

Національна академія наук України  
Інститут молекулярної біології і генетики

На правах рукопису

УДК 575.113:575.015.3:633.11

Чеботар Сабіна Віталіївна

Молекулярно-генетичний аналіз інтрогресії елементів  
генома егілопеа в геном м'якої пшениці

03.00.03 - молекулярна біологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ 1995

Робота виконана у відділі генної інженерії Селекційно-генетичного інституту УААН

Науковий керівник: доктор біологічних наук  
професор Ю. М. Сиволап

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук С. С. Малюта  
кандидат біологічних наук О. М. Живсуп

Провідна установа: Інститут генетики і цитології АН Білорусі

Захист дисертації відбудеться *20 грудня* 1995 р.  
о ..... годині на засіданні Спеціалізованої ради ....  
Інституту молекулярної біології і генетики НАН України  
за адресою (252143, м. Київ, вул. Зоболтного, 24).  
З дисертції можна ознайомитися в бібліотеці Інституту  
молекулярної біології і генетики НАН України

Автореферат розіслано *20 грудня* 1995 р.

Вчений секретар  
Спеціалізованої ради  
кандидат біологічних наук

М. Л. Лукаш

*Лукаш*

Актуальність проблеми.

ліплення сільськогосподарських рослин, як правило, пов'язаний з розробкою шляхів розширення генофонду культурних видів за рахунок чужорідного генетичного матеріалу. Незважаючи на значний прогрес в одержанні міжвидових гібридів, молекулярно-генетичні процеси, що приймають участь в створенні форм віддаленого гібридного походження, залишаються в цілому не вивченими. Аналіз мінливості генома в еволюційному плані і в зв'язку з інтрогресією віддаленого в генетичному відношенні матеріалу, стає актуальним завданням молекулярної генетики.

Потребують розгляду проблеми дослідження і оцінки мінливості геномів, викликаної віддаленою гібридизацією, підбору молекулярних маркерів, що дозволяють тестувати інтрогресію чужорідного генетичного матеріалу. Ефективним напрямком у цьому плані є вивчення генетичного поліморфізму серед культурних видів пшениці і їх диких сородичів.

Мета завдання роботи. Метою дисертаційної роботи є аналіз форм, одержаних від гібридизації *Triticum aestivum* з *Aegilops cylindrica*, а також проведення аналізу між- і внутривидової мінливості, уточнення філогенетичних взаємовідносин у деяких видів триби *Triticeae*.

Непосередніми завданнями роботи були:

1. Одержання і аналіз бібліотеки клонів високоповторюваної ДНК *Ae. tauschii* (J). Аналіз генетичного поліморфізму високоповторюваних послідовностей серед видів *Triticeae* і форм гібридного походження.
2. Визначення рівня міжвидової мінливості, встановлення

ступеня геномної спорідненості між видами, залученими до віддаленої гібридизації в результаті використання ПДРФ-аналізу Nог-локусів, електрофорезу запасних білків, RAPD-аналізу.

3. Бивчення генетичної мінливості, що виникла у наслідок віддаленої гібридизації, в порівнянні з між- і внутрішньовидовою варіабільністю, класифікація селекційного матеріалу відповідно до генетичних дистанцій, встановлених при дослідженні різноманітних локусів геномів з допомогою ПДРФ, електрофорезу запасних білків, RAPD -аналізу.

#### Наукова новизна і практичне значення роботи.

Наукова новизна дисертації полягає в комплексному підході до дослідження поліморфізму форм, одержаних від віддаленої гібридизації, а також поліморфізму видів *Triticaceae*, які представляють пул генів для покращення культурної пшениці. На основі підрахунків даних, одержаних внаслідок ПДРФ та RAPD-аналізу, електрофорезу запасних білків, встановлені філогенетичні взаємовідношення між досліджуваними видами *Triticaceae*.

Практичне значення роботи полягає в одержанні клонотеки високоповторюваних послідовностей D генома *Ae. tauschii*, ряду клонів, які можуть бути використаними при дослідженні міжвидового поліморфізму і детекції інтрогресії генетичного матеріалу *Ae. cylindrica* в геном м'якої пшениці. Розроблений комплексний підхід до дослідження інтрогресивних форм, що полягає в використанні трьох методів: ПДРФ, електрофорезу запасних білків, RAPD-аналізу, які дозволяють більш повно характеризувати геноми і тестувати мінливість, викликану віддаленою гібридизацією. Результати роботи можуть знайти

використання у відповідних селекційних програмах.

Апробація роботи. Основні результати роботи були повідомлені на міжнародному симпозиумі "Керування генетичною мінливістю сільськогосподарських рослин" (Ялта, 1992), на міжнародній конференції "Plant Genome II" (San Diego, USA, 1994), на конференції "Молекулярно-генетичні маркери і селекція рослин" (Київ, 1994), міжнародній конференції "Plant Genome III" (San Diego, USA, 1995).

Публікації. Основні положення дисертації відображені в 7 друкованих працях.

Структура і обсяг роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, експериментальної частини, результатів і їх обговорення та висновків.

Робота викладена на 188 сторінках машинописного тексту, вміщує 21 малюнок і 10 таблиць. Список використаної літератури становить 323 джерел.

На захист виносяться:

1. Результати дослідження генетичної мінливості, що виникла внаслідок віддаленої гібридизації і інтрогресії елементів чужорідного генома в гекс м'якої пшениці.
2. Розподіл видів і селекційних форм за рівнем генетических дистанцій на базі аналізу даних ІДГФ, ПЛР і спектра запасних білків.
3. Результати аналізу між- і внутрішньовидової мінливості клонів високих повторів *Aegilops tauschii*.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для дослідження взято 12 форм м'якої пшениці ВС2, F5/6 гібридного походження, що одержані від схрещування Одеської

напівкарликової х *Aegilops cylindrica*; 3 сорти м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L. (ABD)): Одеська напівкарликова, Безоста I, Обрій, 14 видів триби Triticeae: *T. monoccossus* L. (A), *T. boeoticum* Boiss (A<sup>b</sup>), *T. durum* Desf. (AB), *T. palmovae* Ivanov. (A<sup>b</sup>D), *Ae. tauschii* Coss (D), *Ae. caudata* L. (C), *Ae. umbellulata* Zhuk. (C<sup>u</sup>), *Ae. cylindrica* Host. (CD), *Ae. crassa* Boiss (Dm<sup>ab</sup>), *Ae. ventricosa* Taush (DM<sup>v</sup>), *Ae. triuncialis* L. (CC<sup>u</sup>), *Ae. biuncialis* Vis (C<sup>u</sup>M<sup>a</sup>), *Ae. triaristata* Willd (C<sup>u</sup>M<sup>t</sup>), *Ae. columnaris* Zhuk. (C<sup>u</sup>M<sup>c</sup>).

ДНК виділяли з етиолованих проростків і листя за методом, розробленим в нашій лабораторії. Рестрикцію і електрофорез проводили згідно рекомендацій, наведених в методах аналізу генома (Дейвіс, 1990). Фракціонування ДНК по швидкості реасоціації здійснювали з допомогою хроматографії на гідроксиапатиті (Britten, Kohne, 1976).

Клонування Bsp 143 I фрагментів ДНК *Ae. tauschii* по Bam HI сайту в pUC 18 проводили згідно рекомендацій Maniatic і ін. (1984). Скрінінг клонів здійснювали за методом - Grunstein and Hogness (1975). Для виділення плізмидної ДНК використовували метод лужного лізису Birnboym and Doly (1979). Саузерн-блот гібридизацію проводили, як описано Maniatic і інш. (1984).

Зонди позначали методом розсіяної затравки (Feinberg, Vogelstein, 1983) з використанням набору Multiprime DNA Labelling System (Amersham). Для ПДРФ-аналізу NOR-локусів досліджуваних форм і видів використали плазмиду pTU 3, що містить міжгенний спейсер рРНК генів, фланкований фрагментами послідовностей 18S і 26S рРНК генів.

Ампліфікацію ДНК з довільними праймерами проводили на

приладі "Біотерм модель 91". Реакційна суміш об'ємом 20 мкл для полімеразної ланцюгової реакції вмішувала: 50 мМ KCl, 20 мМ Tris - HCl pH 8,4 (25°C), 2-5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Tween 20, по 0,2 мМ кожного dATP, dCTP, dTTP, dGTP, 0,2 мкМ праймера і 1 од. Taq-полімерази (Біотех). У пробірці поверх реакційного розчину наносили 50 мкл мінерального масла. Ампліфікацію проводили в режимі: перший цикл - 65°C - 30 сек, 75°C - 30 сек, 94°C - 3,5 хв, другий цикл - 42°C - 2 хв, 72°C - 2 хв, 94°C - 1 хв, 33 цикла - 52°C - 1,6 хв, 72°C - 2 хв, 94°C - 1 хв, останній цикл - 52°C - 2 хв, 72°C - 6 хв.

В ролі праймерів використані олігонуклеотидні послідовності, синтезовані на автоматичному ДНК-синтезаторі "Applied Biosystems 380B" фосфорамидитовим методом:

П1. 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

П2. 5'-AGGTCTTAACCTTGACTAACA-3'

П3. 5'-GAGCAAGTTCAGCCTGG-3'

П4. 5'-CCTTCTCACTTGGCAAATAC-3'

Продукти ампліфікації фракціонували електрофезом в 2% агарозному гелі з 1хTBE.

#### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. Клонування високоповторюваної ДНК *Aegilops tauschii* (D) і аналіз між- і внутривидового поліморфізму серед деяких видів *Triticeae*.

Для вирішення завдань, поставлених в роботі, були виділені і клоновані високоповторювані послідовності ДНК з геному *Ae. tauschii* (D). Для відбору ВПІ, специфічних D геному *Ae. tauschii*, проводили Саузерн-блот гібридизацію рестрикованих рекомбінантних плазмід з <sup>32</sup>P-позначеною ДНК пшениці.

Інтенсивно гібридизуючі пДНК вибраковували.

Паралельна дот-блот гібридизація рекомбінантних пДНК з радіоактивно позначеною тотальною ДНК *T. aestivum* і ДНК *Ae. tauschii* продемонструвала високу схожість картин гібридизації.

Для відбору специфічних генів D *Ae. tauschii* клонів провели попередню "забивку" фільтрів фрагментованої до 1000-200 п.н. ДНК *T. aestivum* згідно методу, запропонованому Aramthawat-Jorson et al. (1990). Проте, виявити клоновані послідовності, присутні тільки в геному D *Ae. tauschii* і що не зустрічаються в геномі пшениці, не вдалось.

Для визначення наявності клонованих послідовностей в геномах видів *Triticeae* проводили дот-блот гібридизацію ветагк ВПІ з тотальною ДНК *T. aestivum* (ABD), *Ae. tauschii* (D), *Ae. cylindrica* (CD), а також ячменю (H), жита (R) і ДНК *Vitis vinifera* - виду, що не має близькоспоріднених відношень з трибою *Triticeae*.

Наслідки дот-гібридизації продемонстрували значну подібність D геномів *Ae. tauschii*, *T. aestivum*, *Ae. cylindrica*, а також наявність аналогічних ВПІ в C і A геномі.

Одержані результати можуть свідчити про наявність в досліджуваних видах різноманітних за рівнем дивергенції сімей високих порторів. Представлені в однаковій кількості копій в різних геномах високі повтори, можливо, забезпечують загальні структурно-динамічні функції хромосом.

Для вивчення організації і варіабільності послідовностей, що часто повторюються в геномах видів *Triticeae*, а також відбору клонів, що виявляють поліморфізм між культур-

ною пшеницею: дилми видами, тобто, потенційно корисних для детекції інтрогресії, тотальну ДНК зидів - *T. aestivum* L. (ABD), *Ae. tauschii* Coss. (D), *Ac. cylindrica* Host. (CD), *Ae. caudata* L. (C), *T. monococcum* L. (A), *H. vulgare* L. (H), *S. cereale* (R) рестриціювали Bam HI, Eco RI, Eco RV, Taq I і гібридували з вставками в жорстких умовах.

Серед клонованих послідовностей виявлені тандемноорганізовані і дисперговані повторювані послідовності.

Клоновані послідовності виявляють мінливість за кількісною наявністю і поліморфізм на рівні довжин рестрикційних фрагментів. Міжвидовий поліморфізм проявляється при гібридизації з зондами pAt 231, pAt 219, pAt 48, pAt 55, pAt 613

При використанні клонованих нами ВПІ внутривидовий поліморфізм не виявлений.

Використання цих послідовностей для детекції інтрогресії не дозволило виявити значний поліморфізм серед форм гібридного походження.

Наслідки експерименту підтверджують високий рівень спорідненості геномів досліджуваних видів *Triticaceae*. Значна геномна специфічність кількісного характеру і по розподілу показана для деяких сімей високих повторів. Згідно даних Zhang, Dvorak (1980), Сьятшев и др. (1988) використання високих повторів для детекції інтрогресії генетичного матеріалу з видалених видів досить перспективне, в той же час, виявлення інтрогресії ДНК близькоспоріднених генсмір зустрічається зі значними труднощами в зв'язку з подібним кількісним і якісним представництвом ВПІ в гомологічних геномах.

## 2. ПДРФ-аналіз мінливості рДНК

З метою визначення рівня міжвидової мінливості встановлення ступеня геномної спорідненості між видами, залученими до віддаленої гібридизації, і можливості диференціювати різні близькоспоріднені геноми, тестуючи хромосоми, що містять ядерні організатори, нами був проведений ПДРФ-аналіз варіабільності в NOR-локусах 14 видів *Triticeae*.

В проведених дослідженнях ДНК кожного аналізованого виду розщепляли рестриктазами *Bam* HI, *Taq* I, *Msp* I, фракціонували за допомогою електрофорезу, переносили на найлонові фільтри і гібридизували з <sup>32</sup>P-rTU 3.

Серед розглянутих видів за подібністю спектрів гібридизації виділяються: *Ae. columnaris* (C<sup>4</sup>M<sup>6</sup>) і *Ae. triaristata* (C<sup>4</sup>M<sup>6</sup>), *Ae. crassa* (DM<sup>3</sup>) і *Ae. ventricosa* (DM<sup>3</sup>) при рестрикції *Bam* HI і *Msp* I. При використанні фермента *Taq* I всі види мали специфічний малюнок гібридизації.

Внутр.видового поліморфізму рДНК серед індивідуальних рослин місцевої популяції *Ae. cylindrica* гібридизацією з зондом rTU 3 не було виявлено.

При використанні *Bam* HI і *Msp* I усі форми *Ae. tauschii* розподілені на дві групи, а з *Taq* I показана специфічність спектрів гібридизації досліджених форм.

Міжсортний поліморфізм, виявлений гібридизацією з rTU 3, був не суттєвий. Сорти Безоста і Обрій при рестрикції *Bam* HI показували практично ідентичну картину гібридизації, в той час, як спектр сор. у Одеська напівкарликова значно відрізнявся. Використання *Msp* I в даному експерименті не дозволило чітко диференціювати сорти м'якої пшениці. Гібридизація з *Taq* I рестрикованої ДНК показала подібність сортів Безоста і

### 1 Обрій.

Гібридизація зонду рТУ 3 з ДНК інтрогресивних форм пшениці виявила високий рівень поліморфізму в районі NOR локусів і показала інтрогресію генетичного матеріалу *Ae. cylindrica* в геном *T. aestivum*.

Відмічені такі зміни в спектрах гібридизації у формах гібридного походження в порівнянні з вихідними батьківськими формами: повне складення спектрів гібридизації, характерних батьківським формам, послаблення інтенсивності ряду полос із спектра гібридизації характерного материнській формі, поява нових полос, не відмічених у батьківських рослин.

### • 3. Аналіз поліморфізму запасних білків

Враховуючи до уваги локалізацію рРНК-генів і генів, кодуючих запасні білки, а також те, що їх аналіз широко використовується для генетичної оцінки селекційного матеріалу, було цікаво порівняти генетичну мінливість, виявлену рчаслідок ПДРФ аналізу рДНК і визначеною за даними поліморфізму запасних білків.

Наявність зчеплення локусів NOR і кодуючих запасні білки в хромосомі 1B показали Snape et al. (1985). Передбачається (Jascon et al., 1985) що в хромосомі 1B гени, кодуючі рРНК і запасні білки, розташовані в такому порядку NOR B1 - Gli B3 - Glu B1. Зчеплення між Gli B2 і NOR B2 відмічало і в хромосомі 6B (Dvorak, Chen, 1984).

Гени, кодуючі запасні білки ендосперму, також як і гени рРНК, мають кластерну організацію, але відрізняються по кількості копій. Рибосомні гени відносяться до середньоповторюваної (5000 - 10000) групи, а гліадинові і глістенинові -

до малокопійних (10 -100) послідовностей.

Белика різномалітність компонентного складу гліадинів, а також високо- (HMW) і низькомолекулярних (LMW) глютенінів є характерною для видів триби Triticeae.

Внутривидовий поліморфізм гліадинів і глютенінів був оцінений в гопуляції рослин *Ae. cylindrica*, зібраних на полях селекційно-генетичного інституту. При порівнянні окремих рослин значної мінливості не виявлено.

Показана значна внутривидова мінливість серед досліджуваних представників *Ae. tauschii*, що були отримані з різних географічних зон.

Помітна мінливість форм віддаленого гібридного походження спостерігається поліморфізмом запасних білків ендосперму.

У ряду ліній (10/6, 10/11, 12/15, 14/10, 17/53 і 17/56) не синтежується помітно, кількості деяких високомолекулярних гліадинів, типових Одеській напівкарликовій і контрольованих локусом *Gli D1*. У цих ліній експресується інтрегрований в пшеницю локус *Gli D1* *Ae. cylindrica*, який проявляється у вигляді групи повільнорухомих гліадинів, не характерних для пшениці і відсутніх у відомих сортів світової колекції.

У лінії 11/46, що гетерогенна по алелях локуса *Gli D1*, кодомінантно експресуються обидва паралельних варіантів білків, як пшениці, так і егілопса. Лінії, в яких пшеничний варіант білків, кодуемый локусом *Gli D1* пшениці, змінений на варіант егілопса, в SDS- гелі мають в середній зоні спектра характерний для *Ae. cylindrica* набір з чотирьох електрофоретичних компонентів, представлених, очевидно, також гліадинами.

#### 4. Генетичний поліморфізм, виявлений ПЛР

Молекулярно-генетичний поліморфізм між видами *Triticeae* досліджували методом ампліфікації ДНК з допомогою полімеразної ланцюгової реакції з довільними праймерами (RAPD).

Вказані праймери при ампліфікації геномної ДНК дозволяють виявляти від 4 до 12 смуг на зразок, з молекулярною масою від 2 т.п.н. до 300 п.н. Загальна кількість різноманітних за молекулярною масою смуг, генеруваних ампліфікацією ДНК з вказаними праймерами, склала 166. Поліморфні смуги, відповідні продуктам ПЛР, розцінювали як одиночні локуси в геномі досліджуваних видів згідно працям J. Williams et al. (1990), Devos, Gale (1992), Kazan et al. (1993).

В роботі була розглянута присутність /відсутність продуктів ампліфікації і інтенсивність окраски смуг. Відсутність RAPD-полоси розцінюється як наслідок алейного стану локуса. Збільшення інтенсивності окраски продукту ПЛР може бути наслідком ампліфікації фрагменту всередині тандемного повтору в локусі, який поліморфний за кількістю копій в порівнюваних зразках. Не виключені в цьому випадку і відмінності в гомології послідовностей, що обмежують сайт гібридизації праймера (Hunt, Page, 1992).

ПЛР з праймером П1 виявила значний міжвидовий поліморфізм, електрофоретичний спектр продуктів ампліфікації є видоспецифічним. При ампліфікації з праймером П2 відмічено 20 різних за молекулярною вагою смуг продуктів ампліфікації ДНК, досліджуваних видів *Triticeae*. Ампліфікація з праймерами П3 і П4 також дозволяє виявляти міжвидовий поліморфізм. Кількість смуг на зразок, що визначається при ампліфікації з праймерами П3, склала від 4 до 11, а з П4 - від 11 до 17 в

залежності від генотипу.

Кореляції між рівнем плоідності різних видів *Triticeae* і числом ПДР-фрагментів не відмічено, що близько до даних, одержаних Wolff et al. (1993).

При аналізі міжвидового поліморфізму стало можливим тестувати 106 ПДР-локусів у досліджуваних видів *Triticeae*, де середній рівень поліморфних смуг серед продуктів ампліфікації становив 94,25%.

Оцінку внутривидового поліморфізму, виявленого ДНК ампліфікацією з праймерами П1, П2, П3, П4, проводили на трьох сортах м'якої пшениці *T. aestivum*: Одеська напівкарликова, Обрій, Безоста І і на окремих рослинах сорту Одеська напівкарликова. У досліджуваних сортів м'якої пшениці при ампліфікації ДНК з праймером П1 знаходимо 10 смуг, міжсортного поліморфізму практично не виявлено (подібність 90%), сорти відрізняються по одному фрагменту. Значного міжсортного поліморфізму П3 і П4 не виявляють, рівень поліморфних смуг при використанні даних праймерів серед досліджуваних сортів склав 2%. Відмічений низький рівень міжсортної мінливості м'якої пшениці відповідає даним за оцінкою ПДР детектованого поліморфізму 12 сортів *T. aestivum* Devos and Gale (1992) і узгоджується з думкою Gale (1990) про невисокий рівень генетичного поліморфізму серед сортів *T. aestivum*, встановлено го ПДР-аналізом.

Генетичний поліморфізм, виявлений серед продуктів ампліфікації індивідуальних рослин *Ae. cylindrica* склав 20%.

Аналізували внутривидову мінливість геномів дев'яти представників виду *Ae. tauschii* (в тому складі представників різновидів *ausquarrosa* і *strangulata*). Внаслідок ампліфіка-

ції ДНК досліджуваних форм з праймерами П1, П2, П3, П4 виявлено 62 RAPD-поліси, кількість поліморфних продуктів ПЦР склала 61%, а рівень подібності 39%. Використана в роботі кількість праймерів достатня для чіткого розрізнення підвидів і окремих форм *Ae. tauschii*.

В проведених нами дослідях підтверджується положення про те, що діапазон внутривидової мінливості серед диких видів вищий, ніж у культурних видів.

Вказані праймери при ампліфікації з батьківськими і інтрогресивними формами дозволили проаналізувати 69 локусів.

Рівень поліморфізму серед ампліфікованих фрагментів ДНК батьківських форм Сдеської напівкапличкової і *Ae. cylindrica* був 70 %. Інтрогресивні форми мали подібні спектри розподілу продуктів ампліфікації, близькі до материнської форми.

В ряді форм було відмічено наявність специфічних батьківській формі RAPD-смуг. В 10 локусах, виявлених RAPD аналізом, відмічена інтрогресія генетичного матеріалу *Ae. cylindrica* в геном м'якої пшениці.

В спектрі продуктів ампліфікації ряду форм виявлені смуги, які не характерні батьківським. Такі результати одержані по 4 локусах серед 12 інтрогресивних форм.

Внаслідок проведеної роботи можна зробити висновок, що полімеразна ланцюгова реакція з праймерами П1, П2, П3, П4 дозволяє чітко розрізняти види *Triticeae* і є ефективним методом детекції мінливості, що викликається інтрогресією чужорідного генетичного матеріалу в геном *T. aestivum*.

## 5. Кластерний аналіз генетичних дистанцій

Для виявлення характеру взаємовідношень і встановлення

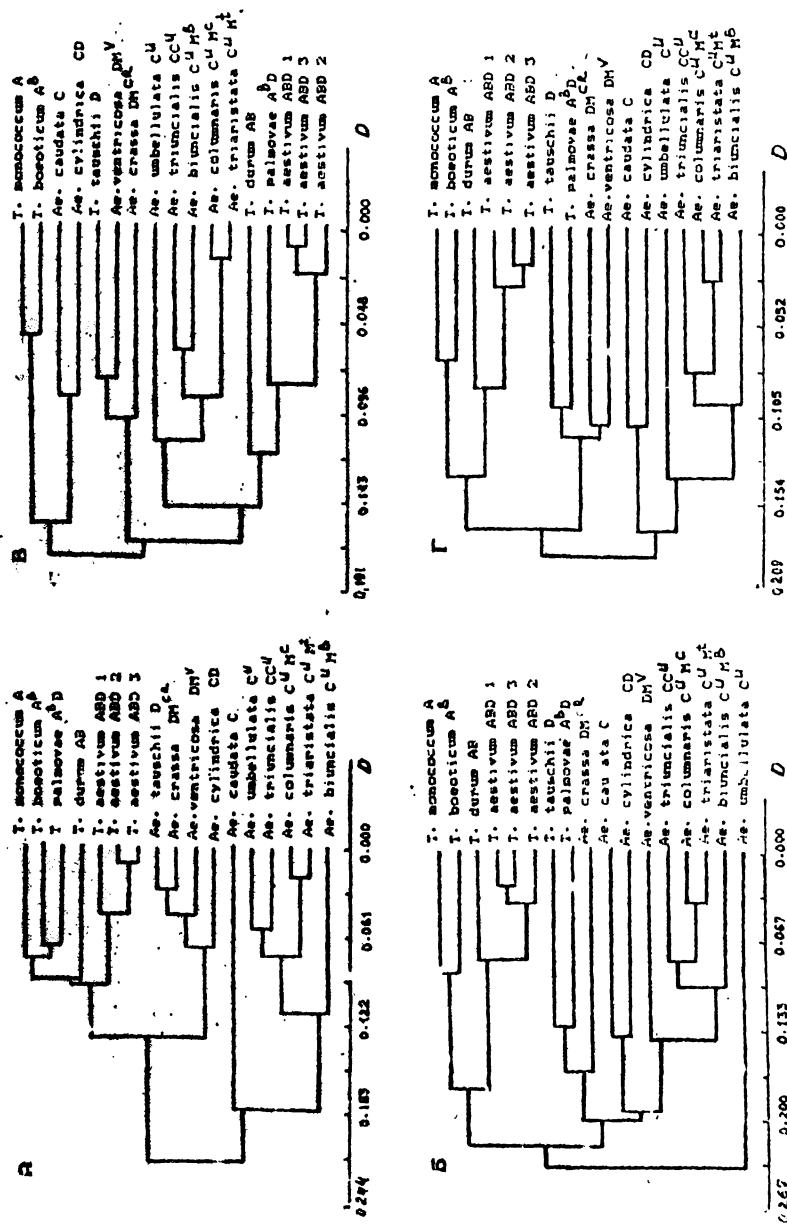
ступеня близькості геномів досліджуваних видів *Triticeae* необхідно дослідити фракції геномів з різним рівнем дивергенції і одержати об'єктивну картину на основі аналізу мінливості локусів, характерних для всього геному. Проведено порівняння результатів аналізів, отриманих з допомогою трьох методів аналізу генетичної мінливості: поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів, поліморфізму запасних білків (гліадинів, глютенінів), а також даних, одержаних RAPD-аналізом. Результати експериментів були аналізовані парно-груповим методом з арифметичним середнім за програмою UPGMA.

Цей метод дозволяє будувати дендрограми, послідовно об'єднуючи види (або групи видів) з мінімальними генетичними дистанціями. Для одержання відповідних матриць дистанцій було використано алгоритм Чей і Лі (Nei, Li, 1979). Одержані дендрограми представлені на мал. 1. Згідно схеми показаній на мал. 1 Г. види *Triticeae* згруповані відповідно розподілу генетичних дистанцій, розрахованих за даними Саузерн-блот гібридизації рРНК-генів з використанням ендонуклеаз *Bam* HI, *Taq* I, *Msp* I, електрофорезу запасних білків, RAPD-аналізу.

Проведені нами дослідження дозволяють доповнити уяву систематики про рід *Aegilops*, висловлену рядом авторів - Eig (1929), Zhukovsky (1928) і виразити перевагу більш сучасній систематиці що наведена Віткомбе (Witcombe, 1983).

Генетичні дистанції між сортами *T. aestivum*: Одеська напівкормікова, Обрій, Безоста і склали: за даними ПДРФ-аналізу 0,011-0,058, за даними аналізу електрофорезу запасних білків 0,027-0,050, за даними ПШР-аналізу 0,010-0,026.

При дослідженні індивідуальних рослин сорту Одеська на-



Мал. 1. Дендрограми філогенетичних взаємовідносин, що одержані в результаті кластерного аналізу генетичних дистанцій, у видів *Triticaceae* розрахованих за даними: А). ЦДФ, Б). електрофореа гліадинів і глітенінів, В). RAPD-аналіза, Г). суцарна схема за даними ЦДФ, електрофореа запасних білків і RAPD-аналіза.

тівкарликова за даними ПДРФ, ПШР-аналізу, електрофорезу запасних білків поліморфізму виявлено не було.

Аналіз генетичних дистанцій у представників виду *Ae. tauschii* показав, що досліджувані зразки *Ae. tauschii* виявляють генетичний поліморфізм. Так, генетичні дистанції встановлені за даними Саузерн-блот гібридизації, мали діапазон варіювання від 0,00 між колекційними номерами K-529 і K-504 до 0,03 між K-79 і іншими формами.

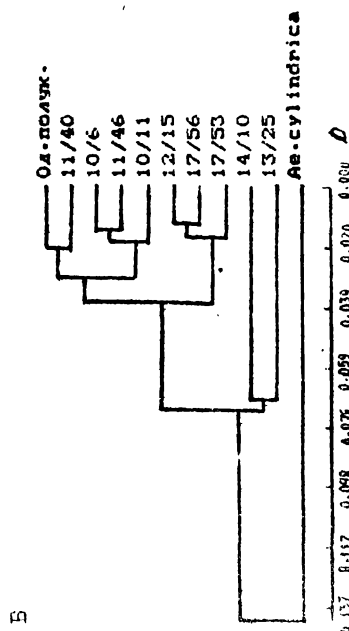
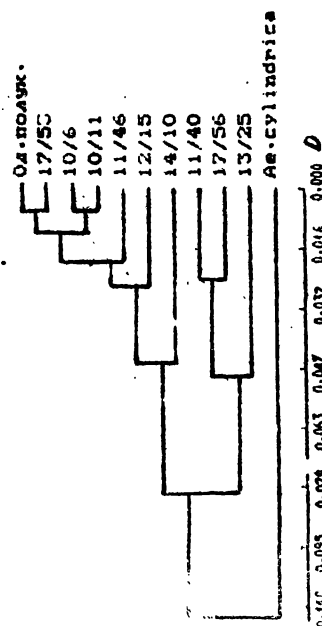
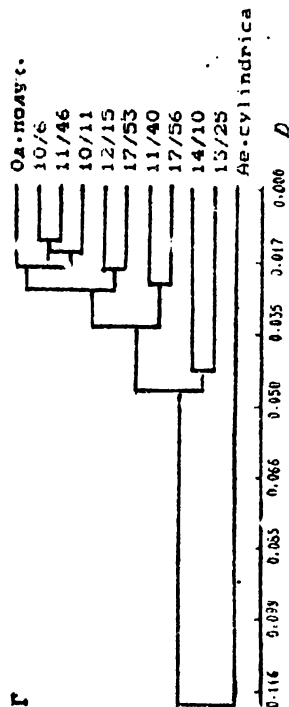
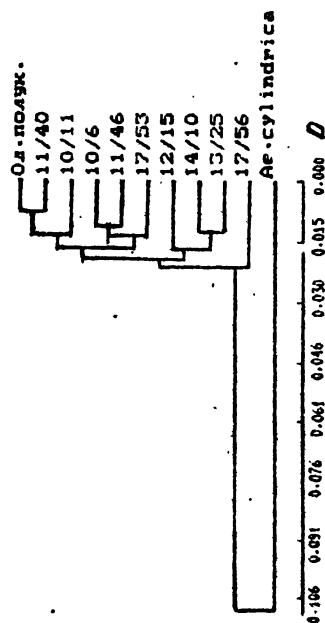
Згідно електрофоретичному аналізу гліадинів і глютенів генетичні дистанції варіювали від 0,037 до 0,11.

За даними RAPD-аналізу мінімальна генетична дистанція 0,01 відмічена між колекційними формами K-79 і K-78.

Максимальна генетична дистанція 0,08 відмічена між K-614 підвид *eusquarrosa* var. *anatera* і іншими досліджуваними формами.

Кластерний аналіз генетичних дистанцій форм гібридного походження, розрахованого за даними ПДРФ, електрофорезу запасних білків і RAPD-аналізу, показав: форми гібридного походження утворюють складний єдиний кластер з материнською формою Одеська напівкарликова (мал. 2). Батьківський вид *Ae. cylindrica* являє собою віддалену гілку. Описані вище дані про наявність в спектрі гібридизації фрагментів, характерних *Ae. cylindrica*, говорять про те, що відбулась інтрогресія генетичного матеріалу в м'яку пшеницю. Найбільш близькими до Одеської напівкарликової є лінії 17/53, 10/6, 10/11, 11/46, 12/15, 14/10. Лінія 13/25 має інтрогресію з генома жита і генетично найбільш віддалена від інших інтрогресивних форм.

Таким чином, можна зробити висновок, що згідно даних, сержаних трьома методами молекулярно-генетичного аналізу,



Мал. 2 Дендрограми кластерного розподілення батьківських форм і ліній птениці гібридного походження, що одержані в результаті кластерного аналізу генетичних дистанцій, розрахованих за даними: А). ЦДФ, Б). електрофореза гліадинів і глутенинів, В). RAPD - аналіза, Г). сумарна схема за даними ЦДФ, електрофореза запасних білків і RAPD-аналіза.

генотипи гібридних форм, отриманих внаслідок двох зворотніх схрещувань у п'ятому поколінні сформувалися близькими до вихідної материнської форми. Наслідки саузерн-блот гібридизації, RAPD-аналізу, електрофорезу запасних білків показують присутність в геномі інтрогресивних форм чужорідного генетичного матеріалу.

#### ВИСНОВКИ.

Систематичні дослідження генетичної мінливості форм пшениці віддаленого гібридного походження в порівнянні з між- та внутривидовою варіабільністю методами ПДРФ, електрофорезу запасних білків і ПЛР дали можливість зробити наступні висновки:

1. Генетична мінливість, викликана віддаленою гібридизацією *Triticum aestivum* × *Aegilops cylindrica*, детектована в різних ділянках геному: саузерн-блот гібридизацією в NOR-локусах, електрофорезом запасних білків у гліадин і глютенінкодуючих локусах, RAPD-методом у локусах, диспергованих по геному.

2. В результаті кластерного аналізу даних ПДРФ, ПЛР і спектра запасних білків форми гібридного походження розподілені у залежності від генетичних дистанцій по відношенню до початкового видів.

3. На основі даних ПДРФ, електрофореза запасних білків, RAPD-аналіза визначені генетичні дистанції та уточнені філогенетичні взаємовідносини між досліджуємими видами *Triticaceae*.

4. За допомогою молекулярних маркерів детектована інтрогресія генетичного матеріалу *Ae. cylindrica* до геному

культурної пшениці.

5. Порівняння мінливості, одержаної від індукованої віддаленою гібридизацією, з між- та внутривидовою варіабільністю показало, що вона перевищує внутривидову але нижче міжвидової.

6. Створена клонотека високоповторюваної ДНК *Ae. tauschii* (D). Ряд клонів може бути використаний для вивчення міжвидового поліморфізму та детекції інтрогресивних форм.

#### Список робіт, опублікованих по темі дисертації

1. Чеботарь С. В., Сиволап Ю. М. Исследование изменчивости генома *T. aestivum* и ее диких сородичей // Управление генетической изменчивостью сельскохозяйственных растений: Теж. докл. Междунар. симпозиум. - Ялта, 1992. - С. 114 - 115.

2. Сиволап Ю. М., Чеботарь С. В. Вариабельность рДНК у некоторых *Triticeae* и форм *Triticum aestivum*, полученных от отдаленной гибридации // Генетика. - 1993. - т. 29, N 12. - С. 2039-2050.

3. Чеботарь С. В., Сиволап Ю. М. Клонирование высокоповторяющейся ДНК *Aegilops tauschii* (DD) и анализ меж- и внутривидового полиморфизма алаков // Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений: Теж. докл. конференции 10 - 13 мая 1994г. - Киев, 1994. - С. 74.

4. Sivolap Yu. M., Chebotar S. V., Rybalka A. I. PCR, RFLP and storage protein polymorphism in *Triticeae* // International Symposium Plant Biotechnology and Genetic Engineering: Abstracts. - Kiev, 1994. - P. 35.

5. Sivolap Yu. M., Chebotar S. V., Rybalka A. I. Molecular

genetic analysis introgression of alien genome fragments into wheat *Triticum aestivum*// Plant Genome II. The Intern. Conf. on the Status of Research on the Plant Genome. January 24 - 27, 1994. - San Diego, 1994. - P.85.

6. Сиволоп Ю.М., Календарь Р.Н., Чеботарь С.В. Исследование генетического полиморфизма злаковых растений при помощи ПШР с произвольными примерами// Цитология и генетика. 1994. - N.6 - С.54 -61.

7. Sivolap Yu., Chebotar S., Rybalka A. Inter- and intra-species genetic polymorphism of Triticeae//Plant Genome III. The Intern. Conf. on the Status of Plant Genome Research. January 15-19, 1995. - San Diego, 1995 - P.77.

Chebotar S.V. Molecular-genetic analysis introgression of elements genome *aegilops* into wheat genome.

Dissertation for scientific degree of candidate of biological sciences on speciality 03.00.03.-Molecular biology. Plant Breeding and Genetics Institute UAAS. Odessa, 1995.

Dissertation contain theoretical and experimental material for using molecular-genetics methods: RFLP, PCR - analysis of DNA and storage proteins electrophoresis, for evaluation breeding forms from wide crossing and detalization of phylogenetics relation between 14 species of Triticeae.

Genetic changeability induced by wide hybridization *Triticum aestivum* x *Aegilops cylindrica* was detected in different parts of genome: by Southern-blot hybridization -1. NOR loci, by storage proteins electrophoresis - in gliadin and glutenin loci, by PCR -analysis - in loci, that

dispersed in genome.

According to cluster analysis the forms from wide crossing were ranged between initial parents in depending of genetic distances. Introgressions of some elements of genetic material from *aegilops* into wheat genome were detected.

Phylogenetic relationships between some *Triticeae* species that are agronomic characters donors have been detailed.

Чеботарь С. В. Молекулярно-генетический анализ интрогрессии элементов генома эгилопса в геном мягкой пшеницы.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 - молекулярная биология. Селекционно-генетический институт УААН, Одесса, 1995.

Защищается диссертация, которая содержит теоретический и экспериментальный материал по использованию молекулярно-генетических методов: ПДРФ, ПЦР-анализа ДНК и электрофореза запасных белков для оценки форм, полученных от отдаленной гибридизации и установления генетических взаимоотношений среди 14 видов трибы *Triticeae*.

Генетическая изменчивость, вызванная отдаленной гибридизацией *Triticum aestivum* x *Aegilops cylindrica*, детектирована в различных локусах генома: саузерн-блот гибридизацией в NOR-локусах, электрофорезом запасных белков в глиадин и глютеинин кодирующих локусах, ПЦР-анализом в локусах, диспергированных по геному.

В результате кластерного анализа данных исследований формы гибридного происхождения распределены в зависимости от генетических дистанции по отношению к исходным видам. При помощи молекулярных маркеров детектирована интрогрессия генетического материала эгилопса в геном мягкой пшеницы. Уточнены филогенетические взаимоотношения у ряда видов *Triticeae*, доноров ценных агрономических признаков.

**Ключові слова:**

Інтрогресія, генетичний поліморфізм, між- і внутривидова мінливість, молекулярно-генетичні маркери.

с.в. Чеб

Полп.к печати 23.03.75г.Формат 60х84 1/16.  
Об"ем 1,5п.л.0,9уч.изд.л.Заказ № 306/3.Тираж 100экз.  
Гортипография Одесского управления по печати,цех№3.  
Цена 49.