

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

Національний Університет «Києво-Могилянська Академія»,

Україна, 04655, м. Київ, вул. Сковороди, 2, e-mail: a.navalihina@gmail.com

[✉]a.navalihina@gmail.com

МІНЛИВІСТЬ СПЕКТРІВ CDDP МАРКЕРІВ МУС ТА МУВ У ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ

Забарвлення вегетативних та генеративних органів у злакових рослин забезпечується антоціанінами – водорозчинними пігментами, що можуть давати червоний, фіолетовий, синій або помаранчевий колір [1, 2]. Гени, які контролюють розвиток забарвлення різних органів рослини, є транскрипційними факторами, що регулюють експресію структурних генів біосинтезу антоціанінів. Регуляція експресії генів біосинтезу антоціанінів у всіх видів рослин є консервативною, її здійснює комплекс MBW, який складається із транскрипційних факторів класів МУВ та bHLH і каркасного білка WD40 [3]. У пшениці гени, які контролюють забарвлення перикарпа (ген *R*) та колеоптіле (ген *Rc*), є транскрипційними факторами із родини МУВ [1, 4]. Також припускають, що гени, відповідальні за забарвлення інших частин рослини – листка (*P1b-1*), листової піхви (*P1s-1*), стебла (*Pc-1*), колеоптіле (*Rc-1*), перикарпу (*Pp-1*), лігули (*Ra-1*) та пиляків (*Pan-1*) – кодують R2R3-МУВ транскрипційні фактори, а ген, що відповідає за забарвлення перикарпу *Pp3*, – bHLH (МУС) транскрипційний фактор [5]. Гени, які регулюють забарвлення луски (*Bg* та *Rg*), також є транскрипційними факторами, які регулюють експресію структурних генів біосинтезу антоціанінів, утім їхня молекулярна природа досі є невідомою [6].

Опушення луски у пшениці зумовлюється наявністю на ній трихом. Трихоми є видовженими епідермальними клітинами, їхню диференціацію регулюють комплекси транскрипційних факторів MBW. У *Arabidopsis thaliana* утворення трихом контролює MBW комплекс, що складається із транскрипційних факторів GL1 (МУВ), GL3/EGL3 (МУС) та WD40 каркасного білка TTG1. Комплекс активує експресію генів *GL2* (HD-ZIP транскрипційний фактор) та *TRY*. Продукт першого гена стимулює утворення трихоми, в той час як продукт другого є R3-МУВ транскрипційним фактором, який мігрує у сусідні клітини, де зв'язується із

(GL3/EGL3)/TTG1 і утворює репресорний неактивний комплекс, що не дозволяє сусіднім клітинам ставати трихомами. Крім *TRY*, є й інші R3-МУВ транскрипційні фактори, які негативно регулюють розвиток трихом у різних частинах рослини. Так, *TRY* експресується у листках, *CPC* – у коренях, *TCL1* – у суцвітті [7–9]. Регуляція розвитку трихом, імовірно, також є консервативною, оскільки в інших видів рослин (томата, рису та бавовнику) було знайдено транскрипційні фактори родини МУВ, задіяні у цьому процесі [10–13]. У пшениці ген *Hg1* (hairy glume), що контролює наявність трихом на лусці, локалізований на хромосомі 1AS і є зчепленим із геном, що регулює забарвлення луски *Bg* [14]. Оскільки гени транскрипційних факторів МУВ та МУС, задіяних в регуляції розвитку трихом та забарвлення, у геномах рослин розташовані кластерами, то, імовірно, що гени *Hg1* та *Bg* кодують транскрипційні фактори, які належать до родини МУВ або МУС [15, 16].

Деякі інтрогресивні лінії пшениці мають темне забарвлення зрілого кольору та опушену луску. Оскільки батьківські форми інтрогресивних ліній мають світлий неопушений колос, то причиною появи контрастних ознак у інтрогресивних ліній-похідних можуть бути перебудови у генах, що регулюють біосинтез антоціанінів та розвиток трихом. Імовірно, що ці гени кодують транскрипційні фактори родин МУВ та МУС.

Матеріали і методи

У роботі було використано такий рослинний матеріал: озима м'яка пшениця *T. aestivum* (2n=6x=42, AABBDD) сорт Аврора, геномно-заміщені амфідиплоїди Аврозис (2n=6x=42, AABB^{sh}S^{sh}), Аврлата (2n=6x=42, AABB^{sh}UU), Авротіка (2n=6x=42, AABBTT), у яких об'єднані тетраплоїдний компонент м'якої пшениці (AABB) та геноми диплоїдних видів егілопсів (відповідно, *Ae. sharonensis*, *Ae. umbellulata* та *Ae. mutica*) [20]. Інтрогресивні лінії отримані

від схрещувань Аврозису та Аврори: res 133-1 res 122-2, Авролати та Аврори: res 191, res 193, res 201 та F04 1352 lata, Авротіки та Аврори: Tіса 32.5/7, Tіса 44.4/3, Tіса 8.2/1, Tіса 40.2/1, Tіса 30.2/7, Tіса 42.4/8 та Tіса 14.4/1.

Лінії Аврозису та Авролати відрізняються від батьківських форм наявністю опушення луски та темним забарвленням зрілого колоса. Аврора має світлий колос, амфідиплоїди Аврозис та Авролата – світло-кавовий, луска у них неопушена. Лінії-похідні мають різні градації темного забарвлення колоса від кавового до чорного, луска є опушеною (табл. 1).

Із семи досліджених ліній-похідних Авротіки п'ять розщеплюються за ознаками колір та опушення луски. Відповідно до розщеплення, ці лінії було розділено на сублінії, яким було при-

своєно код. Оцінка ознак морфології колоса у наступному поколінні субліній показала, що розщеплення за ознаками колір та опушення продовжується, сублінії не є стабільними (табл. 2). Так, деякі темні опушені сублінії Авротіки продовжують вищеплювати світлі неопушені рослини (Tіса 8.2/1 (H34), Tіса 30.2/7 (H31, H32), Tіса 14.4/1 (H30)), а світлі неопушені сублінії – темні та опушені рослини (Tіса 14.4/1 (H9, H28)). Всі рослини сублінії Tіса 40.2/1 (H33) у наступному поколінні із темних стали світлими.

У роботі досліджували також лінії, що мали світлий колір колоса та не мали опушення, – Tіса 32.5/7 та Tіса 44.4/3. За участю цих ліній було створено F2, де спостерігали розщеплення за кольором – появу світло-кавових рослин.

Таблиця 1. Ознаки морфології колоса Аврори, Аврозису, Авролати та їхніх ліній-похідних

	Ознаки морфології колоса	
	Колір зрілого колоса	Опушення луски
Аврора	солом'яний	-
Аврозис	світло-кавовий	-
Авролата	світло-кавовий	-
Res 133-1	чорний	+
Res 122-2	чорний	+
Res 201	кавовий	+
Res 191	світло-кавовий	+
Res 193	кавовий	+
F04 1352 lata	світло-кавовий	+

Таблиця 2. Лінії-похідні Авротіки, що розщеплюються за ознаками морфології колоса

Назва лінії	Код сублінії	Ознаки морфології колоса	
		Колір зрілого колоса	Опушення луски*
Tіса 8.2/1	H27	світлий	1
	H34	світлий, світло-кавовий, чорний	1, 4, 5
Tіса 40.2/1	H26	світлий	1
	H33	світлий	5
Tіса 30.2/7	H25	світлий	1
	H31	світлий, кавовий, чорний	1, 4
	H32	світлий, кавовий	1, 2, 7
Tіса 42.4/8	H20	світлий	1
	H29	чорний	1
Tіса 14.4/1	H9	світлий, світло-кавовий	1, 2
	H30	кавовий	1, 2
	H7	світлий	1
	H28	світло-кавовий, чорний	2

Примітки: *градації опушення луски: 1 – опушення немає, 2 – суцільне густе опушення, 4 – суцільне рідке опушення, 5 – рідке опушення зі щічкою, 7 – щетинчасте опушення зі щічкою.

Геномну ДНК виділяли методом із використанням ЦТАБ [17]. Мінливість генів родин MYB та MYC досліджували за допомогою методу маркерів CDDP (Conserved Domain DNA Polymorphism) [18]. Використовували праймери, комплементарні консервативним регіонам генів *T. aestivum* MYB (*TaC1*, GenBank AB983542) та MYC (*Myc1*, GenBank KJ747954). Консервативні ділянки цих генів шукали у базі даних NCBI CDD [19]. Праймери створювали за допомогою сервісу PrimerBLAST [21]. Послідовність праймера до консервативного регіону генів родини MYB: ATGTTGCCCGCTTGATGTT. Послідовність праймера до консервативного регіону генів родини MYC: AGGGTTCTGACGTGGAAGGA. Продукти ампліфікації розділяли у 1,5 % агарозному гелі на натрій боратному буфері. Візуалізацію продуктів проводили за допомогою бромистого етидію [17]

Результати та обговорення

У спектрах MYC CDDP інтрогресивних ліній-похідних Аврозису *res* 133-1 та *res* 122-2 з'являється новий мажорний компонент 12a, властивий усім рослинам цих ліній (рис. 1 а). У цих же ліній у спектрах MYB CDDP є новий мінорний компонент 11b (рис. 1 б). Лінії *res* 133-1 та *res* 122-2 мають ознаки не властиві батьків-

ським формам, – чорне забарвлення колоса та наявність опушення на лусках (табл. 2). Можна припустити, що перебудови у генах транскрипційних факторів MYC та MYB, що спричинили появу нових компонентів у спектрах, пов'язані із наявністю цих ознак.

У лінії Тіса 32.5/7 важка фракція спектра MYC CDDP має компоненти 0a, 0c, 0d та 0ba, яких немає у спектрах батьківських форм. Крім того, у цієї лінії було помічено появу нового компонента 6z, не властивого Аврорі та Авротіці (рис. 2). Лінія не відрізняється від батьківських форм за ознаками опушення та колір колосу, проте у F2 від схрещування Тіса 32.5/7 та Тіса 44.4/3 з'являються рослини із світлокавовим кольором колосу. Таким чином, поява нових компонентів у спектрі Тіса 32.5/7 може свідчити про перебудови у генах MYC, які призвели до зміни кольору колосу у F2.

Крім описаного триплету у деяких ліній, що мають розщеплення за фенотипом, у важкій фракції спектра були наявні компоненти 0-0d (рис. 3). Компоненти цієї фракції траплялися раніше у деяких ліній-похідних Аврозису, Авролати та Авротіки, проте, у них вони були мінорними. Із досліджених субліній компонентів цієї фракції спектра не мають Тіса 30.2/7 (H25, H31), Тіса 40.2/1 (H33), Тіса 42.4/8 (H20, H29) та Тіса 14.4/1 (H7, H28).

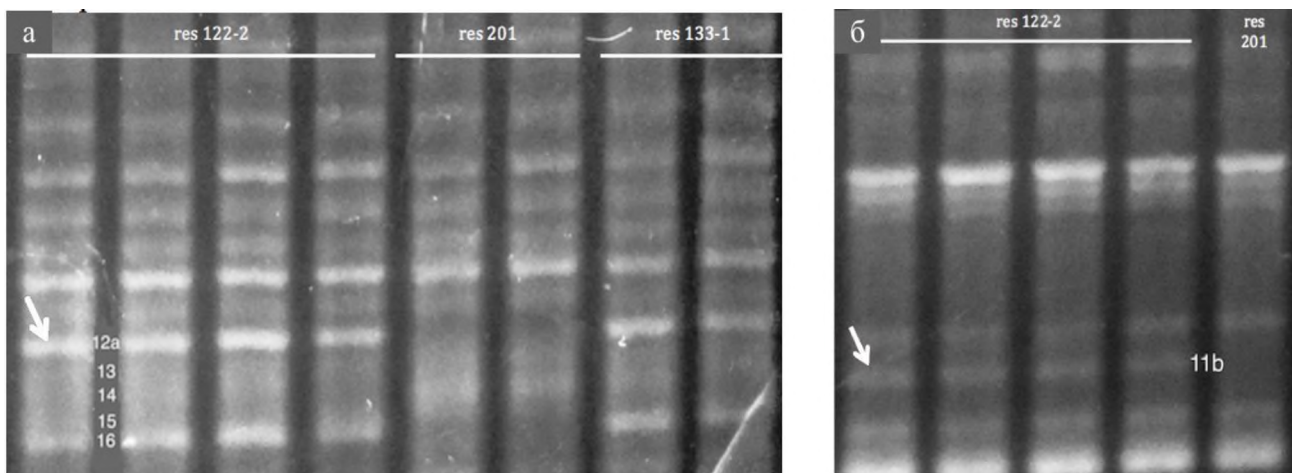


Рис. 1 а) поява нового компоненту 12a у спектрі MYC CDDP у ліній-похідних Аврозису *res* 133-1 та *res* 122-2; б) поява нового компоненту 11b у спектрі MYB CDDP у ліній-похідній Аврозису *res* 122-2. Стрілками вказано нові компоненти.

До компонентів важкої фракції у спектрі MYC CDDP належать також амплікони 2, 3 та 3a. Із цих ампліконів компонент 3a є новим, він наявний у всіх ліній, що розщеплюються за ознаками морфології колоса, крім Тіса 42.4/8 (H20). Наявність триплету мажорних компонентів 0e-1-1a майже завжди пов'язана із наявністю

триплету компонентів 2-3-3a. Описаний секстет компонентів наявний у субліній Тіса 30.2/7 (H32), Тіса 40.2/1 (H26, H33), Тіса 14.4/1 (H7, H28, H30), Тіса 42.4/8 (H29). Сублінія Тіса 30.2/7 (H32), крім цих трьох компонентів, має також амплікон 3b, який не зтрапляється у інших ліній.

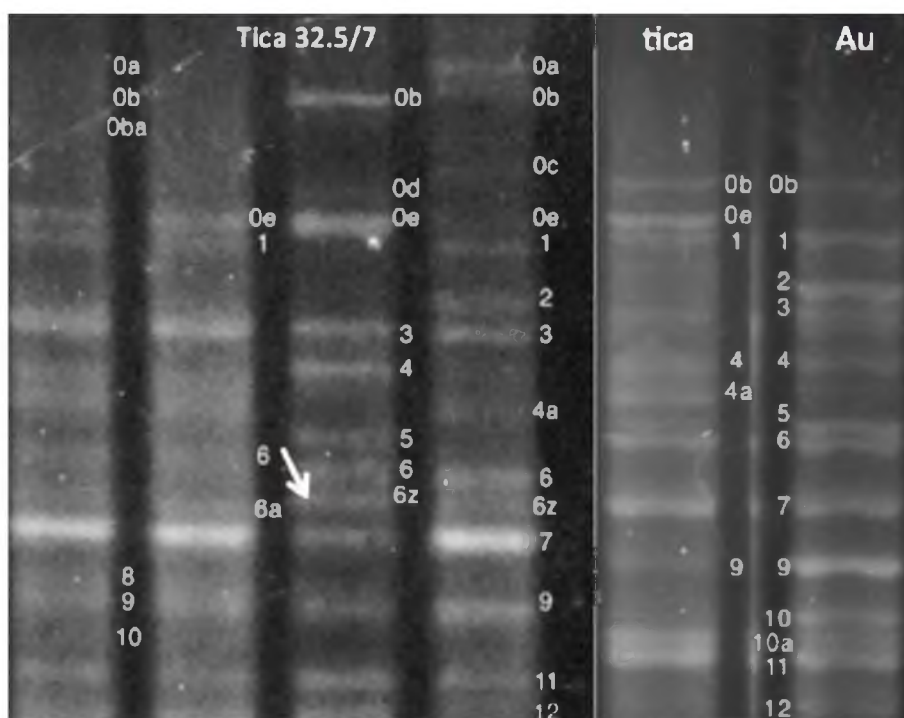


Рис. 2. Спектр MYC CDDP Аврори, Авротіки та чотирьох рослин лінії Тіса 32.5/7. Стрілкою помічено новий компонент 6z. Компоненти важкої фракції мають нумерацію 0a-0e.

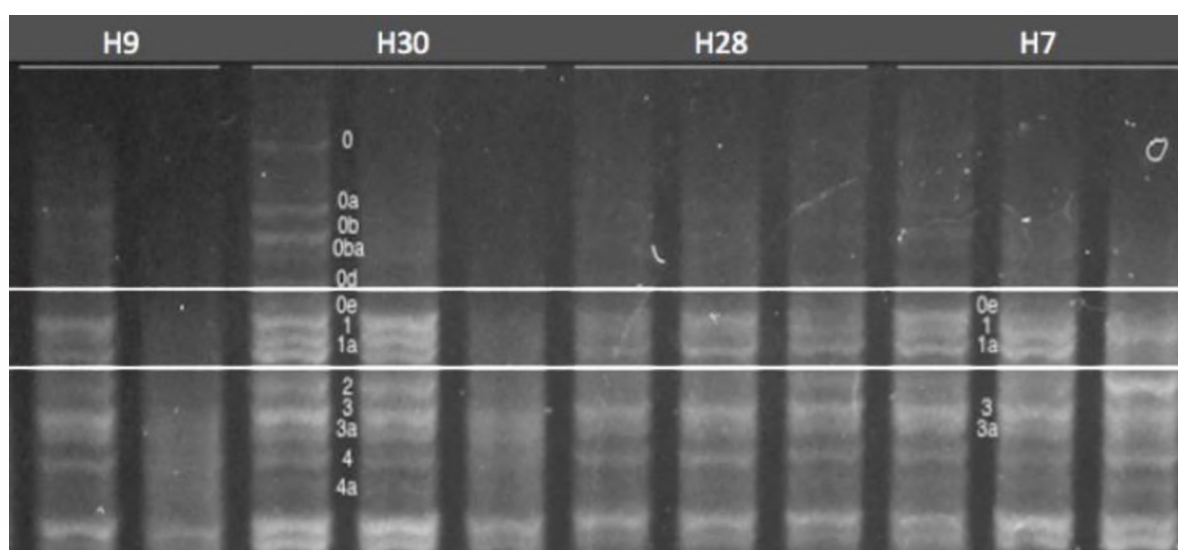


Рис. 3. Зміни у спектрах MYC CDDP у чотирьох субліній лінії Тіса 14.4/1. Мажорний триплет компонентів 0e-1-1a виділено прямокутником.

В одній рослині сублінії Тіса 14.4/1 (Н7) наявний новий мажорний компонент 14z і відсутній батьківський компонент 14. Можливо, компонент 14z з'явився в результаті делеції певної послідовності між консервативними регіонами генів MYC, що призвело до зменшення молекулярної маси амплікону 14 та появи компонента 14z.

У спектрах MYB CDDP ліній-похідних Авротіки, що розщеплюються за ознаками колір колоса та опушення луски, не було виявлено компонентів, не властивих батьківським формам.

Висновки

Знайдені нові компоненти у спектрах MYB та MYC CDDP інтрогресивних ліній пшениці важко пов'язати зі зміною забарвлення колосу та опушення луски порівняно із батьківськими формами. Це пов'язано із відсутністю компонентів, характерних лише для ліній, що мають темне забарвлення колоса та опушену луску, переважною мінорністю нових компонентів, а також низькою відтворюваністю результатів.

Література

- Himi E., Nisar A., Noda K. Colour genes (*R* and *Rc*) for grain and coleoptile upregulate flavonoid biosynthesis genes in wheat // *Genome*. – 2005. – V. 4. – P. 747–754.
- Khlestkina E.K., Röder M.S., Börner A. Mapping genes controlling anthocyanin pigmentation on the glume and pericarp in tetraploid wheat (*Triticum durum* L.) // *Euphytica*. – 2009. – V. 1. – P. 65–69.
- Albert N.W., Davies K.M., Lewis D.H. A conserved network of transcriptional activators and repressors regulates anthocyanin pigmentation in eudicots // *Plant Cell*. – 2014. – V. 3. – P. 962–980.
- Himi E., Noda K. Red grain colour gene (*R*) of wheat is a Myb-type transcription factor // *Euphytica*. – 2005. – V. 3. – P. 239–242.
- Khlestkina E.K., Shoeva O.Y., Gordeeva E.I. Flavonoid biosynthesis genes in wheat // *Russ. J. Genet. Appl. Res.* – 2015. – V. 3. – P. 268–278.
- Хлесткина Е.К. Гены, детерминирующие окраску различных органов пшеницы // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2012. – № 1. – P. 202–216.
- Ishida T., Kurata T., Okada K. A Genetic Regulatory Network in the Development of Trichomes and Root Hairs // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2008. – V. 1. – P. 365–386.
- Szymanski D.B., Lloyd A.M., Marks M.D. Progress in the molecular genetic analysis of trichome initiation and morphogenesis in *Arabidopsis* // *Trends in Plant Science*. – 2000. – V. 5. – P. 214–219.
- Zhao M. Regulation of *Arabidopsis* Trichome Patterning and Anthocyanin Biosynthesis by the TTG1-bHLH-MYB Complex: dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy. – 2007. – 99 p.
- Guan X. miR828 and miR858 regulate homoeologous MYB2 gene functions in *Arabidopsis* trichome and cotton fibre development // *Nat. Commun.* – 2014. – V. 5. – P. 3050.
- Tominaga-Wada R., Nukumizu Y., Sato S. Control of Plant Trichome and Root-Hair Development by a Tomato (*Solanum lycopersicum*) R3 MYB Transcription Factor // *PLOS ONE*. – 2013. – V. 8. – P. 1–12.
- Zheng K. Ectopic expression of R3-MYB transcription factor gene *OsTCL1* in *Arabidopsis*, but not rice, affects trichome and root hair formation // *Scientific Reports* – 2016. – V. 6. – P. 1–12.
- Xiao K., Mao X., Lin Y. Trichome, a Functional Diversity Phenotype in Plant // *Molecular Biology*. – 2017. – V. 6. – P. 1–6.
- McIntosh R., Yamazaki Y. Catalogue of gene symbols for wheat // *Int. Wheat Genet. Symp.* – 2008. – P. 1–197.
- Li X., Duan X., Jiang H. Genome-Wide Analysis of Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family in Rice and *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 141. – P. 1167–1184.
- Heim M.A., Jakoby M., Werber M. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity // *Mol. Biol. Evol.* – 2003. – V. 5. – P. 735–747.
- Sambrook J., Russell D.W. *Molecular Cloning* // New York. – 2001. – 2231 p.
- Collard B.C.Y., Mackill D.J. Conserved DNA-derived polymorphism (CDDP): A simple and novel method for generating DNA markers in plants // *Plant Mol. Biol. Report.* – 2009. – V. 4. – P. 558–562.
- Marchler-Bauer A., Derbyshire M.K., Gonzales N.R. CDD: NCBI's conserved domain database // *Nucleic Acid Res.* – 2015. – V. 43. – P. 222–226.
- Жиров Е.Г., Терновская Т.К. Геномная инженерия у пшеницы // *Вестник с.-х. науки*. – 1984. – № 10. – С. 58–66.
- Primer-BLAST [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

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

National University of Kyiv-Mohyla Academy,

Ukraine, 04655, Kyiv, Skovorody str., 2, e-mail: a.navalihina@gmail.com

CDDP MARKERS MYB AND MYC SPECTRA VARIABILITY IN INTROGRESSIVE WHEAT LINES

Aim. Genes that control the development of glume hairiness and color in wheat (*Hg* and *Rg*) were identified decades ago. However, molecular genetics of these traits development is still unknown. Conservative regulatory pathway for color and hairiness development in plants involve transcription factors that belong to MYB and MYC families. Presumably, wheat color and hairiness genes encode these transcription factors. Emergence of dark-colored hairy plants in introgressive wheat lines derived from light-colored glabrous parents may result from the rearrangements in the genes that encode MYB or MYC transcription factors. **Methods.** Rearrangements in MYB and MYC genes were identified by CDDP markers. **Results.** New components were identified mainly in MYC CDDP spectra of introgressive lines – derivatives of Aurosis and Aurotica. Only one new component was identified in MYB CDDP spectra of two Aurosis lines. However, it was noticed that none of new components are associated with nonparental phenotype. Besides, CDDP markers have low reproducibility, and so, new components may result from nonspecific amplification. **Conclusion.** New components in the CDDP markers spectra MYB and MYC may not be associated with rearrangements in corresponding genes due to their minority and low method reproducibility.

Keywords: glume color, glume hairiness, introgressive lines, wheat.