УДК 631.523:581.13

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНІВ, ОРТОЛОГІЧНИХ РЕГУЛЯТОРАМ РОЗВИТКУ ОСТЕЙ *ORYZA SATIVA*, У ПРЕДСТАВНИКІВ TRITICINAE

А.Г. НАВАЛІХІНА, М.З. АНТОНЮК, Т.В. ПАСІЧНИК, Т.К. ТЕРНОВСЬКА

Національний університет «Києво-Могилянська академія», вул. Сковороди, 2, Київ

E-mail: a.navalihina@gmail.com, antonyuk.m@ukma.edu.ua, t.pasichnyk@ukma.edu.ua, ternovska@ukma.edu.ua

Інформація про генетичний контроль розвитку остей на колосі пшениці м'якої на сьогодні обмежена ідентифікацією трьох генів – інгібіторів розвитку остей – Hd, B1 та B2, а генів-промоторів остистості досі не знайдено. На іншому злаку, Oryza sativa, встановлено наявність десятка генів, що беруть участь у морфогенезі остей. У статті наведено результати аналізу сиквенсу пшеничного геному для пошуку генів, ортологічних відомим регуляторам розвитку остей у рису – TOB1, ETT2 і DL. За допомогою біоінформатичних методів у геномі пшениці м'якої ідентифіковані гени TaTOB1, TaETT2 і TaDL, встановлено їхню хромосомну локалізацію у геномі пшениці, це, відповідно, хромосоми 2-ої, 3-ої та 4-ої груп всіх трьох субгеномів. Описано поліморфізми гомеоалелів вказаних генів за довжинами екзонів і інтронів у субгеномах A, B та D пшениці м'якої. Поліморфізм включає варіювання за довжиною екзонів та інтронів у всіх трьох генах, варіювання за кількістю екзонів та інтронів для гена TaETT2 та інверсію гомеоалеля TaDL-B у порівнянні з двома іншими та гомеоалелів TaETT2-B та TaETT2-D у порівнянні з TaETT2-A. Із використанням ПЛР з праймерами, створеними за послідовністю гена TaTOB1, гомеоалелі цього гена ідентифіковано в геномах A^u, A^b, B, G, D, S^{Sh}, M, U, T у диплоїдних, тетраплоїдних та гексаплоїдних видів пшеницевих. Показано маркерний потенціал двох пар праймерів до гена TaTOB1 щодо вивчення геномної структури інтрогресивних ліній пшениці стосовно цього гена.

Ключові слова: *пшениця м'яка, ості, гени морфогенезу остей, види егілопсів, аналіз сиквенсу генома пшениці*

Вступ. Наявність остей, стрільчастих видовжень на зовнішній квітковій лусці злакових рослин, є морфологічною ознакою, яка серед кількох інших використовується для диференціації різновидів пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.): серед 14-ти різновидів шість мають безостий колос, вісім – остистий [1]. У пшениці твердої (*T. durum* Desf.) природного поліморфізму за остистістю немає, всі дев'ять її різновидів мають остистий колос. Сучасні сорти пшениці твердої без добре розвинених остей, мають у родоводі пшеницю м'яку, від якої і отримали гени-інгібітори розвитку остей. Генетичний контроль остистості у пшениці вивчається давно [2] і не в останню чергу через явний маркерний потенціал цієї ознаки, перш за все при роботі з інтрогресивними генотипами пшениці [3, 4]. Досі наявність остей у пшениці м'якої пов'язують з відсутністю у генотипі хоча б двох з трьох відомих домінантних інгібіторів остистості – *Hd* (4AS), *B1* (5AL) та *B2* (6BL) [5–7]. Ості є структурами детермінованими, вважаються видозміненими листками, отже в контролі їхнього розвитку серед інших мають брати участь гомеотичні гени. Утворюються ості за рахунок поділу клітин у площині, перпендикулярній до напрямку апікально-базальної осі [8]. Поліморфізм за ознакою виявляється від повної їхньої відсутності до розвитку повноцінних остей. Немає сумніву, що в контролі цієї ознаки беруть участь чимало генів, серед яких обов'язково мають бути промотори поділів клітин, активність яких призводить до утворення стрільчастих подовжень. У рису посівного, відомо близько десяти локусів кількісних ознак, залучених до формування ості [9]. Серед ідентифікованих

© А.Г. НАВАЛІХІНА, М.З. АНТОНЮК, Т.В. ПАСІЧНИК, Т.К. ТЕРНОВСЬКА, 2019

генів більшість кодують транскрипційні фактори і тому мають плейотропну дію: ген *An-1* кодує транскрипційний фактор із родини bHLH, гени *DL* та *TOB1* – транскрипційні фактори із родини YABBY, а ген *OsETT2* – транскрипційний фактор із родини ARF [9–11]. Інші гени рису, що впливають на морфогенез остей, – *SHL2*, *SHO1*, *SHO2* та *WAF1* – кодують ферменти шляху біосинтезу малих інтерферуючих РНК транс-дії, отже також мають регуляторну функцію [12–15]. Імовірно, що всі відомі гени рису складають мережу, яка регулює розвиток ості, проте про молекулярні механізми дії та взаємодії їхніх продуктів в межах такої мережі відомостей поки немає. Встановлено лише, що між *DL* та *OsETT2* існує взаємодія за типом активації (оскільки мутанти *dl* не експресують *OsETT2*), а малі РНК транс-дії, синтезовані за участю згаданих генів *SHL2*, *SHO1*, *SHO2* та *WAF1*, пригнічують експресію *OsETT2* [9, 15]. Щодо пшениць, гени-промотори розвитку остей не входять до сучасного каталогу генів [5]. Справді, з геном *Hd* пов'язують розвиток остеподібних відростків [6], показано, що у диплоїдних та тетраплоїдних пшениць остистість може домінувати над безостістю [16], ген – промотор остистості локалізований на хромосомі 6B пшениці твердої [17] та хромосомах 6U та $6S^{sh}$ *Aegilops umbellulata* L. *Ae. sharonensis* Eig., відповідно [3, 4].

Відомо, що молекулярні механізми регуляції процесів онтогенезу гомологічних органів, зокрема листків, у споріднених груп рослин є консервативними [18, 19]. Оскільки ості є гомеотичною трансформацію листків [10], цілком природно припустити, що і розвиток остей у пшеницевих та у рису регулюється подібними мережами, тобто пшеницеві мають гени, ортологічні генам, які регулюють розвиток остей у рису. Тому інформацію про ідентифіковані для рису гени, що беруть участь в розвитку остей, можна використати для пошуку *in silico* у сиквенсах геномів пшениці м'якої послідовностей, гомеологічних послідовностям генів рису, ідентифікованих як такі, що беруть участь у розвитку остей. У статті наведено результати дослідження, метою якого був пошук у геномі пшениці *in silico* генів пшениці м'якої *TaDL*, *TaTOB1* та *TaETT2*, ортологічних відповідним регуляторам розвитку остей у рису. Для гена *TaTOB1* отриману інформацію було верифіковано через порівняльне вивчення спектрів ампліфікації ДНК генотипів пшеницевих, різних за геномним складом, отриманих з праймерами, розробленими за нуклеотидними послідовностями, знайденими у геномному сиквенсі пшениці м'якої.

Матеріали та методи. Біоінформатичний пошук ортологічних послідовностей у геномі пшениці м'якої здійснювали через використання інструменту BLAST у базах даних GenBank та Plant Transcription Factor Database [20, 21]. Пошук здійснювали із використанням послідовностей генів рису *DL* (AB106553), *TOB1* (AK070205) та *OsETT2* (AB071291). Відповідні кодуючі послідовності для двох ортологів *TaDL* (AB470269) та *TaETT2* (AY376129) було знайдено у GenBank, а *TaTOB1* (Traes_2BL_8BEA9CE1B) – у Plant Transcription Factor Database.

Для встановлення хромосомної локалізації генів кодуючі послідовності знайдених пшеничних генів піддавали пошуку у сиквенсі геному пшениці м'якої на ресурсі проекту «Секвенування геному *Aegilops tauschii*» [22]. Аналіз екзонно-інтронної структури послідовностей генів здійснювали через зіставлення нуклеотидних позицій сиквенсу геному, до яких вирівнювалися відомі кодуючі послідовності. Довжину екзонів визначали через розміри вирівняних фрагментів кДНК, а довжину інтронів – як різницю між позицією нуклеотиду, що є стартом наступного екзона, і позицією нуклеотиду, який є кінцем попереднього екзона у сиквенсі геному.

Спираючись на знайдену у сиквенсі структуру гена, праймери до гена *TaTOB1* створювали з використанням сервісу Primer-BLAST [23] таким чином, аби кожен праймер із пари був розташований в різних екзонах і ампліфіковані ділянки включали один або декілька інтронів. Чотири створених пари праймерів було названо за назвою гена та порядковими номерами TaTOB1-1, TaTOB1-2, TaTOB1-3 і TaTOB1-4. Послідовності праймерів надаються за запитом.

Для ідентифікації наявності гена *TaTOB1* у геномі пшеницевих методом ПЛР для виділення ДНК було використано такий рослинний

матеріал: генотипи пшениці м'якої ($2n = 6x = 42$, A^uA^uBBDD) сортів 'Тіра', 'Ніконія', 'Одеська 267', 'Ювілейна' (остисті), 'Аврора', 'Либідь' (безості); генотипи пшениці твердої ($2n = 4x = 28$, A^uA^uBB) сортів 'Черномор', 'Леукурум' (остисті), 'Кандіканс', 'Рубрум' (остеподібні відростки); види *Aegilops* ($2n = 2x = 14$) – *Ae. mutica* (TT, безостий), *Ae. sharonensis* ($S^{Sh}S^{Sh}$ з остеподібними відростками), *Ae. comosa* (MM, остистий), *Ae. umbellulata* (UU, остистий), а також гексаплоїдний синтетичний вид *T. migushovae* ($2n = 6x = 42$, A^bA^bGGDD, остиста) [24]. Геномну ДНК виділяли із паростків рослин методом із використанням ЦТАБ [25]. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за методом touchdown із використанням температур гібридизації праймерів від 60 °C зі спаданням на 0,5 °C кожен цикл до 55 °C протягом 10 циклів [26]. Склад реакційної суміші: ДНК 50 нг, дНТФ (Thermo Scientific, USA) 0,2 мМ кожного, $MgCl_2$ 1,5 мМ, праймери 250 нМ кожного, Taq ДНК полімераза (Solis Biodyne, Estonia) 1 U. Продукти ампліфікації розділяли у 1,5%-ному агарозному гелі на SB буфері та у 6%-ному денатуруючому ПААГ із 6М сечовини [25].

Результати та обговорення. *Біоінформатична ідентифікація пшеницевих генів, ортологічних регуляторам розвитку остей TOB1, DL та OsETT2 у рису.* Для трьох відомих генів-регуляторів розвитку остей рису *TOB1*, *DL* та *OsETT2* у сиквенсі геному пшениці м'якої було знайдено ортологи *TaTOB1*, *TaDL* та *TaETT2*, для кожного з яких на трьох субгеномах було локалізовано гомеоалелі.

Ген *TaTOB1* було знайдено на 2 хромосомі у всіх трьох субгеномах пшениці м'якої. В структурі гену наявні 6 екзонів і 5 інтронів, деякі є поліморфними за довжиною у гомеоалелів (таблиця). Поліморфізм довжин було знайдено для екзонів 1, 2 та 5, і всіх інтронів. Різниця у довжині екзонів не перевищувала 5 п.о., а для інтронів відмінності були більш масштабними – перший та третій інтрони гена *TaTOB1-B* є більшими на 20 п.о., ніж у двох гомеологів, а останній, п'ятий, інтрон *TaTOB1-D* є коротшим на 25 п.о., ніж у гомеологів.

Ген *TaDL* пшениці м'якої був локалізований у трьох субгеномах на 4 хромосомі і має в своїй структурі 6 екзонів та 5 інтронів (таблиця). Послідовність гена, розташованого в субгеномі B, є інвертованою відносно генів, розташованих в інших субгеномах. Однонуклеотидні поліморфізми довжин між гомеоалелями було знайдено у екзоні 6, а також у інтронах 1 та 4. Інтрон 2 у гені *TaDL-B* є більшим на 38 п.о., ніж у інших гомеоалелів.

Між гомеоалелями гена *TaETT2*, локалізованого на 3 хромосомі, виявили відмінності в кількості інтронів та екзонів (таблиця). Зокрема, гомеоалель *TaETT2-A* мав два екзони та два інтрони на початку послідовності, яких не було знайдено у гомеоалелів субгеномів B та D. Відповідно, *TaETT2-A* складався із 11 екзонів та 10 інтронів, а два інші гомеоалелі – із 9 екзонів та 8 інтронів. Такий поліморфізм може бути пов'язаний із тим, що функціональним є лише гомеоалель *TaETT2-A*, а інші два є псевдогенами із делетованими частинами. На користь цього припущення свідчить також інвертованість послідовностей *TaETT2-B* і *TaETT2-D* щодо напрямку *TaETT2-A* і наявність у восьмому інтроні *TaETT2-D* вставки розміром 3,3 тисяч п.о. (таблиця). Відомо, що вставки такого розміру зазвичай зумовлені інсерціями ретроелементів, і часто призводять до зміни функціональної активності гена [27].

Ідентифікація наявності гена TaTOB1 у геномі пшеницевих методом ПЛР. Для ампліфікації фрагментів гена *TaTOB1* із геномної ДНК пшеницевих було створено чотири пари праймерів. У кожної із пар лівий і правий праймери були локалізовані в сусідніх екзонах, таким чином в ПЛР ампліфікувався весь інтрон і частина кодуючої послідовності (рис. 1). Для пари праймерів TaTOB1-1 лівий та правий праймери знаходилися в екзонах 1 та 2, між ними інтрон 1. Для другої пари лівий і правий праймери знаходилися в екзонах 2 і 4 і були розмежовані двома інтронами і третім екзоном. Для пари праймерів TaTOB1-3 лівий та правий праймери знаходилися в екзонах 4 та 5, між ними інтрон 4. Для пари праймерів TaTOB1-4 лівий та правий праймери знаходилися в екзонах 5 та 6, між ними інтрон 5.

Очікувані на підставі аналізу геномного сиквенсу пшениці м'якої довжини ампліконів складали із першою парою 467 п.о., 496 п.о. та 467 п.о., із другою – 1221 п.о., 1237 п.о. та 1224 п.о., із третьою – 226 п.о., 234 п.о. та 247 п.о., із чет-

Структура генів *TaTOB1*, *TaDL* та *TaETT2*

Елемент структури	№ елемента	Гомеоалелі		
		2A	2B	2D
		TaTOB1		
Екзон, п.о.	1	−139	−139	−142
	2	−181	−186	−181
	3	−190	−190	−190
	4	−75	−75	−75
	5	−81	−81	−88
	6	−103	−102	−102
Інтрон, п.о.	1	−92	−112	−89
	2	−95	−90	−100
	3	−704	−720	−702
	4	−113	−119	−119
	5	−127	−125	−89
		4A	4B	4D
		TaDL		
Екзон, п.о.	1	79	−79	79
	2	148	−148	148
	3	95	−95	95
	4	77	−77	77
	5	86	−86	86
	6	73	−72	73
Інтрон, п.о.	1	582	−581	582
	2	721	−759	721
	3	1801	−1801	1801
	4	120	−119	120
	5	97	−97	97
		3A	3B	3D
		TaETT2		
Екзон, п.о.	1	84	відсутній	відсутній
	2	60	відсутній	відсутній
	3	194	−194	−194
	4	86	−86	−86
	5	92	−92	−92
	6	171	−171	−173
	7	124	−124	−124
	8	76	−76	−76
	9	162	−162	−162
	10	870	−858	−873
	11	409	−395	−409
Інтрон, п.о.	1	330	відсутній	відсутній
	2	104	відсутній	відсутній
	3	85	85	86
	4	313	339	313
	5	76	76	75
	6	860	860	857
	7	66	65	67
	8	1503	1455	4789
	9	79	80	79
	10	68	68	68

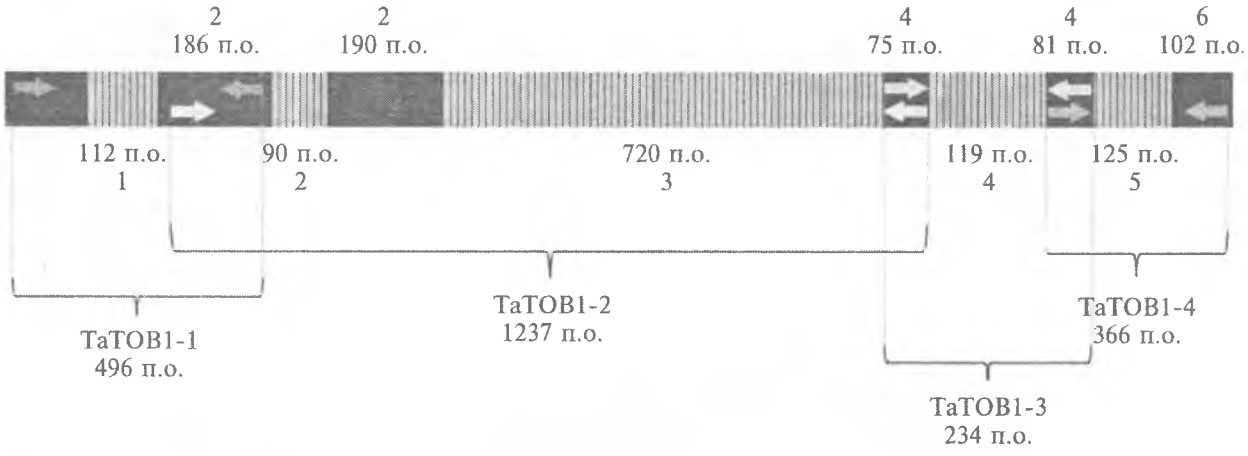

Рис. 1. Структура гомеоалеля *TaTOB1-B* та локалізація праймерів, що використовувалися у роботі. Темним кольором позначено екзони (номер елемента і довжина над фігурою), світлим – інтрони (номер елемента і довжина під фігурою)

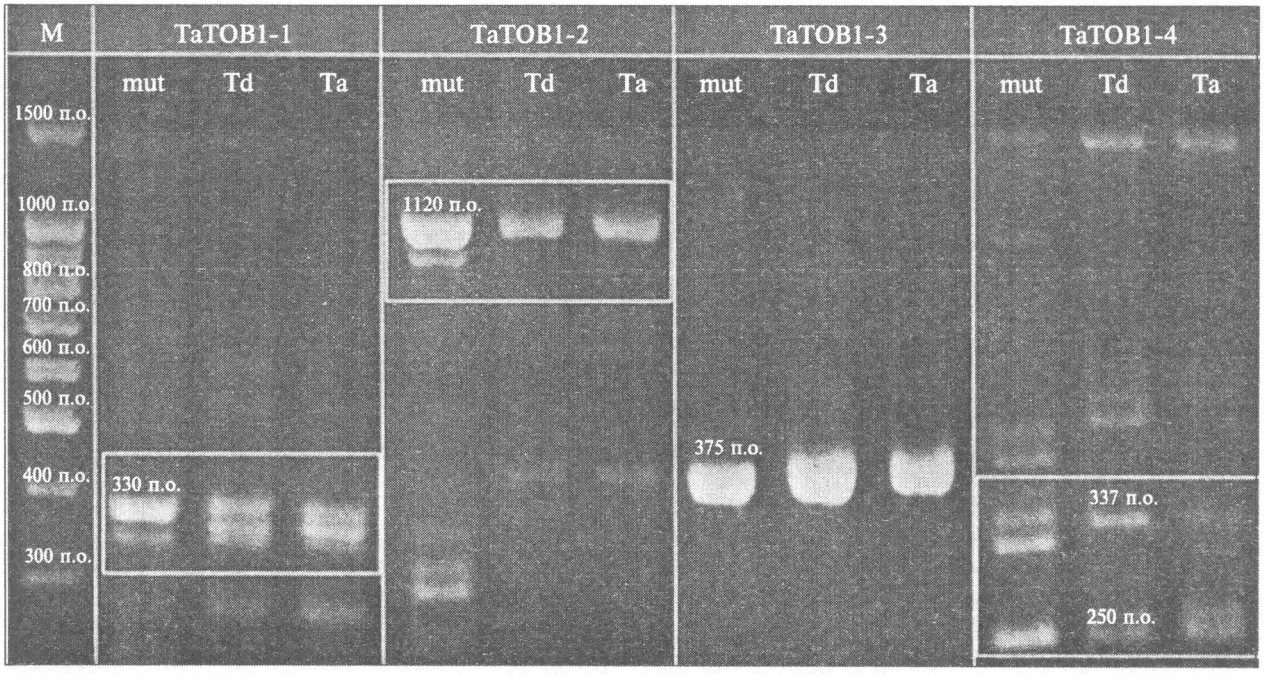

Рис. 2. Результати розділення продуктів ампліфікації *TaTOB1* із чотирма парами праймерів в агарозному гелі. Та – *T. aestivum* сорт 'Аврора', Td – *T. durum* сорт 'Черномор', mut – *Ae. mutica*, M – маркер мас M-27 SibEnzyme 100 п.о. + 1.5 тисяч п.о. + 3 тисяч п.о. DNA Ladder

вертою – 369 п.о., 366 п.о. та 337 п.о. для гомеоалелів на субгеномах A (*TaTOB1-A*), B (*TaTOB1-B*) та D (*TaTOB1-D*), відповідно. Розділення продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних нами генотипів у агарозному гелі дало наступну інформацію. При розділенні ампліконів в агарозному гелі їхня кількість і розмір для *T. aestivum* і *T. durum* не відрізнялися (рис. 2). При розділенні продуктів ампліфікації геномної ДНК цих видів із першою парою праймерів TaTOB1-1, було отримано три компоненти із розрахованими масами 335 п.о.,

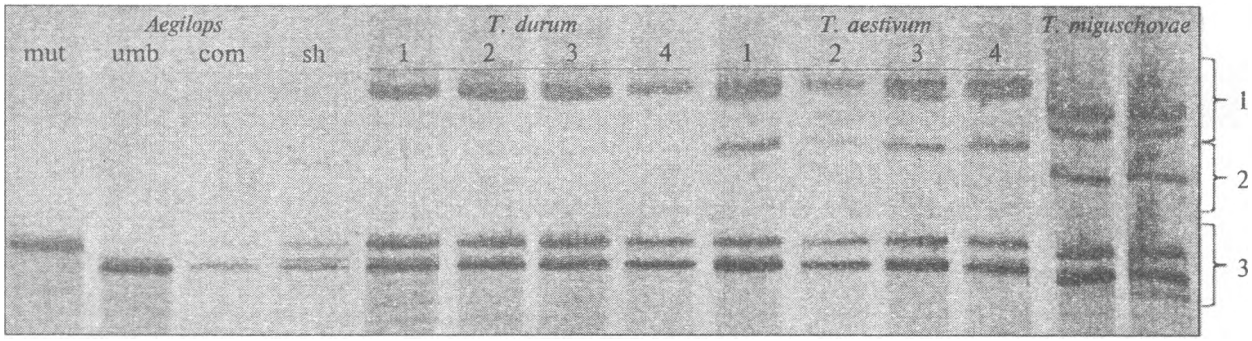

Рис. 3. Результати розділення продуктів ампліфікації із TaTOB1-1 в ПААГ. Субгеномна належність ампліконів: 1 – A^u, A^b; 2 – B, G, T, U, M, S^{sh}; 3 – D. Сорти *T. aestivum*: 1 – 'Аврора', 2 – 'Либідь', 3 – 'Тіра', 4 – 'Ювілейна'. Генотипи *T. durum*: 1 – 'Рубрум', 2 – 'Кандіканс', 3 – 'Леукурум', 4 – 'Черномор'. Види *Aegilops*: mut – *mutica*, umb – *umbellulata*, com – *comosa*, sh – *sharonensis*

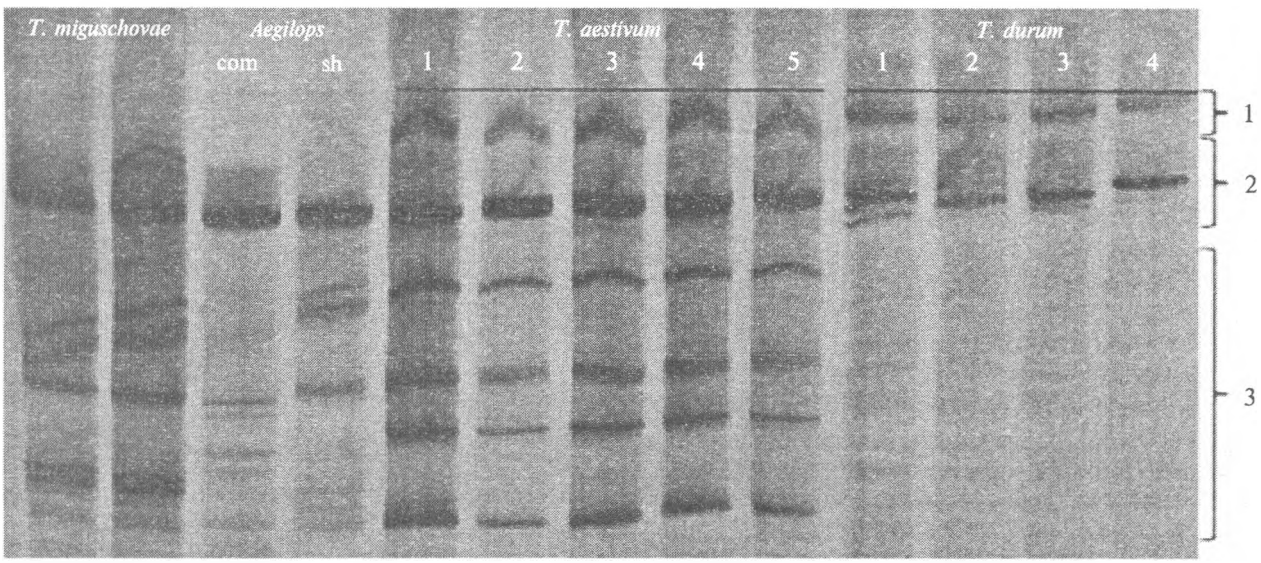

Рис. 4. Результати розділення продуктів ампліфікації із TaTOB1-3 в ПААГ. Субгеномна належність ампліконів: 1 – A^u; 2 – B, G, M, S^{sh}; 3 – D (для пшениці Мігушової A^b, D). Сорти *T. aestivum*: 1 – 'Аврора', 2 – 'Либідь', 3 – 'Тіра', 4 – 'Ювілейна', 5 – 'Ніконія'. Генотипи *T. durum*: 1 – 'Рубрум', 2 – 'Кандіканс', 3 – 'Леукурум', 4 – 'Черномор'. Види *Aegilops*: com – *comosa*, sh – *sharonensis*

314 п.о. та 307 п.о. Електрофоретичні спектри пшениць м'якої і твердої, отримані при розділенні продуктів з другою парою праймерів TaTOB1-2, налічували по одному компоненту із розрахованою масою 1120 п.о., з третьою TaTOB1-3 – по одному компоненту із розрахованою масою 375 п.о. Розділення продуктів ампліфікації із четвертою парою праймерів до гена *TaTOB1* дало по два компоненти у спектрах пшениць розміром 337 та 251 п.о. У диплоїдного виду *Ae. mutica* спектри, отримані після розділення продуктів ампліфікації із першою та четвертою парами праймерів до гена *TaTOB1* відрізнялися від спектрів твердої і м'якої пшениць (рис. 2). При ампліфікації із першою парою праймерів замість трьох компонентів було отримано два розміром 335 п.о. та 307 п.о. При ампліфікації із четвертою парою спектр егілопса крім двох ампліконів, властивих спектрам пшеничної ДНК, мав ще один компонент, який, можливо, є результатом неспецифічної ампліфікації. Роз-

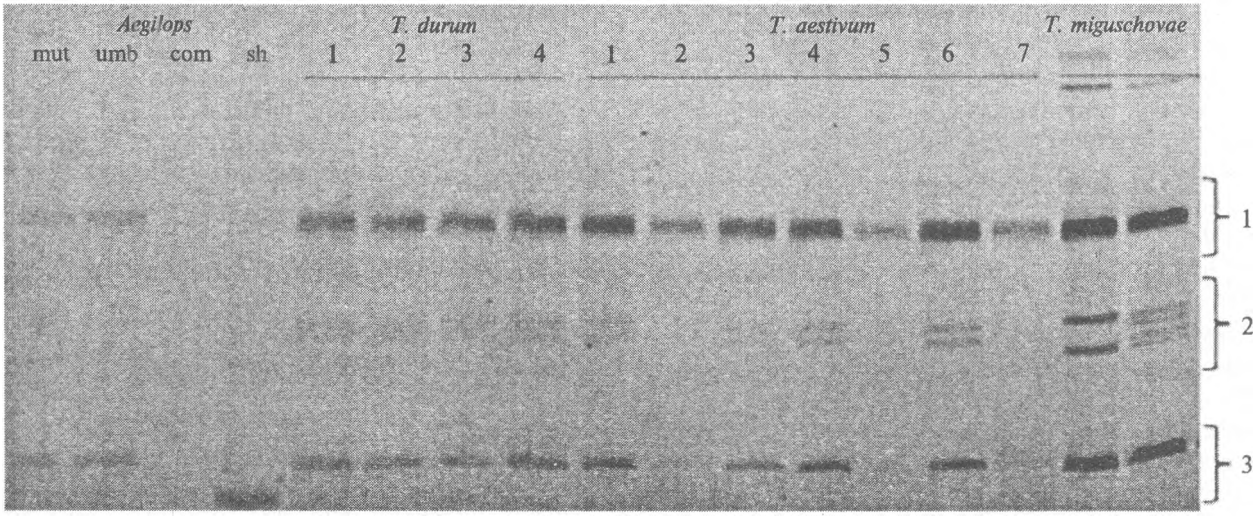

Рис. 5. Результати розділення продуктів ампліфікації із TaTOB1-4 в ПААГ. Субгеномна належність ампліконів: 1 – A^u, A^b; 2 – B, G, M, S^{sh}; 3 – D. Сорти *T. aestivum*: 1 – 'Тіра', 2 – 'Ніконія', 3 – 'Одеська 267', 4 – 'Ювілейна', 5, 7 – 'Либідь', 6 – 'Аврора'. Генотипи *T. durum*: 1 – 'Черномор', 2 – 'Леукурум', 3 – 'Кандіканс', 4 – 'Рубрум'. Види *Aegilops*: mut – *mutica*, umb – *umbellulata*, com – *comosa*, sh – *sharonensis*

ділення в агарозному гелі не дає змоги розділити фрагменти, що очікували отримати при ампліфікації гомеоалелів гена *TaTOB1* пшениці м'якої, через досить незначну різницю в їхньому розмірі. Тому для розділення цих фрагментів та їхньої субгеномної ідентифікації продукти ПЛР надалі розділяли у 6%-ному поліакриламідному гелі (ПААГ).

Виявлення субгеномної належності продуктів ампліфікації, розділених у ПААГ. Із метою субгеномної ідентифікації ампліконів розділяли у ПААГ продукти ампліфікації, отримані у ПЛР зі створеними до послідовності *TaTOB1* праймерами із ДНК диплоїдних пшеницевих роду *Aegilops*, генотипів тетраплоїдної пшениці *T. durum* (A^uA^uBB), сортів гексаплоїдної пшениці м'якої (A^uA^uBBDD), та гексаплоїдного синтетичного виду *Triticum miguschovae* (A^bA^bGGDD). Спектри диплоїдних, тетраплоїдних та гексаплоїдних видів порівнювали і робили висновок щодо субгеномного походження компонентів. *Ae. sharonensis* (S^{sh}) належить до тієї самої секції Sitopsis, до складу якої входить *Ae. speltoides* (S), гіпотетичний прабатько пшеничних субгеномів B та G [28]. Тому в разі наявності однакового амплікона у спектрах ДНК *Ae. sharonensis, T. aestivum, T. durum* та *T. miguschovae* його вважали продуктом субгеному B видів *T. aestivum* та *T. durum* і субгеному G виду *T. miguschovae*. Компоненти, спільні для спектрів ДНК твердої та м'якої пшениць, відносили до продуктів субгеному A^u, спільні для ДНК пшениць Мігушової та м'якої – до продуктів субгеному D.

При розділенні продуктів ПЛР із парою праймерів TaTOB1-1 в 6%-ному ПААГ спектри диплоїдних егілопсів мають по одному компоненту, який для ДНК егілопса Шарона є подвійним, спектри сортів пшениці твердої мають три компоненти, спектри сортів пшениці м'якої – чотири, а спектр пшениці Мігушової – п'ять компонентів (рис. 3). Відповідно до описаного вище підходу для визначення гомеологічної належності гена, що дає продукт ампліфікації, найлегший подвійний компонент, наявний у спектрах пшениць твердої, м'якої та Мігушової, що співпадав за масою із подвійним компонентом спектру *Ae. sharonensis*, віднесли до продуктів ампліфікації гомеоалелів субгеномів B та G. В цій частині спектру розташовані також продукти ампліфікації з ДНК трьох інших вивчених видів егілопсу. Більший за розміром компонент, спільний для пшениць м'якої та Мігушової, віднесли до продукту ампліфікації гомеоалеля субгеному D. Найважчий компонент, властивий пшеницям твердій і м'якій, а також пшениці Мігушової, віднесли до продуктів амплі-

фікації гомеоалелів субгеномів A^u і A^b. Отже, продукти ампліфікації гомеоалелів гена *TaTOB1* є поліморфними при використанні праймерів до 5′– частини гена, і цю пару праймерів можна застосовувати при вивченні структури геномів інтрогресивних ліній пшениці стосовно гена *TaTOB1*.

При застосуванні другої пари праймерів (рис. 1) розмір продуктів ампліфікації виявився завеликим, і тому умови розділення у ПААГ підібрати не вдалося. При розділенні продуктів ПЛР із праймерами TaTOB1-3 в 6%-ному ПААГ виявили по одному компоненту у спектрах егілопсів, по два – у сортів пшениці твердої, по шість – у спектрах сортів пшениці м'якої і п'ять – у спектрі пшениці Мігушової (рис. 4). Спільний для всіх спектрів компонент було ідентифіковано як продукт ампліфікації гомеоалелів субгеномів B і G. Легший компонент, наявний у спектрах пшениці м'якої і твердої, імовірно, утворюється при ампліфікації гомеоалеля з субгеному A^u, спільного для цих двох видів. Чотири важкі компоненти у спектрах сортів пшениці м'якої та генотипу пшениці Мігушової є результатом ампліфікації гомеоалелів субгеному D, хоча за рухливістю компоненти для двох видів пшениці розрізняються. Щодо гомеоалеля *TaTOB1-A* для пшениці Мігушової, яка має субгеном A^b на відміну від субгеному A^u пшениць м'якої та твердої, можливо він не утворює продукту ампліфікації з парою праймерів TaTOB1-3 через зміни у нуклеотидних послідовностях 4 та (чи) 5-го екзонів гомеоалеля *TaTOB1-A*^{b} у порівнянні з гомеоалелем *TaTOB1-B*, на підставі якого розроблялась ця пара праймерів. Тим більш, що за даними геномного сиквенсу пшениці м'якої для екзона 5 зареєстрований поліморфізм за довжиною навіть в межах гомеоалелів у цього виду. Тим не менш, цю пару праймерів також можна застосовувати при вивченні структури інтрогресивних ліній пшениці стосовно гена *TaTOB1*.

У спектрах, отриманих при розділенні продуктів ПЛР з ДНК вивчених генотипів із праймерами TaTOB1-4, було виявлено таку кількість компонентів: один у егілопса *Ae. comosa*, два у егілопсів *Ae. mutica*, *Ae. umbellulata*, два або три у *Ae. sharonensis*, чотири – у сортів пшениць м'якої, твердої, і чотири у пшениці Мігушової (рис. 5). Отримана картина складна для інтерпретації. Умовно спільні (на спектрі ампліконів з ДНК *Ae. sharonensis* рухливість найлегшого компоненту вища, ніж в інших спектрах) для всіх спектрів два компоненти було віднесено до продуктів ампліфікації гомеоалелів субгеномів B і G. Два компоненти, що знаходяться між продуктами ампліфікації *TaTOB1-B* і *TaTOB1-G* у спектрах пшениць м'якої, твердої та у пшениці Мігушової, віднесли до ампліконів гомеоалелів субгеномів A^u, A^b та D. Проте це лише попереднє припущення, яке на даному матеріалі не має доказів. Один з праймерів пари TaTOB1-4 розташований у 5-му екзоні, про мінливість якого вже було висунуте припущення при розгляді продуктів ампліфікації з парою паймерів TaTOB1-3. Отже маркерний потенціал продуктів ампліфікації з парою праймерів TaTOB1-4 для вивчення інтрогресивних ліній щодо алелів гена *TaTOB1* є обмеженим.

Порівняння спектрів ампліфікації ДНК остистих і безостих зразків пшениці м'якої та твердої, отриманих з застосуванням трьох пар праймерів, які ми могли проаналізувати при розділенні компонентів у ПААГ (рис. 3–5), не виявило жодних відмінностей у спектрах зразків, альтернативних за ознакою остистість. На перший погляд це справляє враження відсутності впливу вивченого гена на розвиток остей. Звичайно, можна припустити, що існують зміни у послідовності нуклеотидів, які перетворюють функціональний ген – промотор розвитку остей на нефункціональний алель, локалізовані саме в тій частині гена *TaTOB1*, яка ампліфікувалась парою праймерів TaTOB1-2 і продукти ампліфікації якої ми не могли проаналізувати через розділення у ПААГ. Проте більш правильним нам здається таке пояснення відсутності поліморфних продуктів у спектрах ампліфікації ДНК досліджуваних генотипів, поліморфних за ознакою остистість колосу, з застосуванням внутрішньогенних праймерів до гена *TaTOB1*. По-перше, ключовий поліморфізм міг полягати не у зміні довжини продуктів ампліфікації, а у зміні послідовності, яка не призводить до варіювання довжин ампліконів, як наприклад однонуклеотидні поліморфізми заміщення, через що ми могли його не ідентифікувати. По-

друге, поліморфізм міг торкатися регуляторних ділянок, розташованих вище або нижче від кодуючої частини гена, які не було досліджено. Такий поліморфізм може призводити до зміни експресії гена без зміни його кодуючої частини. Тому, наступним етапом слід вважати дослідження функціонування цього гена у пшеницевих через визначення рівня його експресії у генотипів, що відрізняються за ознакою наявність остей.

Дотримання етичних стандартів. *Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин в якості об'єктів.*

Конфлікт інтересів. *Автори заявляють ніякого конфлікту інтересів не існує.*

Фінансування. *Дослідження частково фінансувалося за рахунок коштів гранту Міжнародного Благодійного Фонду Відродження Києво-Могилянської Академії: «Молекулярні механізми розвитку морфологічних ознак колоса у пшеницевих».*

IDENTIFICATION OF *ORYZA SATIVA* AWN DEVELOPMENT REGULATORY GENES ORTHOLOGS IN TRITICINAE ACCESSIONS

A. Navalikhina, M. Antonyuk,
T. Pasichnyk, T. Ternovska

Національний університет «Києво-Могилянська академія», вул. Сковороди, 2, Київ

E-mail: a.navalihina@gmail.com, antonyuk.m@ukma.edu.ua, t.pasichnyk@ukma.edu.ua, ternovska@ukma.edu.ua

Information on the genetic control of the awn development in the bread wheat is currently limited to the identification of three genes – *Hd*, *B1*, and *B2* awnedness supressors, and no promotors have yet been identified. Another Gramineae species, *Oryza sativa*, has more that ten genes involved in the awn morphogenesis. This article presents the results of the wheat genome sequence analysis for the search of genes, orthologous to the known awn development regulators in rice – *TOB1*, *ETT2* and *DL*. With bioinformatic methods, three genes *TaTOB1*, *TaETT2*, and *TaDL* are identified in bread wheat genome, their location is defined on the chromosomes of 2nd, 3rd and 4th homoeologous groups respectively. The polymorphisms between homoeoalleles of the genes located on A, B, and D subgenomes are described. Identified polymorphisms include variation in the length of the exons and introns in all three genes, variation in the number of exons and introns for the *TaETT2* gene homoeoalleles, inversion of *TaDL-B* homoeoallele relative to the *TaDL-A* and TaDL-D, and inversion of *TaETT2-B* and *TaETT2-D* relative to the *TaETT2-A*. With the PCR method using primers designed to the sequence of the *TaTOB1*, the homoeoalleles of this gene were identified in the genomes A^u, A^b, B, G, D, S^{Sh}, M, U, T of diploid, tetraploid, and hexaploid wheat species. The marker potential of two pairs of primers for the *TaTOB1* gene is shown to study the genome structure of the introgressive wheat lines in relation to this gene.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Dorofeev, V.F., Filatenko, A.A., Migushova, E.P., Udachin, R.A., and Iakubtsiner, M.M., Cultural Flora of USSR. Edited by D.D. Brezhnev. Leningrad: Kolos, 1979, pp. 100–127, 239–269.
2. Goud, J.V., Sadananda, A.R., Two new awn promoter genes in bread wheat, *Genetics*, 1978, vol. 43, pp. 12–16.
3. Antonyuk, M.Z., Prokopyk, D.O., Martynenko, V.S., and Ternovska, T.K., Identification of the genes promoting awnedness in the *Triticum aestivum/Aegilops umbellulata* inrogressive line, *Cytol. Genet.*, 2012, vol. 46, no. 3, pp. 136–43. doi: 10.3103/s009545-2712030024.
4. Ternovska, T.K., Antonyuk, M.Z., and Martynenko, V.S., Genes promotors of awnedness in Triticinae genomes, *Factory Eksper. Evol. Organ. Zb. Nauk. Prats*, Kyiv, Logos, 2013, vol. 12, pp. 164–8.
5. McIntosh, R.A., Yamazaki, Y., Dubcovsky, J., Rogers, J., Morris, C., Appels, R., and Xia, X.C., Catalogue of gene symbols for wheat. 2013.
6. Sourdille, P., Cadalen, T., Gay, G., Gil,l B.S., and Bernard, M., Molecular and physical mapping of genes affecting awning in wheat, *Plant Breed.*, 2002, vol. 121, pp. 320–24. https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2002.728336.x
7. Yoshioka, M., Iehisa, J.C.M., Ohno, R., Kimura, T, Enoki, H., Nishimura, S., Nasuda, Sh., and Takumi, Sh., Three dominant awnless genes in common wheat: Fine mapping, interaction and contribution to diversity in awn shape 9and length. *PLoS One*, 2017, vol. 12, pp. 1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0176148.
8. Prokopyk, D.O., Ternovska, T.K., Homeotic genes and their role in development of morphological traits in wheat, *Cytol. Genet.*, 2011, vol. 45, no. 1, pp. 41–54. doi: 10.3103/s0095452711010099.
9. Toriba, T., Hirano, H.Y., The *DROOPING LEAF* and *OsETTIN2* genes promote awn development in rice, *Plant J*, 2014, vol. 77, pp. 616–26. doi: 10.1111/tpj.12411.
10. Luo, J., Liu, H., Zhou, T., Gu, B., Huang, X., Shangguan, Y., Zhu, J., Li, Y., Zhao, Y., Wang, Y., Zhao, Q., Wang, A., Wang, Z., Sang, T., Wang, Z., and Han, B., *An-1* encodes a basic helix-loop-helix protein that regulates awn development, grain size,

and grain number in rice, *Plant Cell*, 2013, vol. 25, pp. 3360–76. doi: 10.1105/tpc.113.113589.

11. Tanaka, W., Toriba, T., Ohmori, Y., Yoshida, A., Kawai, A., Mayama-Tsuchida, T., Ichikawa, H., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., and Hirano, H-Y., The YABBY Gene *TONGARI-BOUSHI1* Is Involved in Lateral Organ Development and Maintenance of Meristem Organization in the Rice Spikelet, *Plant Cell*, 2012, vol. 24, pp. 80–95. doi: 10.1105/tpc.111.094797.
12. Satoh, N., Itoh, J.I., and Nagato, Y., The *SHOOTLESS2* and *SHOOTLESS1* genes are involved in both initiation and maintenance of the shoot apical meristem through regulating the number of indeterminate cells, *Genetics*, 2003, vol. 164, no. 1, pp. 335–46. PMCID: PMC1462562.
13. Itoh, J.I., Kitano, H., Matsuoka, M., and Nagato, Y., Shoot organization genes regulate shoot apical meristem organization and the pattern of leaf primordium initiation in rice, *Plant Cell*, 2000, vol. 12, pp. 2161–74. doi: https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2161.
14. Abe, M., Yoshikawa, T., Nosaka, M., Sakakibara, H., Sato, Y., Nagato, Y., and Itoh, J., *WAVY LEAF1*, an ortholog of Arabidopsis *HEN1*, regulates shoot development by maintaining microRNA and trans-acting small interfering RNA accumulation in rice, *Plant Physiol*, 2010, vol. 154, pp. 1335–46. doi: 10.1104/pp.110.160234.
15. Song, X., Wang, D., Ma, L., Chen, Z., Li, P., Cui, X., Liu, C., Cao, S., Chu, C., Tao, Y., and Cao, X., Rice RNA-dependent RNA polymerase 6 acts in small RNA biogenesis and spikelet development, *Plant J.*, 2012, vol. 71, pp. 378–89. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.05001.x.
16. Goncharov, N.P., Comparative-genetic analysis – a base for wheat taxonomy revision, *Czech. J. Genet. Plant Breed.*, 2005, vol. 41(special issue), pp. 52–55.
17. Prokopyk, D.O., Ternovska,T.K., SSR-marking of genes taking part in control of awnedness in durum wheat (*Triticum durum* Desf.), *Visnyk Ukr. Tovar. Genet. Selec.*, 2010, vol. 8, no. 1, pp. 31–40.
18. Du, F., Guan, C., and Jiao, Y., Molecular Mechanisms of Leaf Morphogenesis, *Mol. Plant*, 2018, vol. 11, pp. 1117–34. doi: 10.1016/j.molp.2018.06.006.
19. Prunet, N., Meyerowitz, E.M., Genetics and plant development, *Comptes Rendus Biologies*, 2016, vol. 339, pp. 240–6. doi.org/10.1016/j.crvi.2016.05.003.
20. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., and Lipman D.J. Basic local alignment search tool, *J Mol Biol*, 1990, vol. 215, pp. 403–410. doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
21. Jin, J., Tian, F., Yang, D.-C., Meng, Y.Q., Kong, L., Luo, J., and Gao, G., PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants, *Nucleic Acids Res.*, 2017, vol. 45, D1040–D1045. doi: 10.1093/nar/gkw982.
22. Dvorak J., Luo M.-C., Gu Y.Q., et al Sequencing the *Aegilops tauschii* Genome. http://aegilops.wheat.ucdavis.edu
23. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T.L., Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC Bioinformatics*, 2012, vol. 13, no. 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
24. Zhirov, E.G., Synthesis of a new hexaploid wheat, *Tr. po Prikl. Bot. Genet. i Sel.*1980, vol. 68, pp.14–6.
25. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor laboratory press, New York, 1989.
26. Korbie, D.J., Mattick, J.S., Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification, *Nat. Protoc.*, 2008, vol. 3, pp. 1452–56. doi: 10.1038/nprot.2008.133.
27. Kidwell, M.G., Lisch, D., Transposable elements as sources of variation in animals and plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, pp. 7704–11. pubmed/9223252.
28. Petersen, G., Seberg, O., Yde, M., and Berthelsen, K., Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*), *Mol Phylogenet Evol*, 2006, vol. 39, pp.70–82. doi:10.1016/j.ympev.2006.01.023.

Надійшла в редакцію 08.01.19
Після доопрацювання 22.02.19
Прийнята до друку 18.07.19