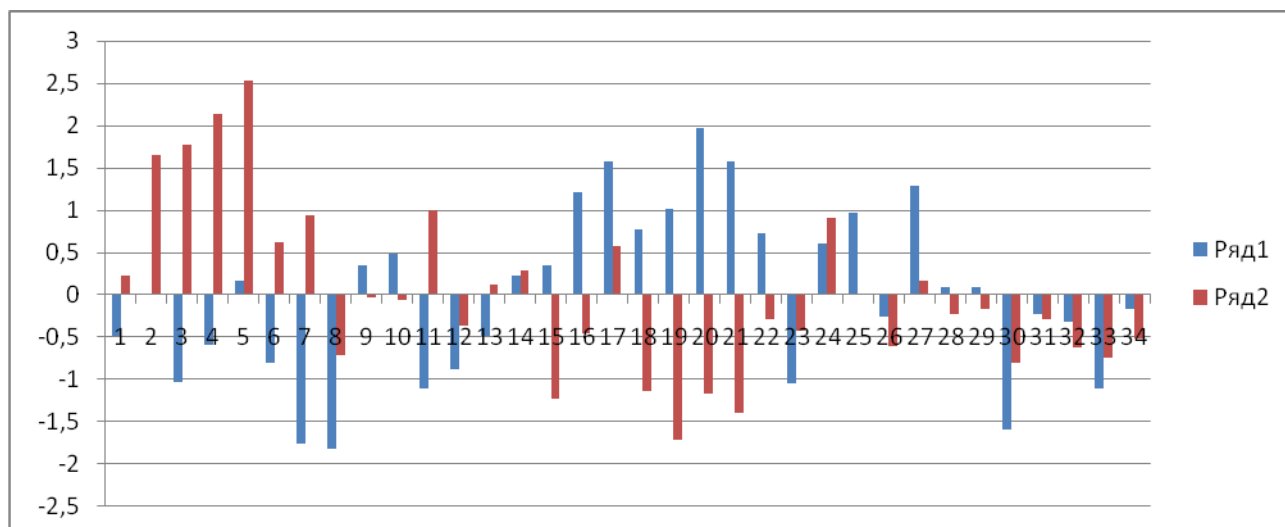


Рис. 3.29. Нормовані відхилення t (за віссю ординат) арифметичних середніх значень всіх зразків (генотипів) за максимальною довжиною кореня у 2015 (ряд 1) та 2016 (ряд 2). На рис. 3.29–3.34 відповідність між числами на осі абсцис та номерами ліній у таблиці 3.23.

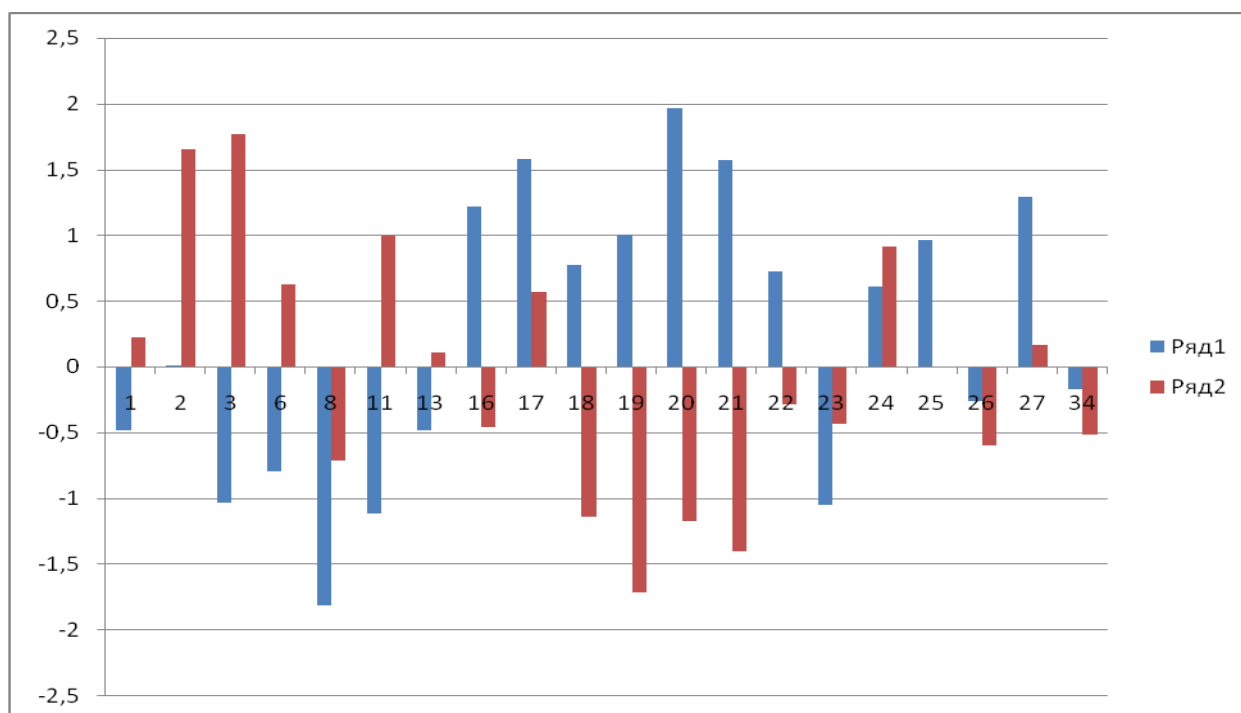


Рис. 3.30. Нормовані відхилення t (за віссю ординат) арифметичних середніх значень зразків з алелем «2» за геном *TaALG1*–34 за максимальною довжиною кореня у 2015 (ряд 1) та 2016 (ряд 2).

На підставі отриманих даних можна лише припустити, що природне загартовування сприяє формуванню більш розвиненої кореневої системи через збільшення довжини коренів за наявності алеля «2» гена *AGL21*, в той час як без загартовування краще розвивається коренева система у рослин з алелем «1» гена *AGL21*. Для доведення цього припущення потрібно збільшити кількість вивчених ліній.

Ознака кількість коренів. За кількістю коренів рослини, вирощені у 2016 році ($6,08 \pm 0,23$), не відрізнялись від таких, вирощених у 2015 році ($6,15 \pm 0,13$, $t = 0,27$, $df = 18$, $t_{0,01} = 2,88$). Схоже, що вираз ознаки від наявності чи відсутності загартовування не залежить. Це припущення підтверджується порівнянням нормованих відхилень в різні роки (рис. 3.31): кількість односпрямованих та різноспрямованих відхилень, 21 та 13, відповідно, однакова ($\chi^2 = 0,12$). Такі саме результати дає порівняння нормованих відхилень у групі зразків з алелем «2»: 8 зразків з різноспрямованими нормованими відхиленнями, 12 зразків з односпрямованими, $\chi^2 = 0,8$ (рис. 3.32).

Отримані результати показують, що кількість коренів, які формують зразки, що пройшли чи не пройшли загартовування, залишається одною і такою самою і залежить, скоріш за все, переважно від генотипу рослин. Група рослин з алелем «2» за геном *TaALG21* за цією ознакою кореневої системи не відрізняється від рослин з алелем «1».

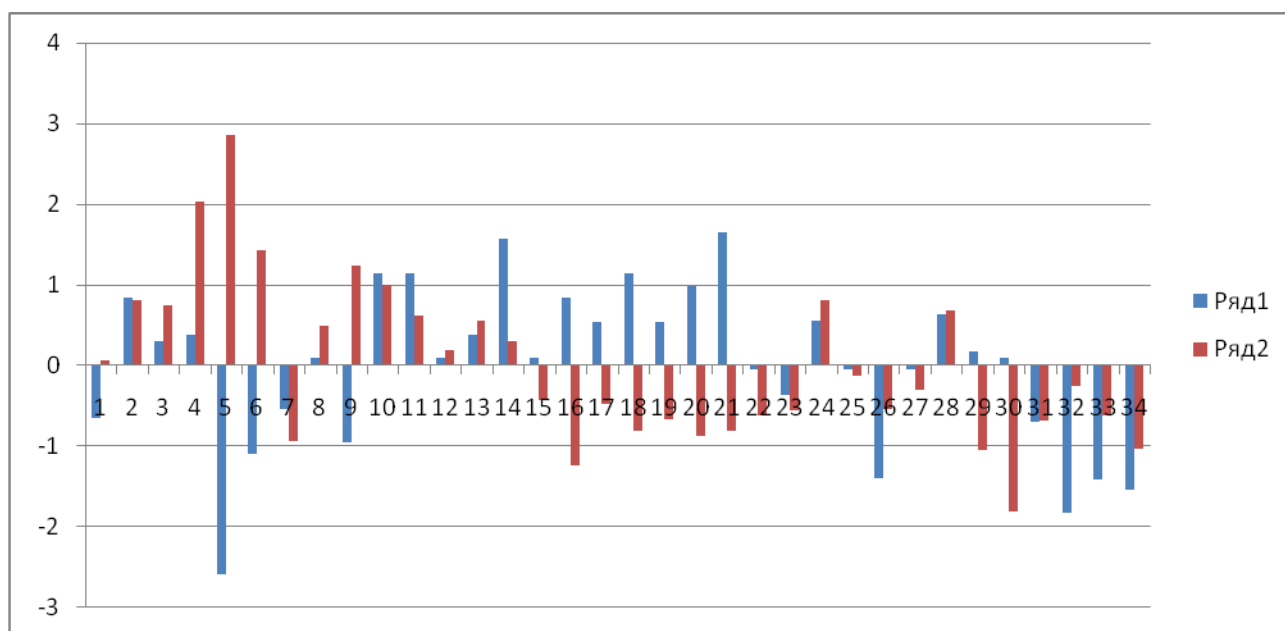


Рис. 3.31. Нормовані відхилення t (за віссю ординат) арифметичних середніх значень зразків 1–34 за кількістю коренів у 2015 (ряд 1) та 2016 (ряд 2).

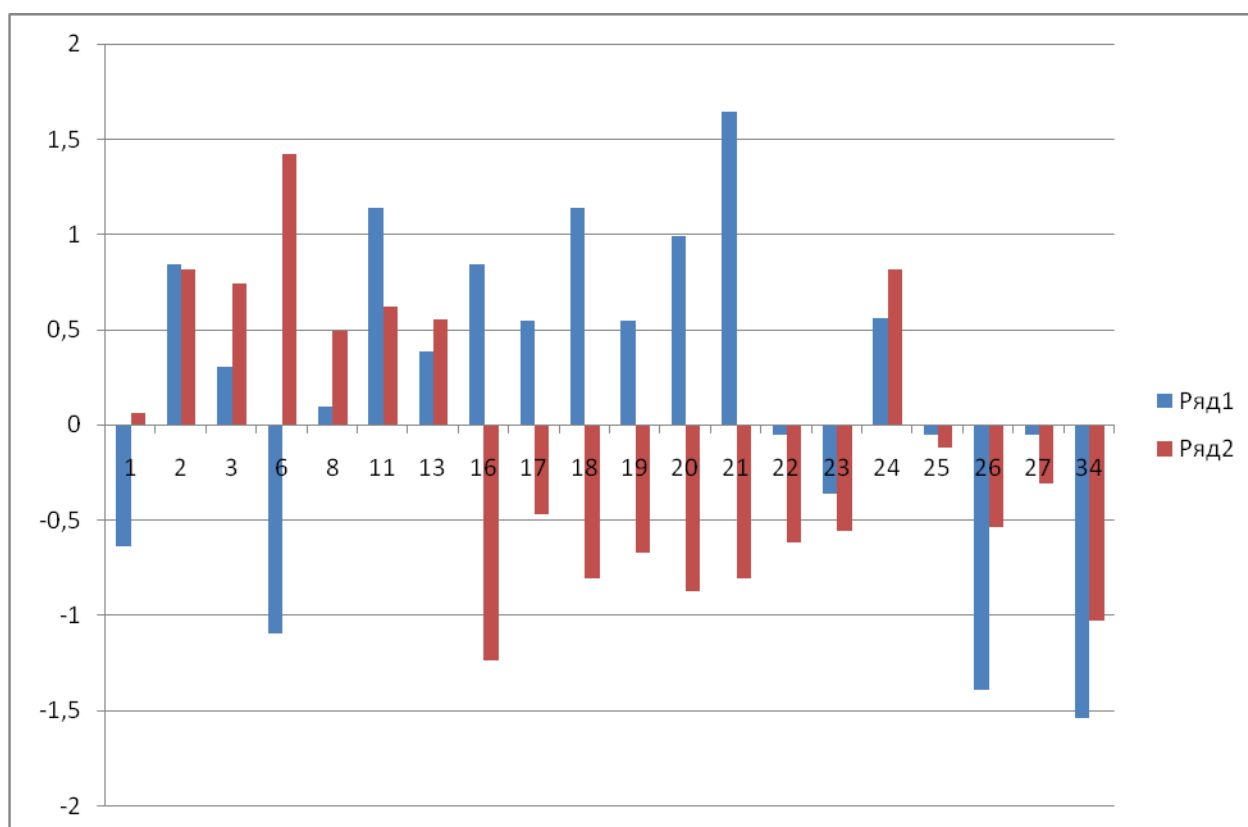


Рис. 3.32. Нормовані відхилення t (за віссю ординат) арифметичних середніх значень зразків з алелем «2» за геном *ALG1*–34 за кількістю коренів у 2015 (ряд 1) та 2016 (ряд 2).

Ознака об'єм витісненої рідини. За об'ємом витісненої рідини рослини Аврори та Авротіки у 2016 році не відрізнялись ($t = 0,52$), хоча рослини Авротіки перевершували за цим показником рослини Аврори у 2015 році значуще ($t=4,81$, $k = 18$, $p<0,01$). Групові середні значення за 2016 та 2015 рік відрізнялись значуще ($0,08\pm0,009$ та $0,33\pm0,015$, відповідно, $t = 14,29$). Звертає на себе увагу той факт, що за відсутністю розбіжностей між роками за кількістю коренів і статистично значущої, хоча і не великої за числовим виразом різниці за довжиною кореня, різниця за обсягом рідини, що витісняється коренями рослин, зареєстрована чотирикратна.

Вивчені зразки було згруповано відповідно до алелю гена *TaALG21*, властивого зразкам. За даними оцінки 2016 року рослини з алелями *TaALG21* «1» та «2», притаманними генотипам Аврора та Авротика, відповідно, мали середні значення за обсягом витісненої рідини, відповідно, $0,07\pm0,066$ та $0,08\pm0,042$, які не відрізнялися. За даними оцінки 2015 року аналогічні значення становили $0,29\pm0,105$ та $0,36\pm0,078$, які також не відрізнялись статистично ($t=1,33$), хоча числові вирази середніх для рослин з алелем «2» були більшими в обидва роки дослідження.

Цікавим виявилось порівняння нормованих відхилень генотипів у два роки дослідження (рис. 3.33). З рисунку видно, що кількість зразків, для яких нормовані відхилення в обидва роки мають однаковий знак (однобічний напрямок відхилення) становить 12, різні знаки (двобічний напрямок відхилення) – 22. Різниця статистично незначуща ($\chi^2=2,94$ від очікуваного розподілу 17 та 17, $\chi^2_{0,05}=3,84$). Це показує, що варіювання за ознакою кількість витісненої рідини в термінах нормованого відхилення показників від групових середніх відбувається є випадковим за два роки дослідження.

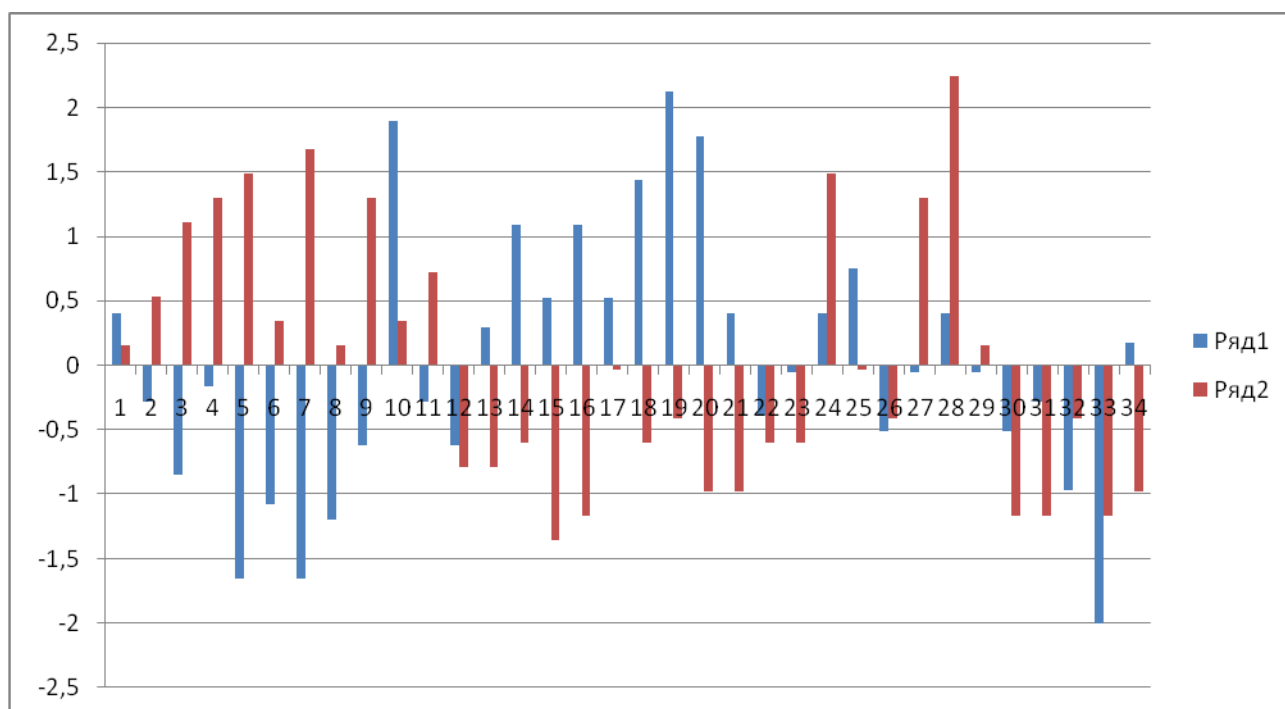


Рис. 3.33. Нормовані відхилення t (за віссю ординат) арифметичних середніх значень зразків 1–34 за обсягом витісненої рідини у 2015 (ряд 1) та 2016 (ряд 2).

Картина варіювання нормованих відхилень змінюється, якщо порівняти окремо дві групи зразків: ті, що мають алель «2» за геном *TaALG21* (властивий Авротіці), та ті, що мають алель «1» (властивий Аврорі). Серед 20 зразків з алелем «2» 15 виявили двобічні відхилення від групових середніх значень і лише 5 – однобічні (рис. 3.34). Розподіл 15 – 5 статистично відрізняється від очікуваного 10 – 10 ($\chi^2=5,0$). Серед 6 зразків з алелем «1» 4 показали двобічне відхилення, два – однобічне, що статистично не відрізняється від очікуваного 3 – 3 (за точним критерієм Фішера імовірність утворення ініціальної чотирипільної таблиці становить 0,38). Виходить, що варіювання навколо групового середнього значення генотипних середніх в різні роки оцінки є однаковим для зразків з алелем «1» та різним для зразків з алелем «2». В останньому випадку переважає зміна знаку нормованого відхилення для окремих зразків, а саме: зразки, які характеризувались позитивним нормованим

відхиленням у рік 2015, виявили негативне нормоване відхилення у 2016 році та навпаки, що добре видно на рисунку 3.34.

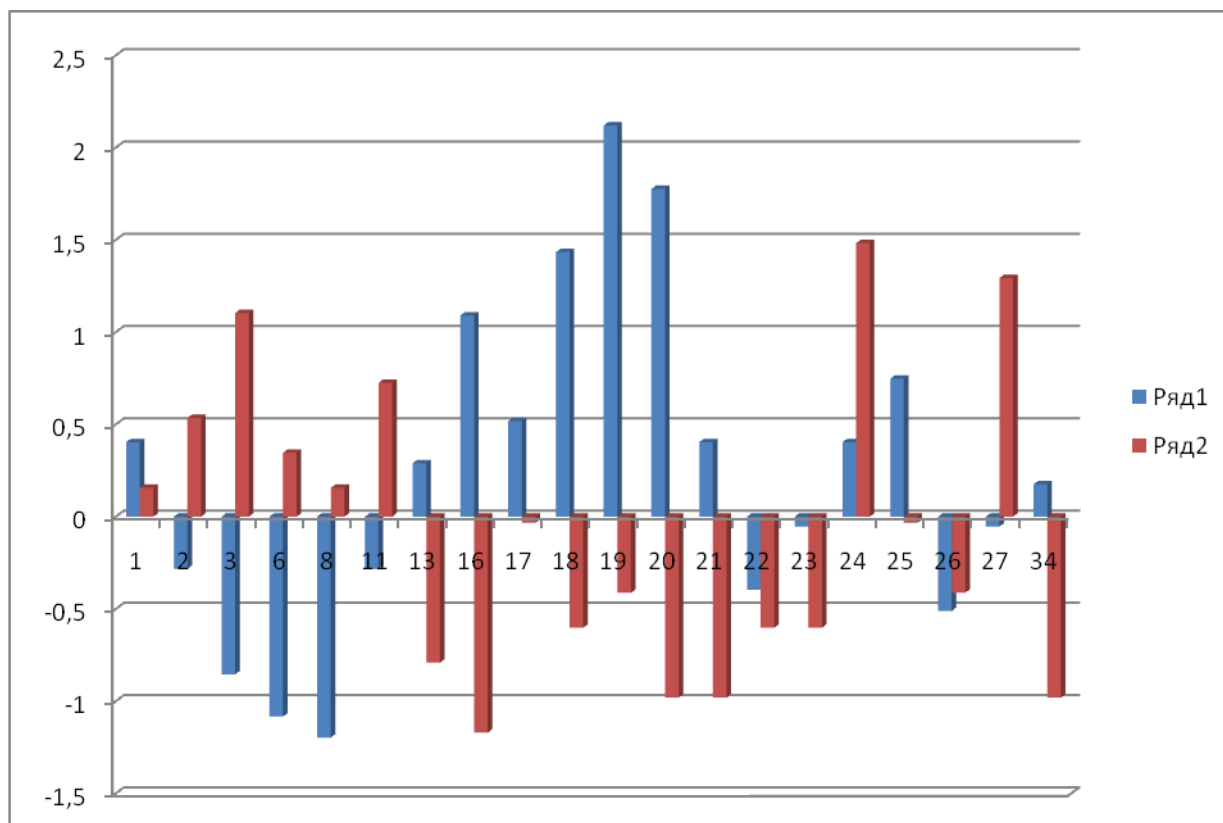


Рис. 3.34. Нормовані відхилення t (за віссю ординат) арифметичних середніх значень зразків з алелем «2» за геном *ALG1* – 34 за обсягом витісненої рідини у 2015 (ряд 1) та 2016 (ряд 2).

За різних умов вирощування вихідні форми Аврора та Авротіка, оцінені за об'ємом витісненої рідини, показали протилежні результати оцінки за 2016 та 2015 роки: у 2015 році дослідники констатували більш розвинену кореневу систему (в термінах обсягу витісненої рідини) для Авротіки у порівнянні з Авророю та наявність ліній, які за цим показником Авротіку навіть перевершували [15]. У 2016 рік Аврора перевершувала Авротіку за показниками оцінки кореневої системи, а лінії показали тенденцію формувати нормовані відхилення з протилежними знаками. Ті з них, які у 2015 році перевершували групове середнє значення, у 2016 році відхилялись від нього в менший бік, і навпаки. Ми припускаємо, що причиною зміни картини мінливості при формуванні кореневої системи є різні умови вирощування

рослин у 2015 (за умов загартовування) та 2016 (без загартовування) роках. Те, що така мінливість характеризувала зразки з алелем «2» гена *TaALG21*, транскрипційного фактора, пов'язаного з синтезом ауксину [227], наводить на два припущення. По-перше, обсяг витісненої рідини залежить не лише від кількості та довжини коренів, а і від архітектури кореневої системи, яка включає серед іншого кут відходу бічних коренів від осьових, а також частоту утворення бокових коренів на осьових. А сайт утворення бокових коренів визначається наявністю в ньому ауксину [227]. По-друге, ініціація утворення сайтів нагромадження ауксина може бути пов'язана з умовами росту рослини, зокрема, загартовуванням.

Наше припущення про значущість взаємодії генотипу за певним геном (в нашому випадку це ген *TaALG21*, що кодує транскрипційний фактор, важливий для синтезу ауксину) та умов його експресії (загартовування було – загартовування не було) підтверджує результати кількох дослідженнях за останні року, в яких вивчалось значення температури для формування кореневої системи рослин. Досліджували кореневу систему рослин кукурудзи (*Zea mays*), які вирощували за контрольних умов (18°C протягом 16 годин, 12°C протягом 8 годин) та за умов низьких температур (12°C протягом 16 годин, 6°C протягом 8 годин), і було показано, що більш холодостійкі лінії (Picker та PR39B29) мають посилений ріст кореневої системи за умов низьких температур, порівняно з менш холодостійкими лініями кукурудзи (Fergus і Codisco) [58]. Досліджували також зміни транскрипції генів (microarray) для рослин кукурудзи за контрольних умов і низьких температур, і було показано зміни транскрипції генів лише для двох з чотирьох ліній кукурудзи (Pickera та PR39B29), тобто тих, що мали більший ріст кореневої системи, що вказує на те, що регуляція специфічних генів забезпечує більшу холодостійкість. Оскільки умови експерименту (як контрольна, так і стресова температура) були субоптимальними для кукурудзи, то звичайні регульовані холодом гени, такі як ICE (Inducer of CBF expression), CBF/DREB1 (C-repeat binding factor) були активовані в обох умовах (не було різниці). Тим не менше, різниця у

транскрипції генів спостерігалася між контрольними умовами і низькими температурами для Ріскерта PR39B29. Серед диференційно експресованих генів були гени пероксидаз, патогенез споріднених білків, РНК-зв'язувальні фактори, рослино специфічні транскрипційні фактори NAC, що залучені у відповіді на холодостійкий стрес. Чотири гени були диференційно експресовані в обох холодостійких ліній (Ріскерта PR39B29). Перший з цих генів – патогенез споріднений білок 1 (pathogenesis related protein 1), для якого показано, що він індукується у відповідь на біотичні та деякі абіотичні стреси. Другий з цих генів – РНК-зв'язувальний білок (RBP – RNA binding protein), який бере участь у посттранскрипційній регуляції РНК, змінюючи експресію генів для пристосування рослин до стресів довкілля. Два інших гени, що диференційно експресувалися в обох лініях, кодують білки з невідомою функцією [58].

Показано експериментально, що різні види рослин відрізняються за оптимальною температурою для розвитку кореневої системи. Для пшениці така температура 14-18°C. Відомо, що співвідношення корінь : пагін зазвичай збільшується за умов несприятливої температури (до того, як досягнуто температури, що лімітує розвиток кореневої системи). І це цілком підтверджується отриманими нами даними, що краще зимують рослини, в яких збільшується маса коренів, яка приходить на одне стебло (пункт 3.3.2). Це може бути пристосуванням для подолання нестачі води і мінеральних речовин, оскільки за умов низьких температур вода має більшу в'язкість і є менш доступною та може зменшуватись провідність кореня для води [116].

При дослідженні рослин ячменя, які вирощували за умов вертикального градієнта температури (зменшення 20-10°C) з'ясовано, що при такому вирощуванні рослини мали більшу суху масу кореня, більше співвідношення корінь : пагін, порівняно з рослинами, що зростали за однакової температури 20°C. Більша біомаса кореня рослин, що вирощувалися з градієнтним зниженням температури, було пов'язана не з довгими коренями, а з більшою кількістю товстих коренів [71].

Першим ефектом дії неоптимальних температур на корінь є інгібування подовження кореня. Для томата показано, що рівень інгібування подовження кореня та кореневого росту за умов низьких температур пов'язаний з різницею у стійкості до низьких температур між сортами томата та високогірним дикорослим видом томата *Solanum habrochaites* [цит. за 116].

Низькі температури знижують частоту поділів клітин кореневої меристеми арабідопсис, що може бути пов'язані зі зменшенням накопиченням ауксина в апексі кореня. При рості арабідопсис за низьких (субоптимальних) температур інгібується експресія генів транспортерів ауксина *PIN1/3/7* та генів біосинтезу ауксина, що вказує на те, що і зниження транспорту ауксина, і його біосинтезу впливає на зниження вмісту ауксина в корені за умов низьких температур. Мутанти арабідопсис з вищою експресією генів *PIN1/3* за низьких температур характеризувалися не таким сильним зменшенням накопичення ауксина в корені та меншою чутливістю до дії низьких температур [цит. за 116].

Результати, наведені у розділах 3.2 та 3.3, показують, що підвищена у порівнянні з сортами м'якої пшениці зимостійкість Авротіки може бути наслідком певних особливостей як у формуванні кореневої системи, так і співвідношення між обсягом наземної та підземної маси рослин. У Авротіки, яка характеризується меншою кущистістю порівняно з Авророю, частина кореневої системи, що складається з коренів, які походять з вузла кущіння, менш розвинена у порівнянні з семінальною (ембріональною) частиною кореневої системи. Більш заглиблена семінальна частина кореневої системи формується в інших температурних умовах у порівнянні з постембріональними коренями. Це може позитивно відбиватися на розвитку кореневої системи за неоптимальних для росту коренів температурних умов. З даних оцінки Аврори та Авротіки чітко видно, що на кожне наземне стебло у Авротіки припадає більша маса кореневої системи порівняно з Авророю. Це може позитивно впливати на переживання наземною частиною рослини зимових стресових умов.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Під час проведення дисертаційного дослідження було створено інтрогресивні лінії, похідні від схрещування геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка (AABVTT) та сорту озимої м'якої пшениці Аврора. Авротіка об'єднує в своєму геномі тетраплоїдний компонент (AABB) сорту Аврора (AABBDD) та Т геном диплоїдного дикорослого виду *Aegilops mutica* (*Amblyopyrum muticum*), і характеризується підвищеною зимостійкістю. Від гібридів першого покоління (F₁) від схрещування Авротіка х Аврора було отримано насіння шляхом самозапилення, і так само через самозапилення було отримано рослини наступних поколінь (до F₅). Отримання насіння через самозапилення гібридних рослин було можливе, як ми вважаємо, завдяки здатності хромосом геномів Т і D до кон'югації, що дозволило уникнути беккросування до Аврори. Отримання нащадків через самозапилення дозволяє зберігати більшу кількість чужинного генетичного матеріалу (від Т геному, в нашому випадку). Метод створення інтрогресивних ліній через «змішування» хромосом третього субгеному було запропоновано раніше Жировим, але в цьому дослідженні він був вперше використаний для створення інтрогресивних ліній з генетичним матеріалом від виду *Aegilops mutica*.

Під час створення інтрогресивних ліній, кількість хромосом перевіряли в гібридних поколіннях F₃, F₄ та F₅, та добирали рослини, з кількістю хромосом, що наближалася до 42, щоб мати можливість отримати лінії з набором хромосом 42, властивим м'якій пшениці. Під час дослідження метафазних пластинок гібридних рослин спостерігали наявність телоцентричних хромосом, дицентриків та відмінну від батьківських форм кількість супутникових хромосом, що може свідчити про заміни та перебудови хромосом, які відбуваються внаслідок інтрогресії. Отримані інтрогресивні лінії (лініями вважали рослини починаючи з покоління F₅) далі використовувалися в нашому дослідженні для встановлення природи інтрогресій (з використанням мікросателітного аналізу), дослідження характеристик їхньої кореневої системи

та встановлення зв'язку наявних інтрогресій з кращої виживаністю в полі за умов дії низьких температур. Створені інтрогресивні лінії можуть бути потенційним джерелом генів чужинного походження (Т геном), що контролюють корисні ознаки, як стійкість до біотичних (зокрема борошниста роса) та абіотичних стресів.

Наявність чужинного генетичного матеріалу в геномах інтрогресивних ліній підтверджували результати оцінки рослин ліній за деякими ознаками морфології (ознаки колоса та вегетативної частини рослини). Більшість рослин інтрогресивних ліній мали прояви цих ознак, відмінні від сорту Аврора, а деякі – відмінні також від Авротіки. Додатково наявність генетичного матеріалу Т геному в геномах інтрогресивних ліній було підтверджено методом дот-блот гібридизації з використанням геномної ДНК *Ae. mutica* як зонда. Для більшості досліджених рослин гібридного покоління F₄ було отримано позитивний результат гібридизації їхньої ДНК з ДНК зонду (фрагментованою геномною ДНК *Ae. mutica*).

Далі для встановлення гомеологічної належності наявних в геномах ліній інтрогресій було використано мікросателітний аналіз. Оскільки нас цікавила краща зимостійкість геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка, порівняно з сортом Аврора, а з даних літератури відомо, що основні гени, що контролюють стійкість до низьких температур, у пшениці знаходяться в 5А хромосомі (а також на відповідних гомеологах – 5В та 5D), для дослідження були обрані мікросателітні локуси, про які відомо, що вони є специфічними саме до хромосом 5 гомеологічної групи пшениці. Спочатку було перевірено чи утворюються поліморфні продукти ампліфікації з праймерами до відповідного мікросателітного локуса з ДНК Аврори та Авротіки. Праймери до мікросателітних локусів, що давали поліморфні продукти ампліфікації для Аврори та Авротіки були далі використані для аналізу інтрогресивних ліній. Аналізували рослини покоління F₄ та F₅ (останні з використанням праймерів до більшої кількості мікросателітних локусів). Результати аналізу рослин покоління F₄ та покоління F₅ узгоджуються між собою та з результатами дот-

блот гібридизації, а більша кількість проаналізованих SSR локусів для покоління F_5 дозволяє краще ідентифікувати інтрогресії в складі хромосом рослин інтрогресивних ліній. Продукт ампліфікації, отриманий з праймерами до певного мікросателітного локуса з ДНК інтрогресивної лінії, міг або бути таким, що характерний для сорту Аврора, або бути таким, що характерний для амфідиплоїда Авротіка, або відрізнятися від обох батьківських форм. Останній випадок може бути пояснений виникненням нових алелів у мікросателітних локусах через їхню більшу здатність до змін внаслідок мутацій (як повторюваних ділянок геному). Частота перебудов геному може бути збільшена внаслідок інтрогресії. За результатами мікросателітного аналізу було виявлено наявність можливих заміщень хромосом або плечей хромосом (за результатами ідентифікації відповідних алелів SSR локусів – як у Аврори, чи як у Авротіки), а також факт формування так званих «мозаїчних» хромосом, коли алелі від Аврори перемежуються з алелями від Авротіки на хромосомі. Це може вказувати на наявність множинних інтрогресій у складі хромосоми, що могли утворитися внаслідок кон'югації хромосом T і D геномів.

Для порівняння морозостійкості Аврори та Авротіки спочатку використали непрямий метод – визначення вмісту вільного проліна, що накопичується в листках рослин в процесі холодового загартовування (витримування рослин за низьких позитивних температур, близько 4°C). Вільний пролін діє як осмопротектор і більш морозостійкі рослини мають накопичувати більшу кількість проліна для пристосування до наступного морозного стресу. Тим не менше, за нашими результатами, Авротіка накопичує меншу кількість вільного проліна, порівняно з Аворою. Отже, було зроблено висновок, що накопичення вільного проліна не належить до тих механізмів, що забезпечують кращу зимостійкість Авротіки, порівняно з Аворою.

Наступним непрямим методом оцінки морозостійкості, що використовували для порівняння Аврори та Авротіки, була оцінка електричної провідності (витікання електролітів). Цей метод базується на тому, що вимірюється електрична провідність розчину електролітів, що витікають через

мембрани рослинних клітин, пошкоджених під впливом дії низьких температур (нижче нуля). Більш морозостійкі рослини повинні мати менші показники електричної провідності, оскільки їхні мембрани пошкоджуються меншою мірою і витікає менша кількість електролітів. Проте в нашому дослідженні було показано, що Авротіка має більше значення електричної провідності, ніж Аврора. Отже, було зроблено висновок, що краща зимостійкість Авротіки пов'язана з іншими механізмами, ніж зменшена проникність мембрани після заморожування.

Були використані також прямі методи оцінки морозостійкості – визначення відростання паростків після заморожування в лабораторних умовах (в спеціальному термостаті з поступовим зниженням температури) та визначення відсотку рослин, що перезимували в полі (оцінка зимостійкості). Після експериментів заморожування в лабораторних умовах, Авротіка демонструвала краще відростання, ніж Аврора, проте не вдалося використати цей метод для оцінки морозостійкості інтрогресивних ліній, через те, що часто всі рослини певної лінії гинули (не спостерігалось відростання). Результати оцінки виживання рослин після зими в полі було отримано для інтрогресивних ліній та потім порівняно з характеристиками їхньої кореневої системи. Заморожування рослин в лабораторних умовах є досить віддаленим від польових умов, де на рослину (і на її зимування) впливає багато різних чинників. Крім того, лабораторне заморожування проводилося для молодих паростків – на стадії трьох листків, відповідно до обраної методики, а в полі рослини переживають низькі температури зимою, як правило, вже після стадії кущіння. Було зроблено висновок, що зимостійкість геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка має бути пов'язана з такими механізмами, які, можливо, краще проявляються в польових умовах.

Цінним спостереженням, яке було зроблене при підготовці рослин до лабораторного заморожування, було те, що Аврора та Авротіка мають відмінності кореневої системи за умови її формування при дії низьких позитивних температур (4°C, холодове загартовування, яке паростки проходили

перед заморожуванням). Геномно-заміщений амфідиплоїд Авротіка формує краще розвинену кореневу систему за дії низьких температур – більша кількість (бічних) коренів та їхня більша товщина, довжина. Це спостереження було використане для проведення наступної оцінки кореневої системи Аврори, Авротіки та інтрогресивних ліній та пошуку можливого зв'язку цих ознак з кращою зимостійкістю (виживанням рослин в полі).

Для вивчення розвитку кореневої системи серед інтрогресивних ліній було обрано ті лінії, які було вивчено за структурою геному щодо хромосом 5-ої гомеологічної групи, оскільки показано участь хромосом цієї гомеологічної групи у формуванні ознаки морозостійкості. Розвиток кореневої системи вивчали на рослинах, вирощених у пакетах з ґрунтовою сумішшю, та рослинах, вирощених у польових умовах. У першому випадку рослини не зимували, а вивчалися відразу після досягнення онтогенетичної стадії кушіння. Вимірювали такі характеристики кореневої системи: кількість коренів, максимальна довжина кореня, об'єм кореневої системи (визначали за об'ємом рідини, яку витісняє коренева система при зануренні у посудину з рідиною).

При порівнянні характеристик кореневої системи Аврори та Авротіки не було виявлено різниці за ознаками довжина найдовшого кореня та кількість осьових коренів, але спостерігалася різниця за ознакою об'єму витісненої рідини. Можливо, що Авротіка утворює більшу кількість бічних розгалужень коренів, або корені мають більшу товщину. За нашими результатами, формування більш розвиненої кореневої системи, що оцінювалося за обсягом рідини, яка витісняється коренями, статистично значуще пов'язано з наявністю маркерів (алелів SSR-локусів) хромосоми 5T замість маркерів хромосоми 5A. Це може вказувати на можливий зв'язок з хромосомою 5A пшениці гена (генів), які беруть участь у формуванні кореневої системи пшениці.

Рослини, що вирощували в полі, оцінювали не лише за ознаками кореневої системи, а також за куцистістю та успішністю зимування (оцінювали як кількість рослин, які після зими збереглися та перейшли до стадії колосіння). Якщо взяти до уваги одночасно дві ознаки, об'єм рідини, що витісняється

кореневою системою («об'єм коренів»), та кущистість, та охарактеризувати рослини за їхнім співвідношенням, Аврора відрізняється від Авротіки за співвідношенням об'єм коренів/кущистість у менший бік вдвічі. Лінії, які характеризуються високим відношенням об'єм коренів /кущистість, всі, крім однієї лінії (44.2/1-1), показали більш високий відсоток рослин, що вижили, порівняно з показником Аврори. Отримані результати дають змогу припустити, що стійкість рослин ліній до зимових стресових умов пов'язана з об'ємом кореневої системи відносно продуктивної кущистості.

На основі даних літератури провели пошук генів-кандидатів, що можуть бути залученими в забезпеченні високої зимостійкості Авротіки. До обраних генів було розроблено праймери з використанням програми Primer3. Аналізували продукти ампліфікації, що утворюють ДНК Аврори та Авротіки з праймерами до таких генів: *TaAGL21* та *TaAGL14* (гени MADS box транскрипційних факторів, що впливають на накопичення ауксина в корені), *BRI* – ген рецептора брасиностероїдів (фітогормони, які впливають на розвиток коренів), *CBF-A14* – ген транскрипційного фактора родини CBF (C-repeat Binding Factor) – один з основних транскрипційних регуляторів морозостійкості рослин [227; 41; 147]. Між ДНК Аврори та Авротіки не було виявлено поліморфізму за спектрами продуктів ампліфікації з праймерами до генів *TaAGL14*, *BRI* та *CBF-A14*, тому інтрогресивні лінії не аналізувалися з цими праймерами.

AGL21 кодує MADS box транскрипційний фактор. *AGL21* позитивно регулює накопичення ауксину в примордіях бічних коренів через регуляцію біосинтезу ауксину, який стимулює ініціація і ріст бічних коренів [227]. Показано наявність поліморфізму (один компонент для Аврори та подвійний компонент для амфідиплоїда Авротіка) для продуктів ампліфікації, утворених з праймерами до другої частини гена *TaAGL21* (*TaAGL21-2*). Ці праймери були використані для утворення продуктів ампліфікації з ДНК ліній – похідних Авротіки та аналізу продуктів ампліфікації щодо того, чи вони є схожі за масою на продукт Авротіки, чи на продукт Аврори. При порівнянні результатів з

оцінкою зимостійкості показано, що лінії з алелем гена *TaAGL21*, властивим Авротіці, за успішністю у перенесенні зимових стресів перевершують лінії, яким властивий алель Аврори за цим геном.

Для оцінки характеристик кореневої системи рослини вирощували в картонних коробках в 2015 році за умов природного загартовування (поступове зниження температури восени), та в 2016 році в кімнаті контрольованого клімату за оптимальної температури (20°C) без холодowego загартовування щоб встановити чи залежить розвиток кореневої системи від наявності/відсутності загартовування рослин і чи пов'язаний цей процес з алелем гена *TaAGL21*, властивим лініям. За отриманими результатами можна припустити, що природне загартовування сприяє формуванню більш розвиненої кореневої системи через збільшення довжини коренів за наявності алеля «2» гена *TaAGL21*, властивого Авротіці, в той час як без загартовування краще розвивається коренева система у рослин з алелем «1» гена *TaAGL21*, властивого Аврорі. За кількістю коренів рослини, вирощені у 2016 році (без загартовування), не відрізнялись від таких, вирощених у 2015 році (з загартовуванням), можливо, що вираз цієї ознаки не залежить від загартовування.

Для ознаки об'єм кореневої системи (що визначали за об'ємом витісненої рідини) варіювання навколо групового середнього значення генотипних середніх в різні роки є однаковим для зразків з алелем «1» гена *TaAGL21* та різним для зразків з алелем «2». В 2015 році (за умов загартовування) більш розвинену коренева система (більший об'єм витісненої рідини) мала Авротіка, а в 2016 році (без загартовування) Аврора утворювала більшу кореневу систему порівняно з Авротікою. Отже, за умов низьких температур, Авротіка формує краще розвинену кореневу систему, що може бути пов'язано з алелем «2» гена *TaALG21*, що в свою чергу має позитивний зв'язок із зимостійкістю. Отримані результати добре узгоджуються з інформацією, отриманою у останні роки, що формування кореневої системи рослин, зокрема злакових, є процесом температурозалежним [71; 116], а також підтверджують більш ранні

спостереження щодо залежності зимостійкості рослин від успішного формування кореневої системи, що для злаків напряду пов'язано з розвитком вузла кушіння [67; 212].

Інтерес до інтрогресій завжди пов'язаний з питанням, чи можна ознаку, яка привертає до себе увагу у зразка – носія чужинного генетичного матеріалу (в нашому випадку це Авротіка, що несе геном Т одного з видів егілопсу та характеризується високою зимостійкістю) перенести до м'якої пшениці так, щоб наявність такої ознаки не відбивалась негативно на комерційних властивостях сортів пшениці. Оскільки під час дослідження було з'ясовано, що більш висока зимостійкість Авротіки у порівнянні з сортами м'якої пшениці пов'язана з тим, що в цього амфідиплоїда на кожен одиницю наземної маси (пагони вузла кушіння) приходить більший обсяг кореневої системи, навряд таку ознаку в чистому вигляді варто передавати сорту пшениці, адже проти зменшення продуктивної кущистості селекціонери пшениці будуть заперечувати. Отже, вартим уваги тут є тільки абсолютне збільшення обсягу кореневої системи інтрогресивних ліній у порівнянні з рекурентним генотипом (Аврора). За нашими даними, корисним для цього може бути ген *TaAGL21*, що кодує транскрипційний фактор, ефектор синтезу ауксину. Інтрогресивні лінії, що мали алель цього гена, властивий Авротіці, характеризувались більш розвиненою кореневою системою і можуть бути рекомендовані для передачі у генофонд м'якої пшениці властивого геному Т *Ae. mutica* алеля гена *TaAGL21*.

ВИСНОВКИ

Геномно-заміщений амфідиплоїд Авротіка з геномом AABBTT вивчено стосовно молекулярно-генетичної природи його підвищеної зимостійкості через створення та вивчення інтрогресивних ліній *T. aestivum* / *Ae. mutica* (TT) на базі рекурентного генотипу Аврора. Показано, що підвищена зимостійкість Авротіки у порівнянні з Авророю зумовлена архітектурою кореневої системи Авротіки та може бути пов'язана з алельною специфічністю за геном *TaAGL21*, який кодує транскрипційний фактор – промотор утворення сайтів розгалуження кореня.

1. Через схрещування Авротіка х Аврора та самозапилення гібридів F₁–F₅ створено гексаплоїдні інтрогресивні лінії, які мають включення генетичного матеріалу *Aegilops mutica* до геному м'якої пшениці сорту Аврора. Лінії створено без жодного штучного добору на наявність ознак чужинного походження, критерієм залучення рослин до наступної генерації була лише самофертильність.

2. Варіювання за кількістю хромосом у поколіннях F₃–F₅ зменшилось за розмахом від 33–46 до 40–44 завдяки природній самостерильності гібридів з незбалансованими хромосомними наборами та – у останній генерації – за рахунок штучного добору для самозапилення рослин з кількістю хромосом 40–44.

3. Дот-блот аналіз випадкової вибірки із 105 рослин покоління F₄ виявив позитивну реакцію 101 з них при використанні геномної ДНК геному *T. егілопса* як зонда.

4. Кожна створена лінія характеризувалась різним сполученням градацій вивчених морфологічних ознак, властивих Авротіці та Аврорі. За ознаками ламкості колоскового стрижня, опушення луски, забарвлення зрілої луски та зернівки лінії демонстрували градації, не властиві жодній з батьківських форм.

5. За даними мікросателітного аналізу ліній, виконаного з праймерами до локусів, специфічних до хромосом 5-ої гомеологічної групи, є лінії з

заміщенням цих хромосом на хромосому 5T, з транслокаціями, в тому числі цілих плечей, а також лінії з мозаїчними хромосомами за SSR-маркерами 5-ої групи хромосом.

6. Підвищена у порівнянні з сортом Аврора зимостійкість амфідиплоїда Авротіка не пов'язана ні зі збільшенням вільного проліна у клітинах Авротіки після загартовування, ні зі зменшенням показника електричної провідності у порівнянні з Аворою.

7. Серед розмаїття інтрогресивних ліній кращою зимостійкістю характеризуються такі, що мають маркери геному T за SSR-локусами, специфічними до хромосом 5-ої гомеологічної групи, замість маркерів хромосоми пшениці 5A.

8. Коренева система Авротіки візуально характеризується як більш сильно розвинена, і це оцінюється кількісно як більший об'єм рідини, що витісняється коренями Авротіки при зануренні в посудину з рідиною, у порівнянні з таким показником для Аврори. За кількістю коренів та довжиною найдовшого кореня Авротіка та Аврора не відрізняються.

9. Лінії *T. aestivum* / *Ae. mutica* з властивим Авротиці алелем гена *TaAGL21*, що кодує MADS box транскрипційний фактор – активатор накопичення ауксина в примордіях бічних коренів, характеризуються у порівнянні з Аворою більш сильним розвитком кореневої системи за умов проходження нормального природного загартовування і поступаються Аврорі у відсутності загартовування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. 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. Київ: Логос, 2001. Том 2: 368–375.
2. Антонюк М.З., Єфіменко Т.С., Мартиненко В.С., Терновська Т.К. Створення ліній м'якої пшениці з генетичним матеріалом від *Aegilops mutica*. Abstracts of the International Scientific Conference "Breeding and Genetics of Agrocltural Crops: Traditions and Prospects". October 17-19th, 2012, Odesa, Ukraine: 123–124.
3. Балашов В.В., Голев Ю.И. Зимостойкость озимой пшеницы. Зерновое хозяйство. 1975; 11: 21-25.
4. Войцехівська О.В., Капустян А.В., Косик О.І. та ін. за заг. ред. Паршикової Т.В. Фізіологія рослин: практикум. Луцьк: Терен; 2010. 420 с.
5. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Москва: Практика; 1998. - 459 с.
6. Жиров Е.Г., Терновская Т.К. Геномная инженерия у пшеницы. Вестник с.-х. науки. 1984. 10: 58–66.
7. Жиров Е.Г. Геномы пшеницы: исследование и перестройка. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. Специальность Генетика: 03.00.15. Краснодар; 1989. 366 с.
8. Єфіменко Т.С., Антонюк М.З., Мартиненко В.С. Створення чужинно-заміщених та чужинно-доданих ліній *Triticum aestivum* / *Aegilops mutica*. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. 2013. Київ: Логос (12): 114–118.
9. Єфіменко Т.С. Створення інтрогресивних ліній м'якої пшениці *Triticum aestivum*/*Aegilops mutica*. Збірник тез ІХ Міжнародної наукової конференції "Молодь та поступ біології". 16–19 квітня 2013: 155.

10. Єфіменко Т.С., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Мікросателітний аналіз ліній м'якої пшениці *Triticum aestivum/Aegilops mutica* щодо присутності чужинного генетичного матеріалу у складі хромосом 5 гомеологічної групи. Матеріали VI Міжнародної конференції молодих вчених «Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція», присвяченої 150-річчю від дня народження видатного ботаніка В.І. Липського. (Одеса, 13-17 травня 2013). – Одеса: Печатний до, 2013. – 364 с.

11. Єфіменко Т.С., Федак Ю., Антонюк М.З. Порівняння хромосом 5-ої гомологічної групи Аврори та Авротіки з використанням специфічних мікросателітів. із співав. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. 2014. Київ: Логос (14): 52–58.

12. Єфіменко Т.С., Антонюк М.З. Молекулярні механізми стійкості рослин до низьких температур. Наукові записки НаУКМА. Біологія та екологія. 2014; Т.158: 3-12.

13. Єфіменко Т.С., Терновська Т.К. Генетичний контроль формування архітектури кореневої системи рослин та її зв'язок із зимостійкістю. Наукові записки НаУКМА, 2015, Том 171: 10-17.

14. Єфіменко Т.С., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Поліморфізм інтрогресивних ліній *Triticum aestivum / Amblyopyrum muticum* за геном *AGL21*, промотором розвитку коренів. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. 2016; Т. 19: 25-28.

15. Єфіменко Т.С., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Характеристика кореневої системи інтрогресивних ліній пшениці з генетичним матеріалом від *Amblyopyrum muticum*. Наукові записки. 2016; Т.184: 10-16.

16. Кобзар А.И. Прикладная математическая статистика. Для инженеров и научных работников. М.: Физматлит, 2006. 813 с.

17. Куперман, Ф.М. Биология развития культурных растений. М.: Высшая школа, 1982. 343 с.

18. Мазер К., Джинс Дж. Биометрическая генетика. М.: Мир, 1985. 463 с.

19. Малета Ю.С., Тарасов В.В. Непараметрические методы статистического анализа в биологии и медицине. М.: Изд-во Московского университета; 1982. 178 с.
20. Терновская Т.К., Жиров Е.Г. Выделение тетраплоидного компонента ААВВ из мягкой пшеницы сорта Саратовская 29. Докл. ВАСХНИЛ. 1979; 3: 8–10.
21. Agarwal M., Hao Y., Kapoor A., Dong C.-H., Fujii H., Zheng X. et al. A R2R3 type MYB transcriptional factor is involved in the cold regulation of *CBF* genes and in acquired freezing tolerance. *J Biol Chem*. 2006 Dec 8; 281 (49): 37636–37645.
22. Akhtar, M., Jaiswal A., Taj G., Jaiswal J.P., Qureshi M. I., Singh N.K. DREB/CBF transcription factors: their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants. *J Genet*. 2012 Dec 19; 91 (3): 385–395.
23. Alcázar, R., Cuevas J. C., Planas J., Zarza X., Bortolotti C., Carrasco P. et al. Integration of polyamines in the cold acclimation response. *Plant Sci*. 2011 Jan; 180 (1): 31–38.
24. Alonso, A., Queiros C. S., Magalhaes A. C. Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Jan 14; 1323 (1): 75–84.
25. Antonyuk, M.Z., Shpylchyn V.V., Ternovska T.K. Permanent genetic variability in the introgressive lines and amphidiploids of *Triticeae*. *Cytol Genet*. 2013 Jul 13; 47(4): 242–51.
26. Antonyuk M., Iefimenko T.S., Martynenko V.S., Ternovska T.K. Development of introgressive wheat lines with *Aegilops mutica* chromosomes. The 12th International Wheat Genetics Symposium. Japan, Yokohama, 8–13 September, 2013. Abstracts: 1–6.
27. Atkinson J.A., Rasmussen A., Traini R., Vob U., Sturrock C., Mooney S.J. Branching out in roots: uncovering form, function and regulation. *Plant Physiol*. 2014 Oct; 166 (2): 538–50.

28. Badawi, M. Danyluk J., Boucho B., Houde M., Sarhan F. The *CBF* gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal *CBFs*. *Mol Genet Genomics*. 2007 Feb 7; 277 (5): 533-54.
29. Badawi, M., Reddy Y. V., Agharbaiui Z., Tominaga Y., Danyluk J., Sarhan F. et al. Structure and functional analysis of wheat *ICE* (Inducer of CBF Expression) Genes. *Plant Cell Physiol*. 2008 Aug; 49 (8): 1237-49.
30. Baker, S. S., Wilhelm K. S., Thomashow M. F. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana Cor15* has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol Biol*. 1994 Mar; 24 (5): 701-13.
31. Balint, A.F., Vagujfalvi A., Szira F., Borner A., Cattivelli L., Dubkovsky J. et al. QTLs and genes for abiotic stress tolerance in cereals: their general role in the environmental adaptation and their developmental-stage specificity. *Options Mediterraneennes*. 2008 Jan; Series A, (81): 197-201.
32. Bassam B.J., Gresshoff P.M. Silver staining DNA in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*. 2007 Oct 25; 2 (11): 2649-54.
33. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 1973 Aug; 39 (1): 205-07.
34. Bohn, M., L  thje S., Sperling P., Heinz E., D  rffling K. Plasma membrane lipid alterations induced by cold acclimation and abscisic acid treatment of winter wheat seedlings in frost resistance. *J Plant Physiol*. 2007 Feb 28; 164 (2): 146-156.
35. Bramley H., Tyerman S. Root water transport under waterlogged conditions and the roles of aquaporins. *Waterlogging Signaling and Tolerance in Plants*. Heidelberg, Germany; 2010. p. 151-180.
36. Bossolini E., Wicker T., Knobel P.A., Keller B. Comparison of orthologous loci from small grass genomes *Brachypodium* and rice: implications for wheat genomics and grass genome annotation. *Plant Journal*. 2007 Jan 18; 49 (4) 704-717.
37.   akmak T.,   . Atici. Effects of putrescine and low temperature on the apoplastic antioxidant enzymes in the leaves of two wheat cultivars. *Plant and Soil Environment*. 2009; 55 (8): 320-26.

38. Campoli C., Matus-Cádiz M. A., Pozniak C. J., Cattivelli L., Fowler D. B. Comparative expression of *Cbf* genes in the *Triticeae* under different acclimation induction temperatures. *Mol Genet Genomics*. 2009 Aug; 282 (2): 141-52.
39. Catala R., Salinas J. Temperature-perception, molecules and mechanisms. *J Appl Biomed*. 2010 May 24; 8 (4): 189-198.
40. Cattivelli L., Baldi P., Crosatti C., Fonzo N. D., Faccioli P., Grossi M. et al. Chromosome regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in *Triticeae*. *Plant Molecular Biology*. 2002 Mar-Apr; 48 (5-6): 649-665.
41. Chaiwanon J., Wang Z.-Y. Spatiotemporal brassinosteroid signaling and antagonism with auxin pattern stem cell dynamics in *Arabidopsis* roots. *Curr Biol*. 2015 Apr 20; 25: 1031-1042.
42. Chen L., Wang S.-Q., Hu Y.-G. Detection of SNPs in the *VRN-A1* gene of common wheat (*Triticum aestivum* L.) by a modified Ecotilling method using agarose gel electrophoresis. *Austral J Crop Science*. 2011 Mar; 5 (3): 1835-2707, 2011.
43. Chen A., Dubkovsky J. Wheat TILLING mutants show that the vernalization gene *VRN1* down-regulates the flowering repressor *VRN2* in leaves but is not essential for flowering. *PLOS Genetics*. 2012 Dec 13; 8 (2): 1-15.
44. Chen F., Gao M., Zhang J., Zuo A., Shang X., Cui D. Molecular characterization of vernalization and response genes in bread wheat from the Yellow and Huai Valley of China. *BMC Plant Biol*. 2013 Dec 5; 13 (199): 1471-2229.
45. Chew Y. H., Halliday K. J. A stress-free walk from *Arabidopsis* to crops. *Curr Opin Biotechnol*. 2010 Apr; 22 (2): 1-6.
46. Chinnusamy V., Ohta M., Kanrar S., Lee B. H., Hong X., Agarwal M. et al. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev*. 2003 Apr 15; 17 (8): 1043-54.
47. Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J. K. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci*. 2007 Oct; 12 (10): 444-51.
48. Christov N. K., Imai R., Blume Y. Differential expression of two winter wheat alpha-tubulin genes during cold acclimation. *Cell Biol Int*. 2008 May; 32 (5): 574-78.

49. Chu C.-G., Tan C.T., Yu G.-T., Zhong S., Xu S.S., Yan L. A novel retrotransposon inserted in the dominant *Vrn-B1* allele confers spring growth habit in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.). *G3*. 2011 Dec; 1 (7): 637-45.
50. Chu H. A., Liang W., Li J., Hong F., Wu Y., Wang L., Wang J. CLE-WOX signaling module regulates root meristems maintenance and vascular tissue development in rice. *J Exp Bot*. 2013 Dec; 64 (17): 5359-69.
51. Chochois V., Vogel J. P., Watt M. Application of *Brachypodium* to the genetic improvement of wheat roots. *J Exp Bot*. 2012 May; 63 (9): 3467-74.
52. Collins N.C., Tardieu F., Tuberosa R. Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? *Plant Physiol*. 2008 Jun; 147 (2): 469-89.
53. Colmer, T.D., Flowers T.J., Munns R. Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *J Exp Bot*. 2006 Mar 2; 57 (5): 1059-78.
54. DeFalco A., Bender K. W., Snedden W. A. Breaking the code: Ca²⁺ sensors in plants signaling. *Biochem J*. 2010 Dec 15; 425 (1): 27-40.
55. De Smet I., Vanneste S., Inze D., Beekman T. Lateral root initiation and the birth of a new meristems. *Plant Mol Biol*. 2006 Apr; 60 (6): 871-87.
56. Dexter S. T., Tottingham W. E., Graber L.G. Preliminary results in measuring the hardness of plants. *Plant Physiol*. 1930 Apr; 5 (2): 215-23.
57. Dennis, E. S., Peacock W.J. Vernalization in cereals. *J Biol*. 2009 Jun 22; 8 (57): 1-4.
58. Di Fenza M., Hogg B., Grant J., Barth S. Transcriptomic response of maize primary roots to low temperatures at seedling emergence. *Peer J*. 2017 Jan 5; DOI 10.7717/peerj.2839.
59. Distelfeld A., Tranquilli G., Li C., Yan L., Dubkovsky J. Genetic and molecular characterization of the *VRN2* loci in tetraploid wheat. *Plant Physiol*. 2009 Jan, 149 (1): 245-57.
60. Doherty C. J., Van Buskirk H. A., Myers S. J., Thomashow M. F. Roles for *Arabidopsis* CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *Plant Cell*. 2009 Mar; 21 (3): 972-84.

61. Dong C. H., Agarwal M., Xie Q., Zhu J. K. The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. PNAS. 2006 May 23; 103 (21): 8281-86.
62. Dong M.A., Farre E.M., Thomashow M.F. CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 and LATE ELONGATED HYPOCOTYL regulate expression of the C-REPEAT BINDING FACTOR (CBF) pathway in *Arabidopsis*. PNAS. 2011 Apr 26; 108 (17): 7241-46.
63. Dörffling K., Dörffling H., Lesselich G., Luck E., Zimmermann C., Melz G. Heritable improvement of frost tolerance in winter wheat by *in vitro* selection of hydroxyproline resistant proline overproducing mutants. Euphytica. 1997 Jan; 93 (1): 1-10.
64. Dubkovsky J., Loukoianov A., Fu D., Valarik M., Sanchez A., Yan L. Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes *VRN1* and *VRN2*. Plant Mol Biol. 2006 Mar; 60 (4): 469-80.
65. Dvořák J. Genetic variability in *Aegilops speltoides* affecting homoeologous pairing in wheat. Can J Genet Cytol. 1972; 14 (2): 371–80.
66. Eckardt N. A. CAMTA proteins: A direct link between calcium signals and cold acclimation Plant Cell. 2009 Mar; 21 (3): 697.
67. Ehdaie B, Whitkus R.W, Waines J.G. Root biomass, water-use efficiency and performance of wheat-rye translocations of chromosomes 1 and 2 in spring bread wheat ‘Pavon’. Crop Sci. 2003 Feb 21; 43 (2): 710–717.
68. Faltusova-Kadlecova Z., Faltus M., Prasil I. Absciscic acid content during cold hardening of barley and wheat cultivars with different freezing tolerance. Rostlinna Vyroba. 2002; 48 (11): 490-493.
69. Feldman M., Levy A.A. Allopolyploidy – a shaping force in the evolution of wheat genomes. Cytogenet Genome Res. 2005. 109 (1-3): 250–58.
70. Fowler D. B., Limin A. E. Breeding for winter hardiness in cereals. Acta Agronomica Hungarica. 1997. 45 (3): 301-09.

71. Fullner K., Temperton V. M., Rascher U., Jahnke S., Rist R., Schurr U. et al. Vertical gradient in soil temperature stimulates development and increases biomass accumulation in barley. *Plant Cell Environ.* 2012 May; 35 (5): 884–892.
72. Fursova O.V., Pogorenko G. V., Tarasov V. A. Identification of *ICE2*, a gene involved in cold acclimation which determines freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*. 2009 Jan 15; 429 (1-2): 98-103.
73. Gaeta R.T., Pires J.C. Homoeologous recombination in allopolyploids: The polyploid ratchet. *New Phytologist*. 2010 Apr; 186 (1): 18 – 28.
74. Galiba G., Quarrie S. A., Sutka J., Morgounov A., Snape J. W. RFLP mapping of the vernalization (*Vrn1*) and frost resistance (*Fr1*) genes on chromosome 5A of wheat. *Theor Appl Genet.* 1995 Jun; 90 (7-8): 1174-79.
75. Galiba G., Vagujfalvi A., Li C., Soltesz A., Dubcovsky J. Regulatory genes involved in the determination of frost tolerance in temperate cereals. *Plant Sci.* 2009 Jan; 176 (1): 12-19.
76. Gamuyao R., Chin J.H., Pariaska-Tanaka J., Pesaresi P., Catausan S., Dalid C. et al. The protein kinase Pstol1 from traditional rice confers tolerance to phosphorus deficiency. *Nature*. 2012 Aug 23; 488 (1): 535-39.
77. Ganeshan S., Vitamvas P., Fowler D. B., Chibbar R. N. Quantitative expression analysis of selected *COR* genes reveals their differential expression in leaf and crown tissues of wheat (*Triticum aestivum* L.) during an extended low temperature acclimation regimen. *J Exp Bot.* 2008 Jun; 59 (9): 2393-2402.
78. Ganeshan S., Sharma P., Young L., Kumar A., Fowler D.B., Chibbar R. N. Contrasting cDNA-AFLP profiles between crown and leaf tissues of cold-acclimated wheat plants indicate differing regulatory circuitries for low temperature tolerance. *Plant Mol Biol.* 2011 Mar; 75 (4-5): 379-98.
79. Garay-Arroyo A., Ortiz-Moreno E., de la Paz Sanchez M., Murphy A.S., Garcia-Ponce B., Marsch-Martinez N. et al. The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during *Arabidopsis* root development by regulating PIN expression. *EMBO J.* 2013 Oct 30; 32 (1): 2884-95.

80. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. The International Brachypodium Initiative. Nature. 2010; 463 (1): 763-68.
81. Gery C., Zuther E., Schultz E., Legoupi J., Chauveau A., McKhann H. et al. Natural variation in the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*: effects of RNAi-induced CBF depletion and QTL localization vary among accessions. Plant Sci. 2011 Jan; 180 (1): 12-23.
82. Gilmour S. J., Zarka D. G., Stockinger E. J., Salazar M. P., Houghton J. M., Thomashow M. F. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcription activators as an early step in cold-induced COR gene expression. Plant J. 1998 Nov; 16 (4): 433-42.
83. Goh T., Kasahara H., Mimura T., Kamiya Y., Fukaki H. Multiple AUX/IAA-ARF modules regulate lateral root formation: the role of Arabidopsis SHY2/IAA3-mediated auxin signaling. Philosophical Transactions of The Royal Society Biological Sciences. 2012 Apr 23; 367 (1595): 1461-68.
84. Golovnina K.A., Kondratenko E.Y., Blinov A.G., Goncharov N.P. Molecular characterization of vernalization loci *VRN1* in wild and cultivated wheats. Plant Biol. 2010 Aug 11; 10 (168): 1-15.
85. Goncharov N.P. Genetics of growth habit (spring vs winter) in common wheat: confirmation of the existence of dominant gene *Vrn4*. Theor Appl Genet. 2003 Aug; 107 (4): 768-72.
86. GrainGenes: A Database for *Triticeae* and *Avena* Available from: <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>
87. Griffith M., Yaish M. W. F. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. Trends Plant Sci. 2004 Aug; 9 (8): 399-405.
88. Guilfoyle T.J. The PB1 domain in Auxin Response Factor and Aux/IAA proteins: a versatile protein interaction module in the auxin response. Plant Cell. 2015 Jan. 27 (1): 33-43.

89. Guyomare'h H., Sourdille P., Charmet G. et al. Characterization of polymorphic microsatellite markers from *Aegilops tauschii* and transferability to the D-genome of bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2002 May; 104 (6-7): 1164–72.
90. Guyomare'h H., Sourdille P., Edwards K.J. et al. Studies of the transferability of microsatellites derived from *Triticum tauschii* to hexaploid wheat and to diploid related species using amplification, hybridization and sequence comparisons. *Theor. Appl. Genet.* 2002 Oct; 105 (5): 736–44.
91. Hacham Y., Holland N., Butterfield C., Ubeda-Tomas S., Bennett M.J., Chory J. et al. Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristems size. *Development.* 2011 Dec 14; 138 (5): 839-848.
92. Haider N., Nabulsi I., MirAli N. Comparison of the efficiency of A-PAGE and SDS-PAGE, ISSRs and RAPDs in resolving genetic relationships among *Triticum* and *Aegilops* species. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 2010 Oct; 57 (7): 1023-39.
93. Haider N., Ahmar E., Nabulsi I. Molecular characterization of Syrian *Aegilops* L. (*Triticeae*, *Poaceae*) species using ISSRs. *Cereal Research Communications.* 2012 Mar 3; 40 (1): 24-33.
94. Haruntyunyan M., Dulloo M. E., Yeritsyan N., Danielyan A. Red List assessment of nine *Aegilops* species in Armenia. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 2010 Dec; 57 (8): 1177-89.
95. Heidarvand L., Amiri R.M. What happens in plant molecular responses to cold stress? *Acta Physiologiae Plantarum.* 2010 Jan 10; 32 (3): 419-31.
96. Holková L., Mikulková P., Hrstková P., Prášil I. T., Bradáčová M., Prášilová P. et al. Allelic variations at *Dhn4* and *Dhn7* are associated with frost tolerance in barley. *Czech Journal of Plant Breeding.* 2010; 46 (4): 149-58.
97. Iefimenko T., Antonyuk M.Z., Ternovska T.K. Development of introgressive lines *Triticum aestivum* / *Aegilops mutica* resistant to powdery mildew by the method of chromosome mixing. *Disease Risk and Food Security/ Proceedings of the 13th International Cereal Rust and Powdery Mildews Conference.* 28 Aug.–1 Sep. 2012. p. 154–155.

98. Iefimenko T.S., Fedak Y.G., Antonyuk M.Z., Ternovska T.K. Microsatellite analysis of chromosomes from the fifth homoeologous group in the introgressive *Triticum aestivum/Amblyopyrum muticum* wheat lines. *Cytology and Genetics*. 2015 May; 48 (6): 189–197.
99. Iefimenko T.S., Fedak G., Antonyuk M.Z., Ternovska T.K. Introgressive wheat lines *Triticum aestivum/Amblyopyrum muticum* analysis as to the structure of the homeologous group 5 chromosomes. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць, т. 16. Київ: Логос, 2015: 83–86.
100. Jan N., Hussain M., Andrabi K.I. Cold resistance in plants: a mystery unresolved. // *E J Biotechnol*. 2009 Mar 28; 12 (3): 0717-3458.
101. Janda T., Szalai G., Leskó K., Yordanova R., Apostol S., Popova L. P. Factors contributing to enhanced freezing tolerance in wheat during frost hardening in the light. *Phytochemistry*. 2007 Jun; 68 (12): 1674-82.
102. Janda T., Pap M., Szalai G. Role of light in freezing tolerance of wheat. *Acta Biologica Szegediensis*. 2008; 62 (1): 89-90.
103. Janská A., Aprile A., Zámečník J., Cattivelli L., Ovesná J. Transcriptional responses of winter barley to cold indicate nucleosome remodeling as a specific feature of crown tissues. *Funct Integr Genomics*. 2011 Jun; 11 (2): 307-25.
104. Jones J.K., Majisu B.N. The homoeology of *Aegilops mutica* chromosomes. *Canadian J Genet Cytol*. 1968; 10 (3): 620–26.
105. Jung J. K. H., McCouch S. Getting to the roots of it: genetic and hormonal control of root architecture. *Front Plant Sci*. 2013 Jun 18; 4 (186): 1-21.
106. Kamal A.H.M., Kim K.-H., Shin K.-H., Choi J.-S., Baik B.-K., Tsujimoto H. et al. Abiotic stress responsive proteins of wheat grain determined using proteomics technique. *Australian Journal of Crop Science*. 2010; 4 (3): 196-208.
107. Kang H., Wang Y., Fedak G. Cao W., Zhang H., Fan X. et al.. Introgression of chromosome 3Ns from *Psathyrostachys huashanica* into wheat specifying resistance to stripe rust // *PLoS ONE*. 2011 Jul 8; 6 (7): e21802. doi:10.1371/journal.pone.0021802.

108. Kaplan B., Davydov O., Knight H., Galon Y., Knight M. R., Fluhr R. et al. Rapid transcriptome changes induced by cytosolic Ca^{2+} transients reveal ABRE-related sequences as Ca^{2+} -responsive cis elements in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2006 Oct; 18 (10): 2733-48.
109. Karleson D., Nakaminami K., Toyomasu T., Imai R. A cold-regulated nucleic acid-binding protein of winter wheat shares a domain with bacterial cold shock proteins. *J Biol Chem*. 2002 Jul 16; 277 (38): 35248-35256.
110. Kargiotidou A., Deli D., Galanopoulou D., Tsaftaris A., Farmaki T. Low temperature and light regulate *delta* 12 fatty acid desaturases (FAD2) at a transcriptional level in cotton (*Gossypium hirsutum*). *J Exp Bot*. 2008; 59 (8): 2043-56.
111. Karsai I., K. Mészáros, P. M. Hayers, Z. Bedo. Effects of loci on chromosomes 2 (2H) and 7 (7H) on developmental patterns in barley (*Hordeum vulgare* L.) under different photoperiod regimes. *Theor Appl Genet*. 1997; 94 (5): 612-618.
112. Kidokoro S., Maruyama K., Nakashima K., Imura Y., Narusaka Y., Shinwari Z.K. et al. The Phytochrome-Interacting Factor PIF7 negatively regulates *DREB1* expression under circadian control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2009 Dec; 151 (4): 2046-57.
113. Kim D.-H., Doyle M.R., Sung S., Amasino R.M. Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2009 Aug 13; 25: 277-299.
114. Kippes N., Zhu J., Chen A., Vanzetti L., Lukaszewski A., Nishida H. et al. Fine mapping and epistatic interactions of the vernalization gene *VRN-D4* in hexaploid wheat. *Mol Genet Genomics*. 2014 Feb; 289 (1): 47-62.
115. Kobayashi F., Takumi S., Nakamura C. Increased freezing tolerance in an ABA-hypersensitive mutant of common wheat. *J Plant Physiol*. 2008; 165 (2): 224-32.
116. Koevoets I.T, Venema H.J, Elzenga T.M, Testerink C. Roots withstanding their environment: exploiting root system architecture responses to abiotic stress to

improve crop tolerance. *Front Plant Sci.* 2016 Aug 31; 7: 1335, doi: 10.3389/fpls.2016.01335.

117. Koizumi K., Gallagher K.L. Identification of SHRUBBY, a SHORT-ROOT and SCARECROW interacting protein that controls root growth and radial patterning. *Development.* 2013 Mar; 140 (6): 1292-1300.

118. KOMUGI: Wheat Genetic Resources Database. Composite Wheat Map. <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/maps/markerMap.jsp;jsessionid=40E62A525FB63D69D63275DF645E308C.lb1?chromosome=5>

119. Kong X., Zhang M., Smet I. D., Ding Z. Designer crops: optimal root system architecture for nutrient acquisition. *Trends Biotech.* 2014 Dec; 32 (12): 597-98.

120. Koressaar T., Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics.* 2007 May 15; 23 (10): 1289-91.

121. Koscy G., Athmer B., Perovic D., Himmelbach A., Szűcs A., Vashegyi I. et al. Regulation of gene expression by 5A chromosome during cold hardening in wheat. *Mol Genet Genomics.* 2010 Apr; 283 (4): 351-63.

123. Kos E., Islek C., Ustun A.S. Effect of cold on protein, proline, phenolic compounds and chlorophyll content of two pepper (*Capsicum annum* L.) varieties. *G.U. J Sci.* 2010 Oct 19; 23 (1): 1-6.

124. Kosová K., Vítámvás P., Prášil I. T. The role of dehydrins in plant response to cold. *Biologia Plantarum.* 2007 Dec; 51 (4): 601-17.

125. Kosova M., Hola D., Wilhelmova N., Rothova O. The influence of low-temperature on the photochemical activity of chloroplasts and activity of antioxidant enzymes in maize leaves. *Biologia Plantarum.* 2009 Sep; 3 (3): 475-83.

126. Kosova K., Prasil I.T., Prasilova P., Vitamvas P., Chrpova J. The development of frost tolerance and DHN5 protein accumulation in barley (*Hordeum vulgare*) doubled haploid lines derived from Atlas 68 x Igri cross during cold acclimation. *J Plant Physiol.* 2010 Mar 15; 167 (5): 343-50.

127. Kosová K., Vítámvás P., Prášil I. T. Expression of dehydrins in wheat and barley under different temperatures. *Plant Sci.* 2011 Jul; 180 (1): 46-52.

128. Kovács Z., Simon-Sarkadi L., Sovany C., Kirsch K., Galiba G., Koscy G. Differential effects of cold acclimation and abscisic acid on free amino acid composition in wheat. *Plant Science*. 2011 Jan; 180 (1): 61-68.
129. Krecek P., Skupa P., Libus J., Naramoto S., Tejos R., Friml J. The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol*. 2009 Dec 29; 10 (12): 249-62.
130. Kuleung C., Baenziger P.S., Dweikat I. Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. *Theor. Appl. Genet*. 2004 Apr; 108 (8): 1147–50.
131. Kumar S., Wigge P. A. H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell*. 2010 Jan 8; 140 (1): 136-47.
132. Laudencia-Chingcuanco D., Ganeshan S., You F., Fowler B., Chibbar R., Anderson O. Genome-wide gene expression analysis supports a developmental model of low temperature tolerance gene regulation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BioMed Central Genomics*. 2011 Jun 7; 12 (12): 1471-2164.
133. Levitt J. Responses of plants to environmental stresses, Academic Press, New York, 1972. p. 697.
134. Levy A.A., Feldman M. Genetic and epigenetic reprogramming of wheat genome upon allopolyploidization. *Biol. J. Linn. Soc*. 2004; 82: 607–13.
135. Li G., Yu M., Fang T., Cao S., Carver B.F., Yan L. Vernalization requirement duration in winter wheat is controlled by *TaVRN-A1* at the protein level. *Plant J*. 2013 Dec; 76 (5): 742-53.
136. Lindlof A. Interplay between low-temperature pathways and light reduction. *Plant Signal Behav*. 2010 Jul; 5 (7): 820-25.
137. Liu B., Wendel J.F. Non-Mendelian phenomena in allopolyploid genome evolution. *Curr Genomics*. 2002 Dec; 3: 489–506.
138. Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. et al. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 1998; 10 (8): 1391-1406.

139. Los D. A., Murata N. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Nov 3; 1666 (1-2): 142-57.
140. Luo M.-C., Deal K. R., Yang Z.-L. Comparative genetic maps reveal extreme crossover localization in the *Aegilops speltoides* chromosomes. *Theor Appl Genet*. 2005 Oct 11; 111 (6): 1098-1106.
141. Ma N., Wang Y., Qui S., Kang Z., Che S., Wang G. et al. Overexpression of *OsEXPA8*, a root-specific gene, improves rice growth and root system architecture by facilitating cell expansion. *PLOS One*. 2013; 8 (10): 997-1007.
142. Maestra B, Naranjo T. Homoeologous relationships of *Aegilops speltoides* chromosomes to bread wheat. *Theor. Appl. Genet*. 1998; 97:181–186.
143. Mai C. D., Phung N. T. P., To H. T. M., Gonin M., Hoang G. T., Nguyen K. L. Genes controlling root development in rice. *Rice*. 2014; 7 (30): 1-11.
144. Maler H. R., Cordes E. H., Química Biológica. - Barcelona, Omega, 1971.
145. Mazzucotelli E., Mastrangelo A. M., Crosatti C., Guerra D., Stanca A.M., Cattivelli L. Abiotic stress response in plants: when post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. *Plant Sci*. 2008 Feb 15; 174 (4): 420-31.
146. Medina M., Bargues J., Perez-Alonso M., Salinas J. The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins. *Plant Physiology*. 1999 Feb; 119 (2): 463-70.
147. Medina J., Catala R., Salinas J. The CBFs: three *Arabidopsis* transcription factors to cold acclimate. *Plant Sci*. 2011. 180 (1): 3-11.
148. Miura K., Jin J. B., Lee I., Yoo C. Y., Stirn V., Miura T. et al. SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls *CBF3/DBER1A* expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2007 Apr; 19 (4): 1403-14.
149. Mizuno N., Sugie A., Kobayashi F., Takumi S. Mitochondrial alternative pathway is associated with development of freezing tolerance in common wheat. *J Plant Physiol*. 2008; 165 (4): 462-67.
150. Moffatt B., Ewart V., Eastman A. Cold comfort: plant antifreeze proteins. *Physiol Plantarum*. 2006 Jan 16; 126 (1): 5-16.

151. Monroy A. F., Labbe E., Dhindsa R. S. Low temperature perception in plants: effects of cold on protein phosphorylation in cell-free extracts. *FEBS Letters*. 1997 Jun 30; 410 (2): 206-09.
152. Nagelmuller S., Hiltbrunner E., Korner C. Critically low soil temperatures for root growth and root morphology in three alpine plant species. *Alp Botany*. 2015 Apr; 126 (1): 11-21.
153. Nagel-Volkmann J., Plieth C., Becker D., Lüthen H., Dörffling K. Cold-induced cytosolic free calcium ion concentration changes in wheat. *J Plant Physiol*. 2009 Nov 15; 166 (17): 1955-60.
154. Naghavi A., Sofalian O., Asghari A., Sedghi M. Relation between freezing tolerance and seed storage proteins in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Turkish Journal of Field Crops*. 2010; 15 (2): 154-58.
155. Nezami A., Solemani M. R., Ziaee M., Ghodsi M., Aval M.B. Evaluation of freezing tolerance of hexaploid triticales genotypes under controlled conditions. *Notulae Scientia Biologicae*. 2010 May; 2 (2): 2067-3264.
156. Novillo F., Medina J., Salinas J. *Arabidopsis* CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007; 104 (52): 21002-21007.
157. Ohta S. Phylogenetic relationship of *Aegilops mutica* Boiss. with the diploid species of congeneric *Aegilops-Triticum* complex, based on the new method of genome analysis using its B-chromosomes. *Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ*. 1991; 137: 1–116.
158. Orvar B. L., Sangwan V., Omann F., Dhindsa R. S. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J*. 2000 Sep; 23 (6): 785-94.
159. Paponov I.A., Teale W.D., Trebar M., Blihlou I., Palme K. The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends Plant Sci*. 2005 Apr; 10 (4):170-7.

160. Park Y.-J., Lee K., Kim N.-S. Simple Sequence Repeat Polymorphisms (SSRPs) for evaluation of molecular diversity and germplasm classification of minor crops. *Molecules*. 2009 Nov 10; 14 (11): 4546-69.
161. Páldi E., Szalai G., Janda T., Horváth E., Rácz I., Lásztity D. Determination of frost tolerance in winter wheat and barley at the seedling stage. *Biologia Plantarum*. 2001 Mar; 44 (1): 145-47.
162. Pearce S., Zhu J., Boldizsar A., Vagujfalvi A., Burke A., Garlend-Campbell K. et al. Large deletions in the *CBF* gene cluster at the *Fr-B2* locus are associated with reduced frost tolerance in wheat. *Theor Appl Genet*. 2013 Nov; 126 (11): 2683-97.
163. Pennycooke J. C., Jones M. L., Stushnoff C. Down-regulating α -galactosidase enhances freezing tolerance in transgenic petunia. *Plant Physiol*. 2003 Oct; 133 (2): 901-9.
164. Pennycooke J. C., Cheng H., Stockinger E. J. Comparative genomic sequence and expression analysis of *Medicago truncatula* and alfalfa subspecies falcate Cold-Acclimation-Specific genes. *Plant Physiol*. 2008 Mar; 146 (3): 1242-54.
165. Petcu E., Terbea M. Proline content and the conductivity test as screening methods for frost tolerance of winter wheat. *Bulgarian J Plant Physiol*. 1995; 21 (4): 3-11.
166. Prasil I., Zamecnik J. The use of a conductivity measurement method for assessing freezing injury. I. Influence of leakage time, segment number, size and shape in a sample on evaluation of the degree of injury. *Environ Exper Bot*. 1998 Aug; 40 (1): 1-10.
167. Prasil I.T., Prasilova P., Sasek A., Cerny J. Assessment of frost tolerance of wheat doubled haploids by gliadin electrophoresis. *Czech J Genet Plant Breed*. 2002; 38 (3-4): 104-8.
168. Qin F., Sakuma Y., Li J., Liu Q., Li Y. Q., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol*. 2004 Aug; 45 (8): 1042-52.

169. Raquin A-L., Depaulitis F., Lambert A., Galic N., Brabant P., Goldringer I. Experimental estimation of mutation rates in a wheat population with a gene genealogy approach. *Genetics*. 2008 Aug; 179 (4): 2195–2211.
170. Rovere F.D., Fattorini L., D'Angeli S., Veloccia A., Del Duka S., Cai G. et al. *Arabidopsis* SHR and SCR transcription factors and AUX1 auxin influx carrier control the switch between adventitious rooting and xylogenesis *in planta* and *in vitro* cultured thin cell layers. *Ann Bot*. 2015 mAR; 115 (4): 617-28.
171. Satbhai B.S., Santosh B.S., Ristova D., Busch W. Underground tuning: quantitative regulation of root growth. *J Exper Bot*. 2015; 66 (4): 1099-12.
172. Sandve S. R., Kosmala A., Rudi H., Fjellheim S., Rapacz M., Yamada T. et al. Molecular mechanisms underlying frost tolerance in perennial grasses adapted to cold climates. *Plant Sci*. 2001 Jan; 180: 69-77.
173. Sangwan V., Foulds I., Singh J., Dhindsa R. S. Cold activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx. *Plant J*. 2001 Jul; 27 (1): 1-12.
174. Santra D.K., Santra M., Allan R.E., Campbell K.G., Kidwell K. Genetic and molecular characterization of vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, and *Vrn-D1* in spring wheat germplasm from the Pacific Northwest region of the U.S.A. *Plant Breed*. 2009 Aug 31; 128 (6): 576-84.
175. Sarma R.N., Gill B.S., Sasaki T., Galiba G., Sutka J., Laurie D.A., Snape J.W. Comparative mapping of the wheat chromosome 5A *Vrn-A1* region with rice and its relationship to QTL for flowering time. *Theor Appl Genet*. 1998 Jul; 97 (1-2): 103-9.
176. Săulescu N. N., Braum H.-J., Cold Tolerance, Chapter 9. Application of Physiology in Plant Breeding, Editors: Reynolds M.P., Ortiz-Monasterio J.I., McNab A. Mexico, D.F.: CIMMYT. p. 246.
177. Sepsi A., Bucsí J. Physical mapping of the 7D chromosome using a wheat/barley translocation line (5HS.7DL) produced in a Martonvasari wheat background using microsatellite markers. *Cereal Research Communications*. 2009 Jan 1; 37 (Suppl): 297–300.

178. Schneider A., Molnar I., Molnar-Lang M. Utilization of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica*. 2008 Sep; 163 (1): 1-19.
179. Sharma S., Balyan H.S., Kulwal P.L. et al. Study of interspecific SSR polymorphism among 14 species from *Triticum-Aegilops* group. *Wheat Inf Serv*. 2002 Dec 20; 95: 23–28
180. Skinner D. Z., Garland-Campbell K. A. The relationship of LT₅₀ to prolonged freezing survival in winter wheat. *Canadian J Plant Sci*. 2008; 55 (5): 885-89.
181. Skinner D. Z. Post-acclimation transcriptome adjustment is a major factor in freezing tolerance of winter wheat. *Funct Integ Genomics*. 2009 Nov; 9 (4): 513-23.
182. Slageren, van M. W. Wild wheats: A monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. & Spach) Eig (*Poaceae*). Wageningen Agricultural University, ICARDA, Aleppo and Agricultural University, Wageningen, 1994. p. 513.
183. Snape J. W., Semikhodskii A., Fish L., Sharma R. N., Quarrie S. A., Galiba G. et al. Mapping frost tolerance loci in wheat and comparative mapping with other cereals. *Acta Agronomica Academiae Scientiarum Hungaricae*. 1997 Aug; 45 (3): 265-70.
184. Stokinger E. J., Gilmour S. J., Thomashow M. F. *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcription activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *PNAS*. 1997 Feb 4; 94 (3): 1035-40.
185. Stuart S.J., Tucker E.J., Tester M. Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. *Curr Opin Plant Biol*. 2011 Jun; 14 (3): 232-39.
186. Sofalian O., Mohammadi S. A., Aharizad S., Moghaddam M., Shakiba M. R. Mapping of QTLs for frost tolerance and heading time using SSR markers in bread wheat. *African J Biotechnol*. 2008; 9 (20): 5260-64.

187. Somers D.J., P. Isaac, K. Edwards. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2004 Oct; 109 (6): 1105–14.
188. Sotaimo A. J., Piippo M., Allahverdiyeva Y., Battchikova N., Aro E. M. Light has a specific role in modulating *Arabidopsis* gene expression at low temperature. *Plant Biol.* 2008 Jan 29; 8 (13): 1471-2229.
189. Sourdille P., Tavaud M., Charmet G., Bernard M. Transferability of wheat microsatellites to diploid *Triticeae* species carrying the A, B and D genomes. *Theor. Appl. Genet.* 2001 Aug; 103 (1-2): 346–52.
190. Su C.-F., Wang Y.-C., Hsieh T.-H., Lu C.-A., Tseng T.-H., Yu S.-M. A novel MYBS3-Dependent pathway confers cold tolerance in rice. *Plant Physiol.* 2010 May; 153 (1): 145-58.
191. Sutka J. Genetic control of frost tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica.* 1994 Oct; 77 (3): 277-82.
192. Sutka J., Galiba G., Vágújfalvi A., Gill B. S., Snape J. W. Physical mapping of the *Vrn-A1* and *Fr1* genes on chromosome 5A of wheat using deletion lines. *Theor Appl Genet.* 1999 Jul; 99 (1-2):199-202.
193. Sutton F., Chen D.-G., Ge X., Kenefick D. *Cbf* genes of the *Fr-A2* allele are differentially regulated between long-term cold acclimated crown tissue of freezing-resistant and –susceptible, winter wheat mutant lines. *Plant Biol.* 2009 Mar; 9 (34): 1-9.
194. Suzuki N., R. Mittler. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum.* 2006 Jan; 126 (1): 45-51.
195. Talanova V.V., Titov A. F., Topchieva L.V., Repkina N.C. Expression patterns of ABA-dependent and ABA-independent genes during wheat cold adaptation. *Russian J Plant Physiol.* 2011 Nov; 58 (6): 1005-10.
196. Talboys P.J., Healey J.R., Withers P.J.A., Jones D.L. Phosphate depletion modulates auxin transport in *Triticumaestivum* leading to altered root branching. *J Exp Bot.* 2014 Sep; 65 (17): 5023-32.

197. Tamayo P. R., Bonjoch N. P. Free proline quantification. Chapter 22 in Reigosa Roger M.J. (eds) Handbook of Plant Ecophysiology Techniques. Springer. 2001. pp. 365-382.
198. Tester M., A. Bacic. Basic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. Plant Physiol. 2005 Mar; 137 (3): 791-93.
199. The Pacific Northwest Conservation Farming Handbook. Chapter 6. Fertility Management. Fertilizer Application. Available from: <http://pnwsteep.wsu.edu/tillagehandbook/index.htm>
200. Thuillet A.C., Bru D., David J. Roumet P., Santony S., Sourdille P. et al. Direct estimation of mutation rate for 10 microsatellite loci in durum wheat, *Triticum turgidum* (L.) Thell. ssp *durum* Desf. // Mol Biol Evol. 2002 Jan 1; 19 (1): 122–25.
201. Tóth B., Galiba G., Fehér E., Sutka J., Snape J. W. Mapping genes affecting flowering time and frost resistance on chromosome 5B of wheat. Theor Appl Genet. 2003 Aug; 107 (3): 509-14.
202. Tremblay K., Ouellet F., Fournier J., Danyluk J., Sarhan F. Molecular characterization and origin of novel bipartite cold-regulated recrystallization inhibition proteins from cereals. Plant Cell Physiology. 2005 Jun; 46 (6): 884-91.
203. Trevaskis B., Hemming M.N., Dennis E.S., Peacock W.J. The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. Trends Plant Sci. 2007 Aug; 12 (8): 1360-85.
204. Uga Y., Sugimoto K., Ogawa S., Rane J., Ishitani M., Hara N. et al. Control of root system architecture by *DEEPER ROOTING 1* increases rice yield under drought conditions. Nature Genet. 2013 Aug 4; 45 (9): 1097-1102.
205. Uga Y., Kitomi Y., Kanno N., Kawai S., Mizubayashi T., Fukuoka S. A QTL for root growth angle on rice chromosome 7 is involved in the genetic pathway of *DEEPER ROOTING 1*. Rice. 2015 Feb 5; 8 (8): 1-8.
206. Ulrich H. D. Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest. Trends Cell Biol. 2005 Oct; 15 (10): 525-32.

207. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M. et al. Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 2012 Aug; 40 (15): e115.
208. Vágújfalvi A., Galiba G., Cattivelli L., Dubkovsky J. The cold-regulated transcriptional activator *Cbf3* is linked to the frost-tolerance locus *Fr-A2* on wheat chromosome 5A. *Mol Gen Genet*. 2003 Apr; 269 (1): 60-67.
209. Vítamvás P., Prášil I. T. WCS120 protein family and frost tolerance during cold acclimation, deacclimation and reacclimation of winter wheat. *Plant Physiol Biochem*. 2008 Nov; 46 (11): 970-76.
210. Vogel J. T., Zarka D. G., Van Buskirk H. A., Fowler S. G., Thomashow M. F. Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature Transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 2005 Jan; 41 (2): 195-211.
211. Waines J.G, Ehdaie B. Optimizing root characters and grain yield in wheat. *Czech J Genet Plant Breed*. 2005; 41: 326–330.
212. Waines J.G, Ehdaie B. Domestication and crop physiology: roots of Green Revolution wheat. *Ann Bot*. 2007 Oct; 100 (5): 991–998.
213. Wang J.-H., Chen K.-L., Li H.-W., He J., Guan B. Tibetan hulless barley dehydrin, *dhn4*, cloning and transforming into tobacco. *J Agricult Environ Internat Dev*. 2009; 103 (3): 173-84.
214. Wang L., Luo Y., Zhang L., Zhao J., Hu Z., Fan Y., Zhang C. Isolation and characterization of a C-repeat binding transcription factor from maize. *J Integr Plant Biol*. 2008 Aug; 50 (8): 965-74.
215. Wang J., Qi P., Wei Y., Liu D., Fedak G., Zheng Y. Molecular characterization and functional analysis of elite genes in wheat and related species. *J Genet*. 2010 Dec; 89 (4): 539-48.
216. Waninge J. A modified method of counting chromosomes in root tip cells of wheat. *Euphytica*. 1965 Nov; 14 (3): 249-50.
217. Wienfield M. O., Lu C., Wilson I. D., Coghill J. A., Edwards K. J. Plant responses to cold: Transcriptome analysis of wheat. *Plant Biotechnol J*. 2010 Sep; 8 (7): 749-71.

218. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol.* 2002 Jun; 5 (1): 218-23.
219. Witcombe J.R., Hollington P. A., Howarth C.J., Reader S., Steele K.A. Breeding for abiotic stresses for sustainable agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society. Biology.* 2008 Feb 27; 363 (1492): 703-16.
220. Yaish M. W. F., Doxey A. C., McConkey B. J., Moffatt B. A., Griffith M. Cold-active winter rye glucanases with ice-binding capacity. *Plant Physiol.* 2006 Aug; 141 (4): 1459-72.
221. Yamaguchi-Shinozaki K., K. Shinozaki. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell.* 1994 Feb; 6 (2): 251-64.
222. Yamazaki T., Kawamura Y., Uemura M. Extracellular freezing-induced mechanical stress and surface area regulation on the plasma membrane in cold-acclimated plant cells. *Plant Signal Behav.* 2009 Mar; 4 (3): 231-33.
223. Yan L., Helguera M., Kato K., Fukuyama S., Sherman J., Dubkovsky J. Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat. *Theor Appl Genet.* 2004 Nov; 109 (8): 1677-86.
224. Yan L., Fu D., Li C., Blechi A., Tranquilli G., Bonafede M. et al. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *PNAS.* 2006 Oct 30; 103 (51): 19581-86.
225. Yang S.-H., Wang L.-J., Li S.-H. Ultraviolet-B irradiation-induced freezing tolerance in relation to antioxidant systems in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Environ Exp Bot.* 2007 Jul; 60 (3): 300-7.
226. Yang, Y., Sornaraj, P., Borisjuk, N., Kovalchuk, N., and Haefele, S.M., Transcriptional network involved in drought response and adaptation in cereals, in *Abiotic and Biotic Stress in Plants Recent Advances and Future Perspectives*, Shanker, A.K., and Shanker Ch., eds., Published by ExLi4EvA, 2016, chapter 1, pp. 3–29.

227. Yu L.-H., Miao Z.-Q., Qi G.-F., Wu J., Cai X.-T., Miao J.-L. et al. MADS box transcription factor AGL21 regulates lateral root development and responds to multiple external and physiological signals. *Mol Plant*. 2014 Nov; 7 (11): 1653-69.

228. Zabotin A. I., Barisheva T. S., Trofimova O. I., Toroschina T. E., Larskaya I. A., Zabotina O. A. Oligosaccharin and ABA synergistically affect the acquisition of freezing tolerance in winter wheat. *Plant Physiol Biochem*. 2009 Sep; 47 (9): 854-58.

229. Zarka D. G., Vogel J. T., Cook D., Thomashow M. F. Cold induction of *Arabidopsis CBF* genes involves multiple ICE (Inducer of CBF expression promoter elements and cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiol*. 2003 Oct; 133 (2): 910-18.

230. Zhang L.Q., Liu D.C., Yan Z.H. et al. Rapid changes of microsatellite flanking sequence in the allopolyploidization of new synthesized hexaploid wheat. *Sci. in China Ser. C*. 2004 Nov; 47 (6): 553–61.

231. Zhang X., Fowler S. G., Cheng H., Lou Y., Rhee E. J., Stockinger E. I. et al. Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis*. *Plant J*. 2004 Sep; 39 (6): 905-19.

232. Zhang C., Fei S.-Z., Arora R., Hannapel D. J. Ice recrystallization inhibition proteins of perennial ryegrass enhance freezing tolerance. *Planta*. 2010 Jun; 232 (1): 155-64.

233. Zhang Z., Huang R. Enhanced tolerance to freezing in tobacco and tomato overexpressing transcription factor *TERF2/LeERF2* is modulated by ethylene biosynthesis. *Plant Mol Biol*. 2010 Jun; 73 (3): 241-49.

234. Zhang X.-Y., Liang C., Wang G.-P., Luo Y., Wang W. The protection of wheat plasma membrane under cold stress by glycine betaine overproduction. *Biologia Plantarum*. 2010 Mar; 54 (1): 83-8.

235. Zhang J.W., Xu L., Wu Y.R., Chen X.A., Liu Y., Zhu S.H. et al. OsGLU3, a putative membrane-bound endo-1,4-beta-glucanase, is required for root

cell elongation and division in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Plant*. 2012 Jan; 5 (1): 176-86.

236. Zhao Y., Gowda M., Wurschum T., Longin C. F. H., Korzum V., Kollers S. et al. Dissecting the genetic architecture of frost tolerance in Central European winter wheat. *J Exp Bot*. 2013 Nov; 64 (14): 4453-60.

237. Zhao Y., Hu Y., Dai M., Huang L., Zhou D.-X. The WUSCHEL-Related homeobox gene WOX11 is required to activate shoot-borne crown root development in rice. *Plant Cell*. 2009 Mar; 21 (3): 735-48.