Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»

Факультет природничих наук

Кафедра біології

Кваліфікаційна робота
освітній ступінь - бакалавр

на тему «**ВЕРИФІКАЦІЯ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ ТА ГІБРИДІВ F1 ПШЕНИЦІ З ЗАСТОСУВАННЯМ ГЕНІВ *Gli*»**

Виконав: студент 4-го року навчання
напряму підготовки 091 — біологія
Міщенко Андрій Миколайович

Керівники:

Єфіменко Т.С.,

кандидат біологічних наук, ст. викладач кафедри біології НаУКМА

Антонюк М.З.,

доктор біологічних наук, доцент кафедри біології НаУКМА

Рецензент: Шалак В.Ф.,

к.б.н., с.н.с., Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК
Пасічник Т.В.
«____» червня 2020року

Київ – 2020

ЗМІСТ

Стор.

ВСТУП _____ 4

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ _____ 6

1.1. Молекулярна структура білків гліадинів _____ 7

1.2. Молекулярна структура генів гліадинів_____ 10

1.3. Інтрогресія чужинного генетичного матеріалу до геному пшениці_____ 12

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА _____ 16

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ_ 16

2.1. Об'єкт дослідження_____ 16

2.2. Реактиви, розчини та обладнання_____ 18

2.2.1. Реактиви _____ 18

2.2.2. Розчини_____ 18

2.2.3. Обладнання_____ 18

2.3.Методи дослідження _____ 18

2.3.1. Екстракція гліадинів _____ 18

2.3.2. Гель-електрофорез в поліакриламідному гелі _____ 19

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ__ 20

3.1. Внутрішньогенераційні поліморфізми ω-зони гліадинового спектру_____ 21

3.2. Внутрішньогенераційні поліморфізми ɣ,β та α-зон гліадинового спектру _____ 26

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ _____ 30

ВИСНОВКИ_____ 32

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ _____ 33

Додаток_____ 37

ВСТУП

Проламіни пшениці являють собою складну суміш з 71–78 білків, що розділені на гліадини та глютеніти, ці дві групи відмінні за будовою та молекулярною масою, але розташовані, переважно, на одних локусах. Ці запасні бідки складають, приблизно, 80% усіх білків зерен пшениці та забезпечують 50% світової потреби в харчових білках. Незважаючи на це, проламіни також є причиною численних порушень, зокрема целіакії. Целіакія є генетично зумовленим автоімунним захворюванням, що спричиняє відмирання ворсинок тонкого кишечника. Тому, зважаючи на всі позитивні та негативні сторони впливу проламінів на життя людини, їх дослідження є багатостороннім та всеохоплюючим, починаючи від наукових та медичних галузей, закінчуючи сільськогосподарськими потребами. Також родичами проламінів злакових є 2S запасаючі альбумін білки, наявні в папоротях, та стрічковидні білки (tapetal proteins) хрестоцвітих, що говорить про давність цієї групи білків [1–6].

Окремої уваги заслуговують проламіни з точки зору їхнього використання як молекулярних маркерів. Гліадини, як частина проламінів, також володіють цією властивістю. Завдяки зібраності в кластери, легкості у дослідженні, високій поліморфності, кодомінантному типу успадкування, та іншим характеристикам, гліадини посіли важливе місце в науці [7].

Однією з найрозповсюдженіших галузей використання гліадинів є перевірка проходження інтрогресій та картування хромосом. Включення чужинного генетичного матеріалу до геномів рослин, з метою покращення певних характеристик, чи надання нових, є дуже перспективним напрямком розвитку сучасної науки. Пшениця стала одним з центральних об’єктів для проведення інтрогресій, зокрема створення інтрогресивних ліній. Інтрогресивні лінії – це лінії пшениці з включеним до геному чужинними генетичним матеріалом, через багаторазове беккросування. Інтрогресивні

лінії використовують для дослідження кількісних ознак, передачі та дослідження інших ознак інтересу [8–10].

Мета даного дослідження, за допомогою генів гліадинів верифіковувати інтрогресивні лінії м’якої пшениці та гібриди F1, отримані від схрещування вищезгаданих ліній з різними сортами м’якої пшениці.

Під час проведення дослідження були проставлені такі задачі:

1) Верифікувати одноманітність гібридів F1, отриманих від схрещування сортів з лініями м’якої пшениці;

2) У разі неоднорідності гібридів – ідентифікувати внутрішньогенераційні поліморфізми;

3) Проаналізувати компоненти електрофоретичних спектрів гібридів на відповідність спектрам батьківських організмів;

4) У разі наявності, виділити поліморфізми, що не відповідають жодній з батьківських особин.

Робота виконувалася в лабораторії генетики та клітинної біології кафедри біології НаУКМА.

З наданих 23х гібридів F1 було досліджено лише 11, що може справити вплив на загальний обсяг результатів. Однак, навіть опрацьована, на сьогоднішній день, частина матеріалу може дати загальні уявлення про поведінку геномів батьківських організмів при схрещуванні та надати ґрунт для подальших досліджень.

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Насінина – важливий елемент, при розмноженні рослин. Насінина злакових складається з багатьох структурних елементів, які різняться між собою за функціями та, відповідно, хімічним складом. Білки є другими, за відсотковим вмістом, молекулами зенківки пшениці, а їх вміст може коливатися від 10% до 18% загальної кількості сухої речовини. Крім структурної та ферментативної функції, білки зерна пшениці виконують і

запасаючу функцію. Основними запасними білками злакових рослин є білки з родини глютенів. Глютенові білки відіграють ключову роль у визначенні унікальних хлібопекарських якостей пшениці, надаючи борошну здатності до поглинання води, когезивності, в'язкості та еластичності тіста. У зв’язку з цим, дослідження структури та угрупування запасних генів пшениці має не тільки суто науковий характер, а і економічну складову. Глютенові білки можна розділити на дві основні фракції відповідно до їх розчинності у водно-спиртових розчинах: розчинні гліадини та нерозчинні глютеніни. Спільною рисою обох фракцій є склад з численних білкових компонентів, що характеризуються високим вмістом глутаміну та проліну [7,11–13].

Фракція глютенінів включає агреговані білки, пов'язані міжланцюговими дисульфідними зв'язками, які мають розмір від 500 000 до більше 10 мільйонів амінокислотних залишків. У разі відновлення атомів сірки, та руйнування дисульфідних зав’язків, утворюються білкові субодиниці, які розчинні у водно-спиртових розчинах аналогічно до гліадинів. На основі первинної структури, субодиниці глютеніну поділяють на субодиниці з високою молекулярною масою (HMW), та субодиниці з низькою молекулярною масою (LMW) [11,14,15].

На відміну від глютенінової фракції, гліадини розчинні в водно-спиртових розчинах з самого початку без попередньої обробки. За розділенням в поліакриламідному гель-електрофорезі їх поділяють на групи

від найменш рухомого до найрухоміших (ω,γ,β,α). У даному розділі детальніше описана молекулярна структура гліадинових білків, кластера гліадинів, та властивості гліадинових білків в якості молекулярного маркера для підтвердження інтрогресій [15].

1.1. Молекулярна структура білків гліадинів

Більшість гліадинів є мономерами з внутрішньомолекулярними дисульфідними зв'язками. Спочатку їх класифікували на чотири групи за ознакою рухливості при низькому pH під час гель електрофорезу (α-, β-, γ-, ω-гліадіни в порядку зменшення рухливості). Пізніші дослідження амінокислотних послідовностей, показали, що електрофоретична рухливість не завжди відображає білкові зв’язки через що α-і β-гліадини об’єднали в одну групу (α / β-тип). Сучасні методи, такі як двомірний електрофорез або високоефективна рідинна хроматографія з реверсивною фазою (RP HPLC), дозволяють розділити фракцію гліадинів на понад сто компонентів. На основі аналізу повної або часткової амінокислотної послідовності, амінокислотних композицій та молекулярної ваги (MW) їх можна згрупувати у чотири різних типи: ω5-, ω1,2-, α / β- та g-гліадіни. У межах кожного типу структурні відмінності невеликі, та переважно спричинені заміщенням, делецією та включенням одинарних амінокислотних залишків [11,16].

ω-гліадини характеризуються найвищим вмістом глутаміну, проліну та фенілаланіну, які разом складають близько 80% від загального вмісту амінокислот, та суттєво відмінними концентраціями гнших амінокислот, наприклад тирозину та цестиїну. ω5-гліадіни мають вищу молекулярну масу (50,000), ніж ω1,2- гліадіни (40,000). Крім цього ω-гліадини відрізняються від інших тим, що вони, як правило, не містять залишків цистеїну і дуже мало залишків метіоніну, через що їх називають "бідними на сірку". Через відсутність залишків цистеїну, ω-гліадини не мають можливості для утворення дисульфідних зшивок. Ці білки майже повністю складаються з

повторюваних послідовностей, багатих глутаміном та проліном (наприклад, PQQPFPQQ) [11,17].

α / β- та γ-гліадіни перекриваються за молекулярною масою (28000–35000), а концентрації глутаміну та проліну, в їх складі, значно нижчі, ніж у ω-гліадинів. Також, навідміну ω-гліадинів, α, β, та γ-гліадіни здатні утворювати дисульфідні зшивки, за допомогою висококонсервативно розташованим залишкам цистеїну, локалізованим в специфічних доменах. Кожен з типів гліадинів має чітко відмінні N- та С-кінцеві домени. N-кінцевий домен становить 40–50% від загальної кількості білків, та складається здебільшого з повторюваних послідовностей, багатих глутаміном, проліном, фенілаланіном та тирозином. Повторювані елементи α та β-гліадинів - це додекапептиди (dodecapeptides), такі як QPQPFPQQPYP, які зазвичай повторюються п'ять разів та є зонами з частими модифікаціями SNPs (однонкуклеотидний поліморфізм). Типовим елементом γ -гліадинів є QPQQPFP, який повторюється до 16 разів, при цьому між повторами можуть міститися додаткові залишки. За С-кінцевими доменами α, β, та γ-гліадини є гомологічними. Ці домени являють собою послідовності, які не повторюються, мають менший вміст глутаміну та проліну, ніж N-кінцевий домен, і мають амінокислотний склад більш подібний іншим білкам. Винятками є те що, α та β-гліадини містять шість, а γ-гліадини вісім залишків цистеїну, розташованих у С-термінальному домені, вони утворюють три і, відповідно, чотири гомологічні внутрішньоланцюгові зшивки. Дослідження вторинної структури показали, що для N-кінцевих доменів α та β -гліадинів характерна β-оборотна конформація (β-turn conformation), подібна до такої у ω-гліадинів. Неповторюваний С-кінцевий домен містить значну кількість α-спіралей та β-шарів [11,18].

Хоча розподіл гліадинів між різними типами сильно залежить від сорту пшениці та умов вирощування, можна узагальнити, що α, β та γ-гліадини займають най більший відсоток від усіх гліадинів, тоді як ω-гліадини зустрічаються у значно менших концентраціях. Незначна частина гліадинів

має непарну кількість залишків цистеїну, внаслідок точкових мутацій. Відносно недавно було відкрито новий клас гліадинів – δ-гліадини. Вони є ортологами γ3-хордеїнів ячменю, та знаходяться в локусі геному пшениці Gli-1 / Glu-3 разом з γ- та ω-гліадинами та LMW-глютенінами. За своєю структурою δ-гліадини подібні до γ-гліадинів (рис.1.1.), SIG є сигнальним доменом, який відщеплюється при сплайсингу, домен II багатий на глутамін та має у своєму складі велику кількість повторів, як і домен II, домен IV - багатий на глутамін але без повторів, домени III та IV містять консервативно розташовані залишки цистеїну, які здатні утворювати дисульфідні містки. Незважаючи на те, що γ-гліадини можуть містити непарну кількість залишків цистеїну, що робить можливим утворення дисульфідних міжмолекулярних зв'язків, δ-гліадини мають тільки парні залишки. [11,19]

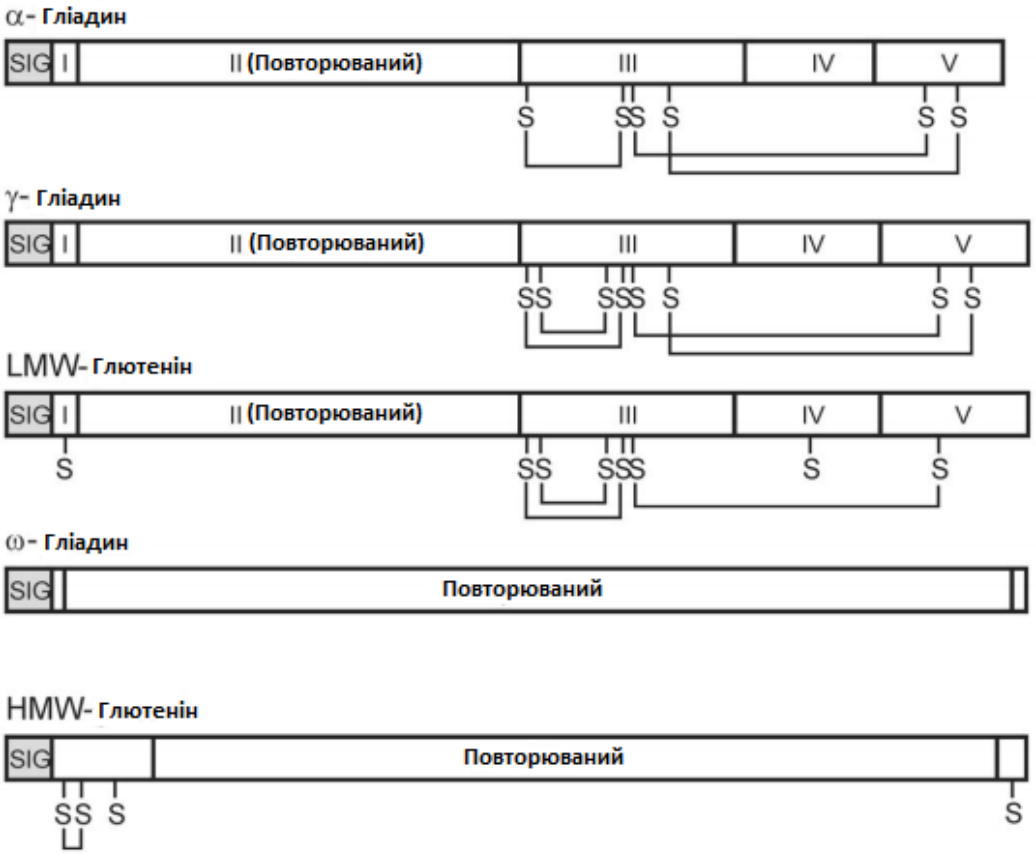


Рис.1.1. Загальний план будови проламінів пшениці (Змінено за [19]).

1.2. Молекулярна структура генів гліадинів

Гліадини є найпоширенішими білками в ендоспермі пшениці. Вони кодуються генними кластерами, розташованими на коротких плечах гомеологічних груп хромосом один і шість, як показано на рис. 1.2. Внутрішньокластерна рекомбінація, кластерів гліадинів, є дуже рідкісною. Генні кластери є результатом еволюційного процесу, та утворені в процесі дуплікації вихідного гена чи нерівномірного розходження хромосом. γ- та ω-гліадини кодуються у локусах *Gli-1* (*Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1*), на коротких гілках гомеологічної групи 1 хромосоми, тоді як більшість α-, β- та деякі γ-гліадини кодуються локусами *Gli-2* (*Gli-A2*, *Gli-B2* та *Gli-D2*), які присутні на коротких плечах хромосом групи 6 [7,20–22].

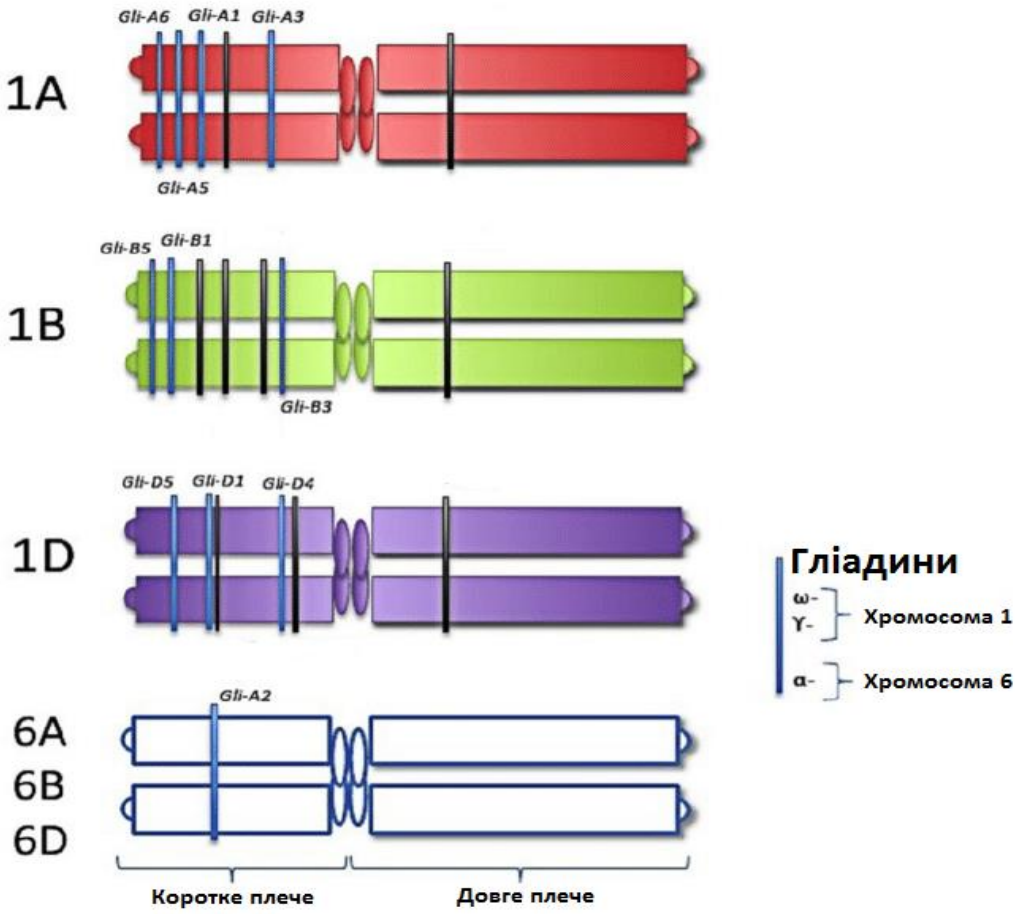


Рис. 1.2. Розташування локусів гліадинів на хромосомах гексаплоїдної пшениці (Змінено за [23]).

Просторове розділення генів гліадину на хромосоми групи 1 та 6 вважається стародавньою міжхромосомною транслокацією. Згідно з цим, локус *Gli-2* походить від транслокації гена γ-гліадину з хромосоми 1 до хромосоми 6, та подальшою дивергенцією кодуючої послідовності, в результаті чого були утворені гени α-гліадину. Локуси *Gli-1* наявні в дистальних частинах хромосом групи 1 (рис. 1.2), демонструючи незалежний або слабкий зв'язок із відповідною центромерою. На відміну від локусів *Gli-1,* локуси *Gli-2* вивчені менш детально, але згідно з телоцентричним картографуванням, наявна 35% рекомбінація між локусом *Gli-A2* та центромерою відповідної хромосоми. Крім цього окремі локуси *Gli-1* та *Gli-2* мають високий рівень поліморфізму, це призводить до утворення великого різноманіття гліадинових білків [7,24].

На відміну від інших проламінів пшениці, α-гліадини наявні лише у близькоспоріднених видах пшениці, Triticum та Aegilops, а не в житі і не в ячмені. Склад генних кластерів α-гліадинів дуже не однорідний, та може варіюватися від 25 до 150 копій, які розташовані на гомеологічних хромосомах групи 6. В області α-гліадину, як і в інших геномних регіонах пшениці, ретротранспозони складають більшість послідовностей. Ідентифікація великої кількості ретроелементів у регіонах *Gli-2* означає, що вони активно брали участь в еволюції геному пшениці та можуть бути одною з причин високої поліморфності даних локусів [16,17,22,25,26].

Як вказано в попередньому розділі, гліадини мають у своєму складі повторюваний домен, багатий на глутамін. Ці домени, у складі генного кластера, кодуються триплетами CAA або CAG. Відповідно, ці багаті на глутамін повторювані домени утворюють внутрішньогенні мікросателіти, які здатні спричиняти нерівний кросинговер та проковзування полімерази при реплікації. Таким чином, можуть бути спричинені мутації в мікросателітах, які в свою чергу можуть стати причиною поліморфності гліадинових генів [7,27].

1.3. Інтрогресія чужинного генетичного матеріалу до геному пшениці

Стійкість пшениці до різноманітних факторів зовнішнього середовища справляє великий вплив на її врожайність. Генетичного матеріалу видів пшениці, які були включені до використання людиною у науці та господарстві недостатньо для подальшого ефективного використання. Гібридизація наявних у використанні сортів справляє дуже обмежений вплив на вирішення даної проблеми, оскільки з дуже частою гібридизацією в обмеженому колі батьківських організмів сильно падають якісні та кількісні характеристики нащадків. Прикладами цього можуть слугувати гени стійкості до хвороб. Обмежена кількість цих генів в генному пулі, та складність цільової передачі тільки потрібних частин геному, сильно гальмують розвиток селекційних програм у цій галузі, крім цього дану проблему не можна вирішити за допомогою звичайної гібридизації батьківських організмів з господарсько цінними ознаками. У таких умовах донорами господарсько цінних ознак можуть стати споріднені організми, з більшою поліморфністю цільових локусів. Однак наявність видоспецифічного бар'єру, відсутність кон'югації між хромосомами ускладнюють інтрогресію. Деякі з цих перешкод були подолані шляхом обробки хімічними речовинами для подвоєння хромосом (наприклад, колхіцином чи кофеїном), холодною обробкою, місточковим схрещуванням (bridging crosses), гаметоциднми генами та опроміненням. Однак подібні методи доречні не у всіх випадках [8,28–30].

Можливості для проведення інтрогресії та вірогідність її успіху, залежить від наявності або відсутності гомологічних геномів у видах, що схрещуються, і їх кількості хромосом відповідно. Існує певна кількість споріднених організмів, хромосоми яких здатні кон'югувати з хромосомами пшениці, що дозволяє переносити цільові гени даних видів шляхом прямого

схрещування. Для більшості видів необхідне використання спеціальних засобів хромосомної інженерії [8,29].

Засоби хромосомної інженерії для включення чужинного генетичного матеріалу до складу досліджуваної лінії пшениці можуть бути доволі різноманітними. Важливою частиною таких досліджень є підбір матеріалу для схрещувань, наприклад ізогенні лінії, рекомбінантно-інбредні лінії, дигаплоїди, лінії з окремими рекомбінантними хромосомами, та ін [8,31].

Ізогенні лінії – це сукупність ліній, кожна з яких відрізняється від інших тільки одною ознакою. Передача цільового гена відбувається шляхом проведення серії беккросів, з добором за маркерною ознакою. Однак отримані лінії все рівно залишаться майже-ізогенними, через те, що навіть при великій кількості беккросів все одно залишиться деяка кількість генетичного матеріалу донора, що не є частиною цільового гена. Можливим способом вирішення цієї проблеми може стати паралельне створення майже-ізогенних ліній з кожним з батьків, після чого подальша перевірка за фенотипом дозволить визначити «зайвий ген» [31].

Рекомбінантно-інбредні лінії (РІЛ) – це лінії, отримані шляхом схрещування чистих ліній та формування інбредних ліній. Для утворення рекомбінантно-інбредних ліній використовують метод SSD (single seed descent). За цим методом необхідно взяти одне зерно рослини F1 висіяти його, з утвореної рослини взяти також одне зерно, висіяти та продовжувати процес доти, доки кожна РІЛ не стане фіксованою за різними комбінаціями зчеплених білків батьківських алелей [31].

Дигаплоїди – це результат подвоєння числа хромосом у гаплоїдних рослин отриманих від гібридів першого покоління при схрещуванні контрастних, за досліджуваною ознакою, батьківських форм [31].

Лінії з окремими рекомбінантними хромосомами – це лінії створені за методом Law. Задля їх утворення в ініціальному схрещуванні беруть участь дві хромосомно-заміщені лінії з різних джерел за гомологічними хромосомами та контрастними за досліджуваною ознакою [31].

Під час самого процесу інтрогресії можуть виникнути труднощі, якщо точка розриву при рекомбінації (recombinant breakpoint) знаходиться в різних позиціях відносно цільового гену, через що, кількість чужинного генетичного матеріалу, перенесеного до геному пшениці, може варіювати. За допомогою генетичного методу картографування, такого як метод молекулярних маркерів, або фізичного методу, наприклад FISH або GISH, можна обрати інтрогресії з перенесенням мінімальної частини супутнього генетичного матеріалу, які все ще будуть демонструвати найкращі загальні показники в селекційній перспективі. Крім цього, кон'югація хромосом вимагає достатнього ступеня синтенії. Як відомо, гомеологічні хромосоми можуть мати суттєві відмінності в порядку розташування генів інтересу, тим самим обмежуючи точки, в яких може відбуватися гомеологічна рекомбінація. Крім цього можуть відбуватися шкідливі рекомбінації алелей, що можуть призводити до некрозу або стерильності гаметоцидних локусів або некомпенсаторних хромосом [28,32,33].

Перенесення чужорідного хроматину починається з міжвидового схрещування між пшеницею та цільовим видом, що призводить до генерації амфіплоїдів. Амфіплоїди - це гібриди, які містять диплоїдний набір хромосом обох батьків; в цьому випадку це включає пшеницю та чужорідний вид. Далі потрібно провести серію беккросів, для утворення ліній, наведених вище. За нормальних умов кон'югація відбувається між гомологічними хромосомами, що жорстко регулюється генами *Ph1* і *Ph2*. Таким чином при виникненні мутації в *Ph* генах, частково знімається обмеження видоспецифічного схрещування. Наприклад, чужинні хромосоми можуть кон'югувати та рекомбінуватися з гомеологічними хромосомами пшениці у стані *ph1*. Також можливе використання інгібіторів *Ph1* та *Ph2*, отриманих від чужорідних видів, таких як *Ae. speltoides* [28,34].

Один з методів інтрогресії чужинного матеріалу полягає в об'єднанні в один генетичний матеріал чужорідних гомеологічних хромосом. Спроектовані хромосоми з бажаною комбінацією ознак є результатом

рекомбінації між чужорідними сегментами (гомологічними або гомеологічними), які були попередньо включені до даних хромосом. Таким чином, можуть накопичуватися різні корисні гени, а небажані гени – усуватися [35].

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2
ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження

Гліадинові білки, екстраговані з зерен гібридів F_1 (Табл. 2.1.) – від схрещування інтрогресивних ліній та сортів м'якої пшениці *Triticum aestivum* L. (A^uA^uBBDD, 2n=6x=42): Лелека, Вдала, Ніконія, Панна та Одеська 267. А також сорт мякої пшениці Аврора (AABBDD), та амфідиплоїд Авротіка (AABBTT, де геном TT внесений від *Aegilops mutica*), від схрещування яких були отримані вищезгадані інтрогресивні лінії.

Таблиця 2.1

Досліджуваний матеріал, та гібриди, що аналізувалися

№	**Характер матеріалу**	**Комбінація схрещування (сорту пшениці з певною лінією)**	**Ознаки інтересу**
1	F1	Лелека x f18 1111	Наявність остеподібного подовження
2		–//–	Наявність остей
3	F1	Лелека x f18 831	Світло-коричневе забарвлення + without pit
4		–//–	Червоне забарвлення + pit
5	F1	Ніконія x f18 922	Наявність остей
6		–//–	Наявність напівостей

7	F1	Вдала x f18 885	pm3
8		–//–	pm4
9		–//–	pm7
10	F1	Панна x f18 747	Наявність остеподібного подовження
11		–//–	Наявність остей
12	F1	Панна x f18 747	Наявність остеподібного подовження
13		–//–	Наявність остей
14	F1	f18 902/3 x Панна	
15		–//–	pm7
16	F1	Одеська 267 x f18 1086	Наявність остеподібного подовження + pm7
17		–//–	Наявність остей
18	F1	f18 902/3 x Панна	
19		–//–	pm7
20	F1	f18 745/1 (з остями) x f18 745/2 (без остей)	Наявність остей
21		–//–	Наявність слабковираженого остеподібного подовження
22	лінія	f18 1070/2 x f18 1070/2	Наявність остей
23		–//–	Наявність остеподібного подовження

2.2. Реактиви, розчини та обладнання

2.2.1. Реактиви. Залізо (II) сірчанокисле, 7-водне, ХЧ, ООО «Реактив»; SERVA BlueR, research grade, SERVA; L-гістидин гідрохлорид, 1-водний, ОСЧ, REXIN; Сечовина, Ч, Україна; Аскорбінова кислота, Sigma; Acrylamide, Merk Schuchardt; N,N`-Methylene bisacrylamide, SERVA; Оцтова кислота (крижана), Китай; Мурашина кислота; ТХО (трихлороцтова кислота); Silan; Бутанол; Мастило Лілол-24.

2.2.2. Розчини. SGB-буфер: 1,2 г. гістидину солянокислого, 1,6 мл. оцтової кислоти (криж.), H_2O до 50 мл.

MSS-буфер: акриламід 30,4 г., мелиленбісакриламід 1,6 г., розчин FeSO4 (44 мг./100мл.) 4,55 мл., аскорбінова кислота 245 мг., H_2O до 100 мл.

Розділяючий гель: MSS 11 мл., сечовина (4,44М) 33,75 мл., оцтова кислота (криж.) 3 мл., H_2O 2,25 мл. + ПСА (персульфат амонію) 200 мкл., ТЕМЕД (тетраметилетиленамід) 10 мкл.

Концентруючий гель: SGB 2,125 мл., MSS 1,962 мл., сечовина (4,44М) 8,4 мл., + ПСА 80 мкл., ТЕМЕД 10 мкл.

Електродний буфер: мурашина кислота 10 мл., H_2O до 300 мл. Верхній 0,5х, нижній 1х.

2.2.3. Обладнання. Самплери Thermo scientific 100-1000 мкл; Самплери Sartorius 2-20 мкл; Самплери HTL 10, 20, 100, 200, 20-200, 1000, 200-1000 мкл; Форезниці виготовлені співробітниками лабораторії; Термостат, ТПЗ, Одеса; Гребінка + спейсери; Джерело постійного струму, Литва; Ступка Абіха.

2.3. Методи дослідження

2.3.1. Екстракція гліадинів. Половину зернівки подрібнювали ступкою Абіха, переносили в еппендорф та додали 200 мкл. 70% етанолу. Екстрагували 1,5 годин. Після цього перенести 60 мкл. екстракту в інший

еппендорф, та поставили його в термостат на ніч при 50^{o}C. Сухий осад розчиняли в 50 мкл. 5,5М сечовини на 30 хв.

2.3.2. Гель-електрофорез в поліакриламідному гелі. Рогате та звичайне скло знежирили розчином етанолу. Після легкого підсушування нанесли на звичайне скло спиртовий розчин сілану та ретельно розтерли по поверхні. Змастили спейсери солідолом та приклали до бічних країв звичайного скла, накрили рогатим склом та закріпили положення скелець за допомогою прищепок. Поставили скла у вертикальне положення та залили пробку з розділяючого гелю. Залили розділяючий гель, та вирівняли плівку поверхневого натягу нанесенням бутанолу. Після полімеризації злили бутанол, промили дистилятом, залили концентруючий гель та вставили гребінку. Після полімеризації концентруючого гелю витягли гребінку та внесли зразки. Скло закріпили у форезниці, залили електродними буферами та підключили до генератора постійного струму за умов 150 В. 10 мА. на 30 хв., потім перемкнули на 400 В. 30 мА. на 6 – 6,5 годин.

РОЗДІЛ 3
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Для проведення дослідження лабораторією були надані зерна сортів м'якої пшениці, зерна гібридів F1, отриманих від схрещування сортів та ліній пшениці. Також були надані зерна Авротіки та Аврори, які використовували для заміни батьківської лінії на спектрі, через подібність компонентів спектру.

За загальновідомими законами Менделя, гібриди першого покоління мають бути одноманітними за фенотипним проявом. Однак на практиці це не завжди так. Можливими причинами розходження у фенотипі може слугувати недостатня гомозиготність батьківських організмів, точкові мутації (такі як транзиції та трансверсії), дія транспозонів, тощо [8,10,36].

За результатами дослідження найбільший відсоток поліморфізмів наявний у ω-зоні гліадинового спектру. Можливою причиною даного розподілу може слугувати краще розділення ω-зони у поліакриламідному гелі, та більша кількість розділених компонентів, порівняно з іншими зонами гліадинів, як показано на рис. 3.1 [8].

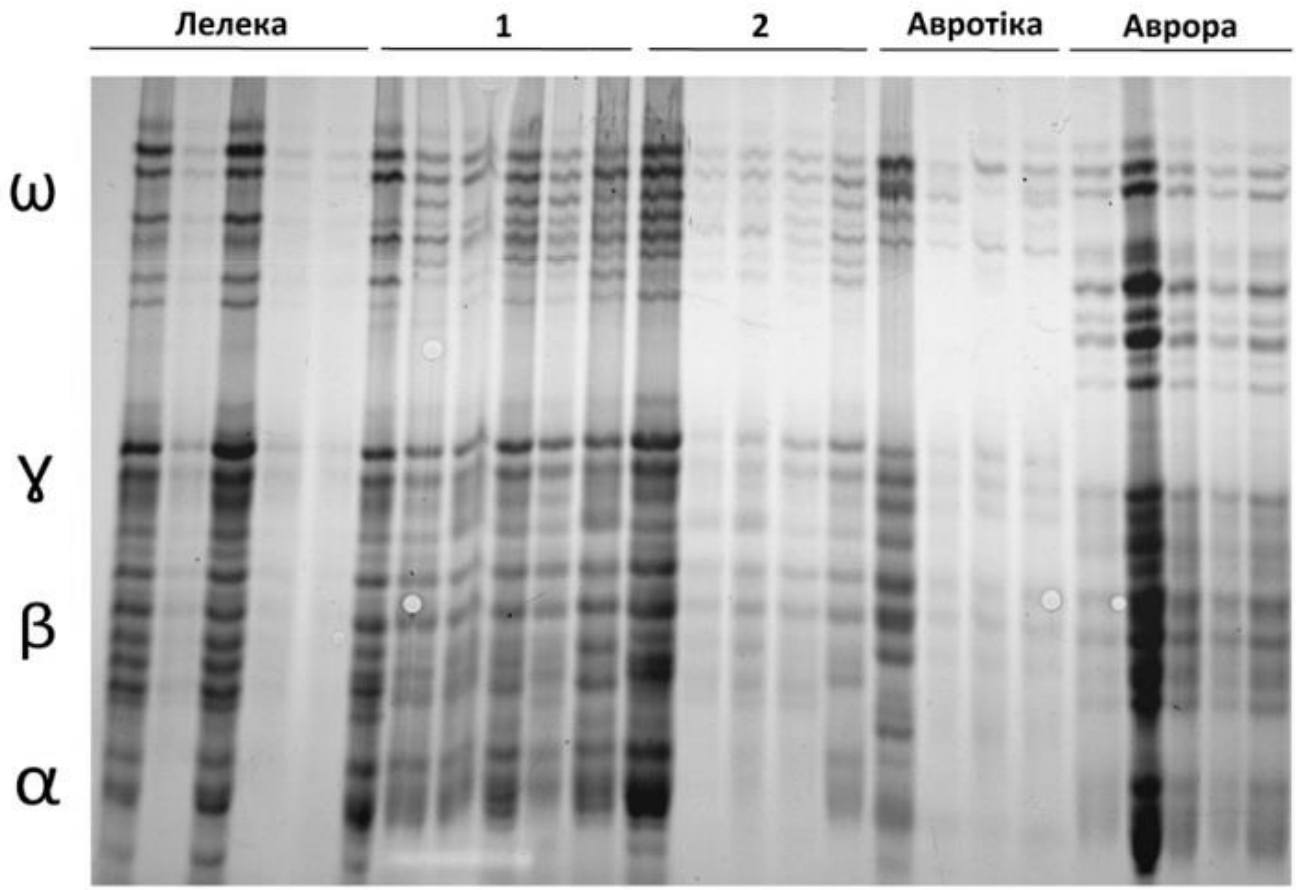


Рис. 3.1. Повний електрофоретичний спектр зібридів №1 та 2 (див. табл 2.1): грецькими літерами виділено зони гліадинів; 27 – Лелека ; 24 – Авротіка; 25 – Аврора; 1 та 2 – номери гібридів (див. табл 2.1).

3.1. Внутрішньогенераційна мінливість ω-зони гліадинового спектру

У ході дослідження нами отримано та розділено гліадинові спектри на три групи за рівнем поліморфності. Високому рівню поліморфності відповідають зони спектру з кількістю поліморфізмів більше двох, цьому рівню відповідають гібриди № 1, 4, 5, 6, 10, 11 (див. табл. 2.1), спектри чиїх ω-зон представлені на рис. 3.2 - 3.4.

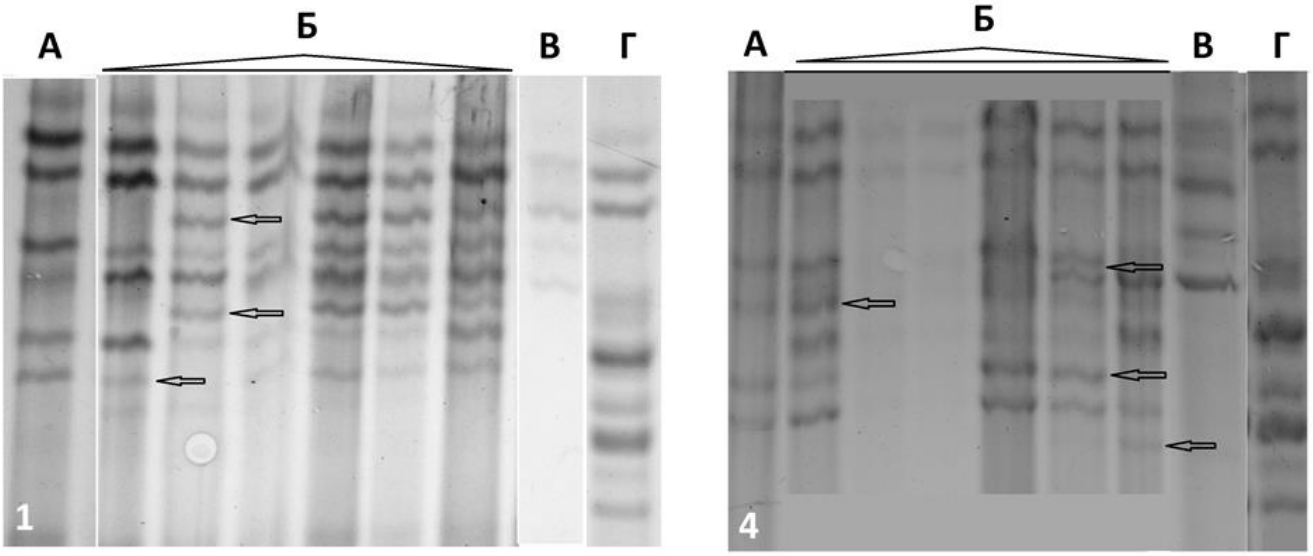


Рис. 3.2. ω-зони електорофоретичних спектрів гліадинів з високим рівнем внутрішньогенераційної поліморфності: стрілочками показані поліморфні компоненти, цифрами позначені номери гібридів у табл. 2.1, А – Лелека, Б – гібрид F1, В – Авротіка, Г – Аврора.

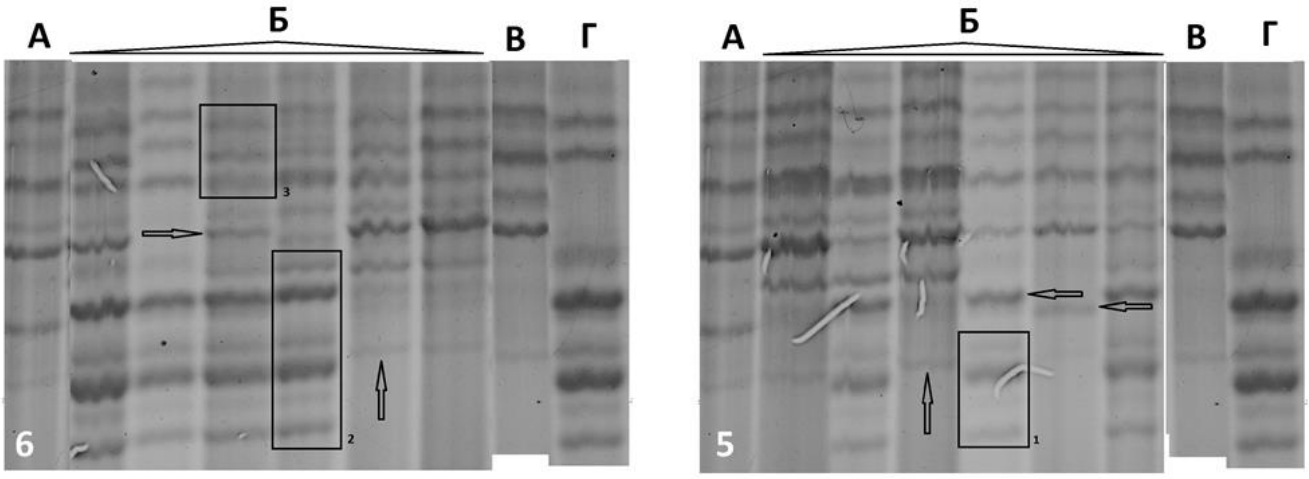


Рис. 3.3. ω-зони електорофоретичних спектрів гліадинів з високим рівнем внутрішньогенераційної поліморфності: стрілочками показані поліморфні компоненти, рамками позначені комплекси поліморфних компонентів, цифрами позначені номери гібридів у табл. 2.1, А – Ніконія, Б – гібрид F1, В – Авротіка, Г – Аврора.

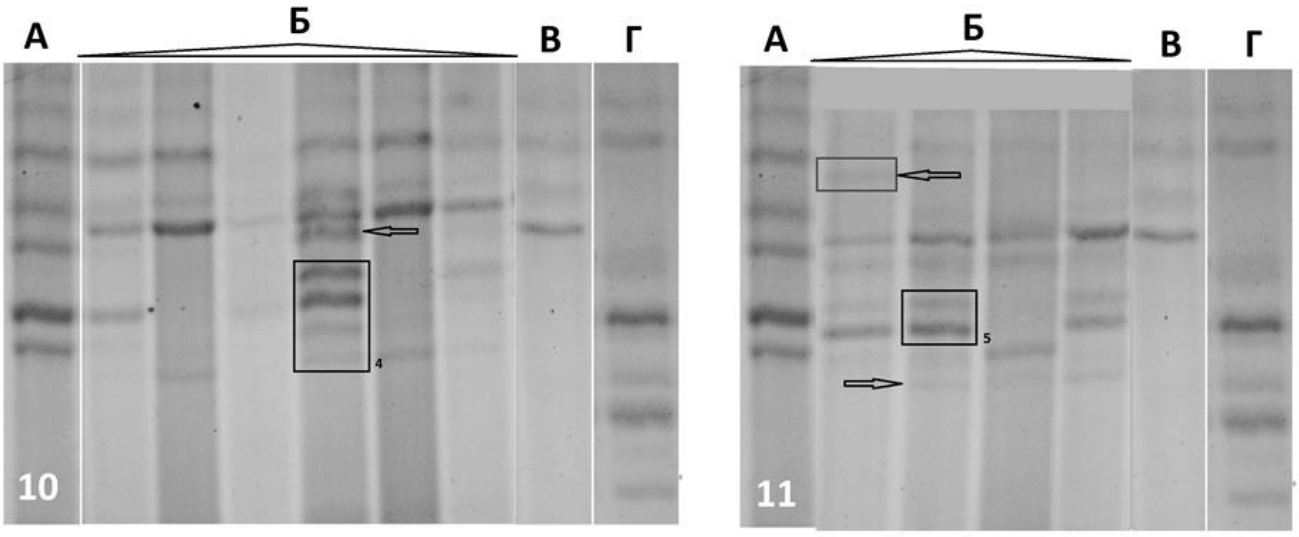


Рис. 3.4. ω-зони електорофоретичних спектрів гліадинів з високим рівнем внутрішньогенераційної поліморфності: стрілочками показані поліморфні компоненти, рамками позначені комплекси поліморфних компонентів, цифрами позначені номери гібридів у табл. 2.1, А – Панна, Б – гібрид F1, В – Авротіка, Г – Аврора.

Високий рівень внутрішньогенераційної поліморфності може свідчити про те, що геном лінії є не до кінця стабільним. Через це під час проходження мейозу хромосоми можуть розходитися неправильно та формувати гамети з різними частинами геному, які при злитті формують поліморфність всередині однієї генерації. Важливу роль в утворенні нестабільності геному відіграє кількість інтрогресованого матеріалу, та його локалізація в геномі [29,34,37,38].

Низькому рівню поліморфності відповідають зони спектру з кількістю поліморфізмів до двох, цьому рівню відповідають гібриди № 2, 7 (див. табл. 2.1), спектри чиїх ω-зон представлені на рис. 3.5 .

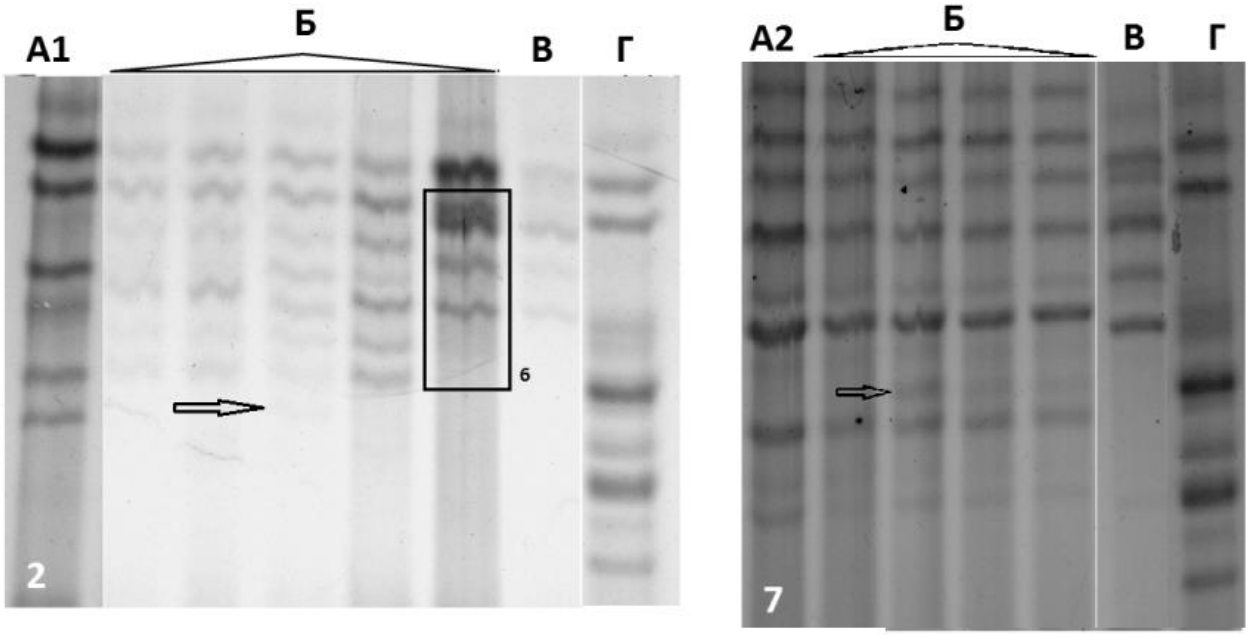


Рис. 3.5. ω-зони електорофоретичних спектрів гліадинів з низьким рівнем внутрішньогенераційної поліморфності: стрілочками показані поліморфні компоненти, рамками позначені комплекси поліморфних компонентів, цифрами позначені номери гібридів у табл. 2.1, А1 – Лелека, А2 – Вдала, Б – гібрид F1, В – Авротіка, Г – Аврора.

Також наявні спектри гібридів, що є однорідними, наприклад № 3, 8, 9 (див. табл. 2.1).

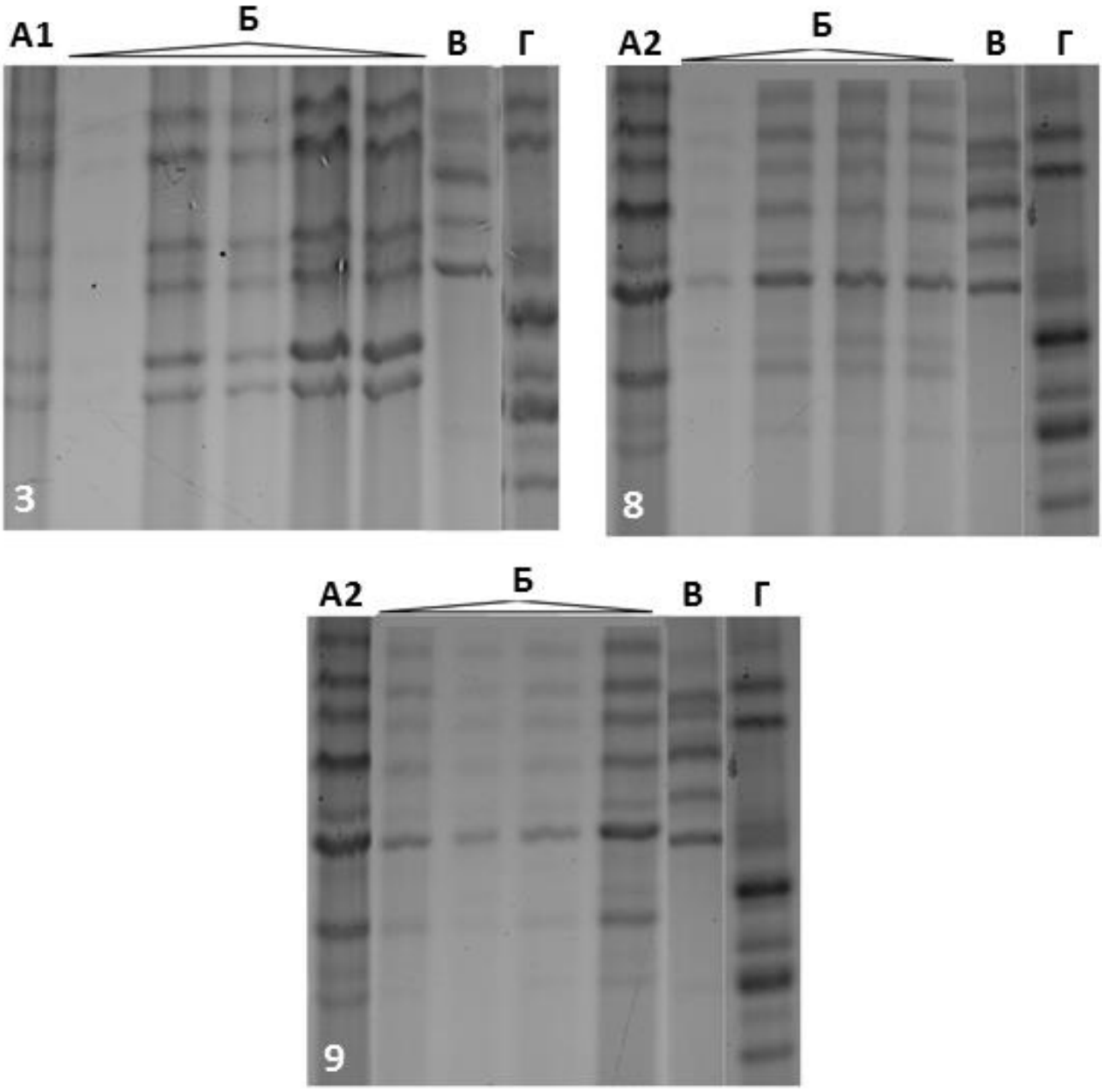


Рис. 3.6. ω-зони електорофоретичних гліадинових спектрів гібридів, однорідних за фенотипним проявом: цифрами позначені номери гібридів у табл. 2.1, А1 – Лелека, А2 – Вдала, Б – гібрид F1, В – Авротіка, Г – Аврора.

Гліадинові спектри ω-зон гібридів № 3 та №9 (рис. 3.6), див. табл. 2.1, повністю відповідають материнському сорту м’якої пшениці, що може свідчити про відсутність внесення генетичного матеріалу лінії до геному гібридів. Однією з розповсюджених причин стерильності гамет є

неправильне розходження хромосом, при мейозі. Власне, розходження хромосом залежить від участі систем контролю кон’югації та степені синапса. Також грає роль взаємодія цих параметрів, таким чином у гібридів одного геномного складу але різних комбінацій схрещування можуть спостерігатися поліморфізми. Таким чином навіть від схрещування різних особин одного геномного складу можна отримати високу різноманітність гібридів, що, можливо, і стало однією з причин високої внутрішньогенераційної поліморфності у гібридів на рис. 3.2 - 3.4 [29,34,37,38].

3.2. Внутрішньогенераційна мінливість γ, β, та α-зон гліадинового спектру

Поліморфність γ, β, та α-зон спектру спостерігалася не значна (рис. 3.7 - 3.10,).

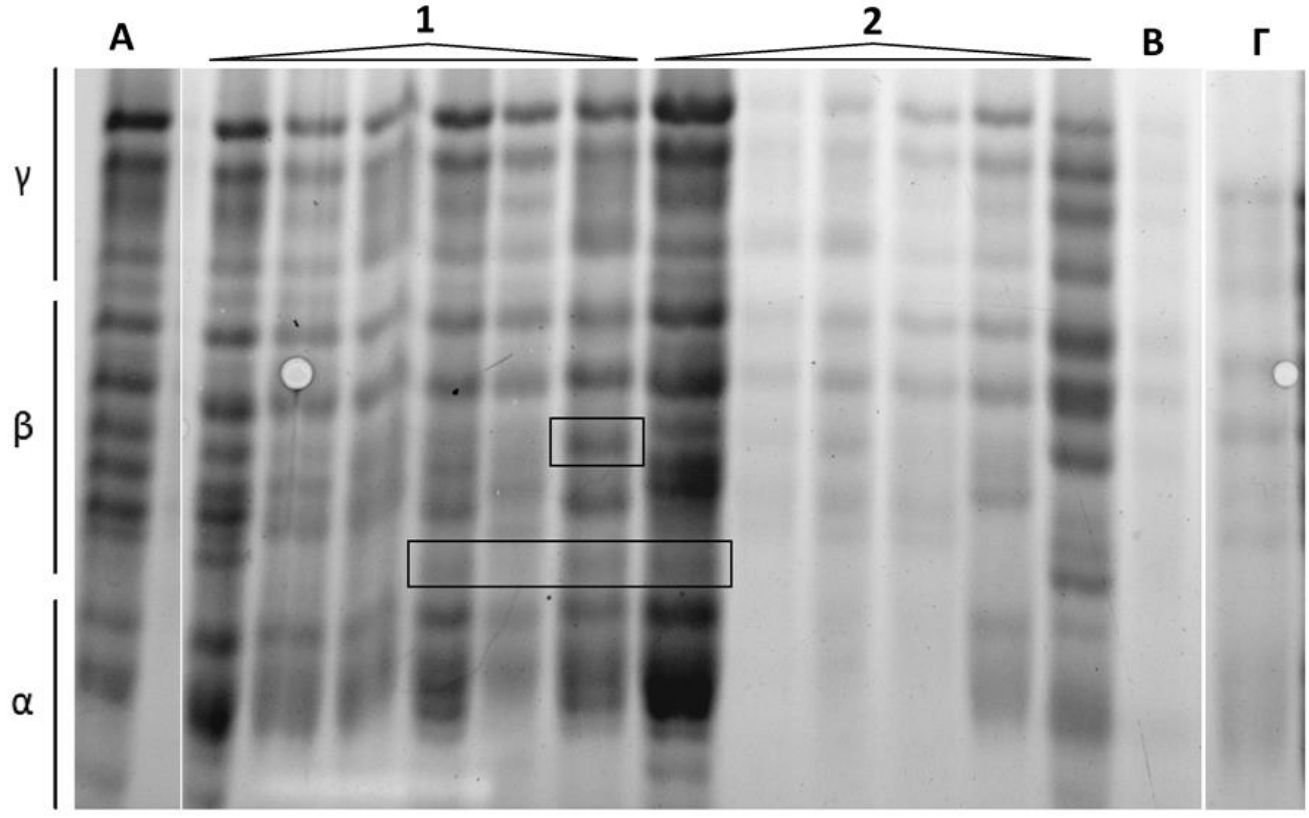


Рис. 3.7. γ, β, та α-зони гліадинового спектру гібридів № 1 та 2: грецькими літерами позначено зони спектру, рамками позначені комплекси поліморфних компонентів, цифрами позначені номери гібридів у табл. 2.1, А – Лелека, В – Авротіка, Г – Аврора.

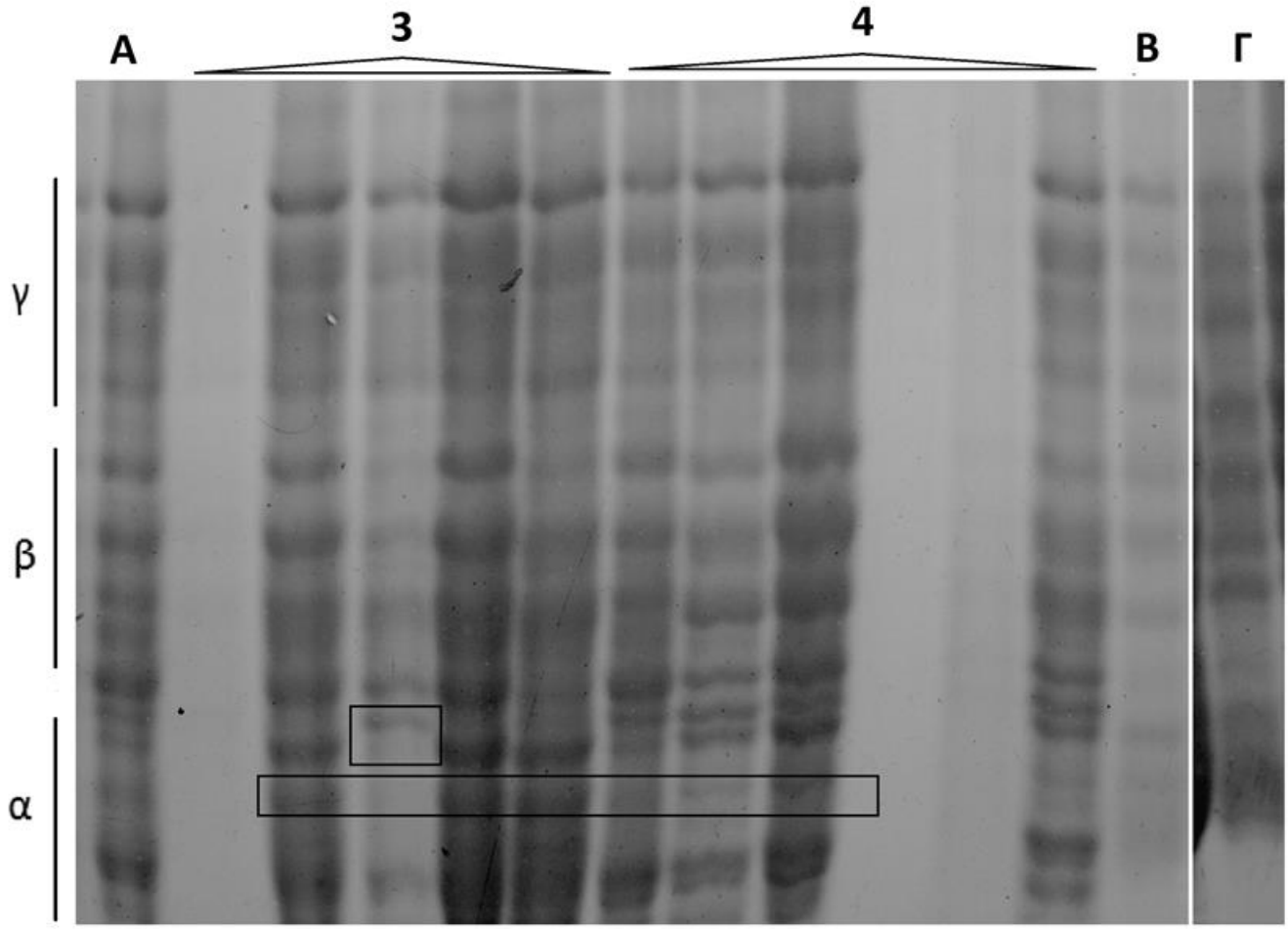


Рис. 3.8. γ, β, та α-зони гліадинового спектру гібридів № 3 та 4: грецькими літерами позначено зони спектру, рамками позначені комплекси поліморфних компонентів, цифрами позначені номери гібридів у табл. 2.1, А – Лелека, В – Авротіка, Г – Аврора.

На рис. 3.8 показано, що внутрішньогенераційна поліморфність наявна в β, та α-зоні гібриду №3, зоча в ω-зоні внутрішньогенераційна поліморфність – не виявлена.

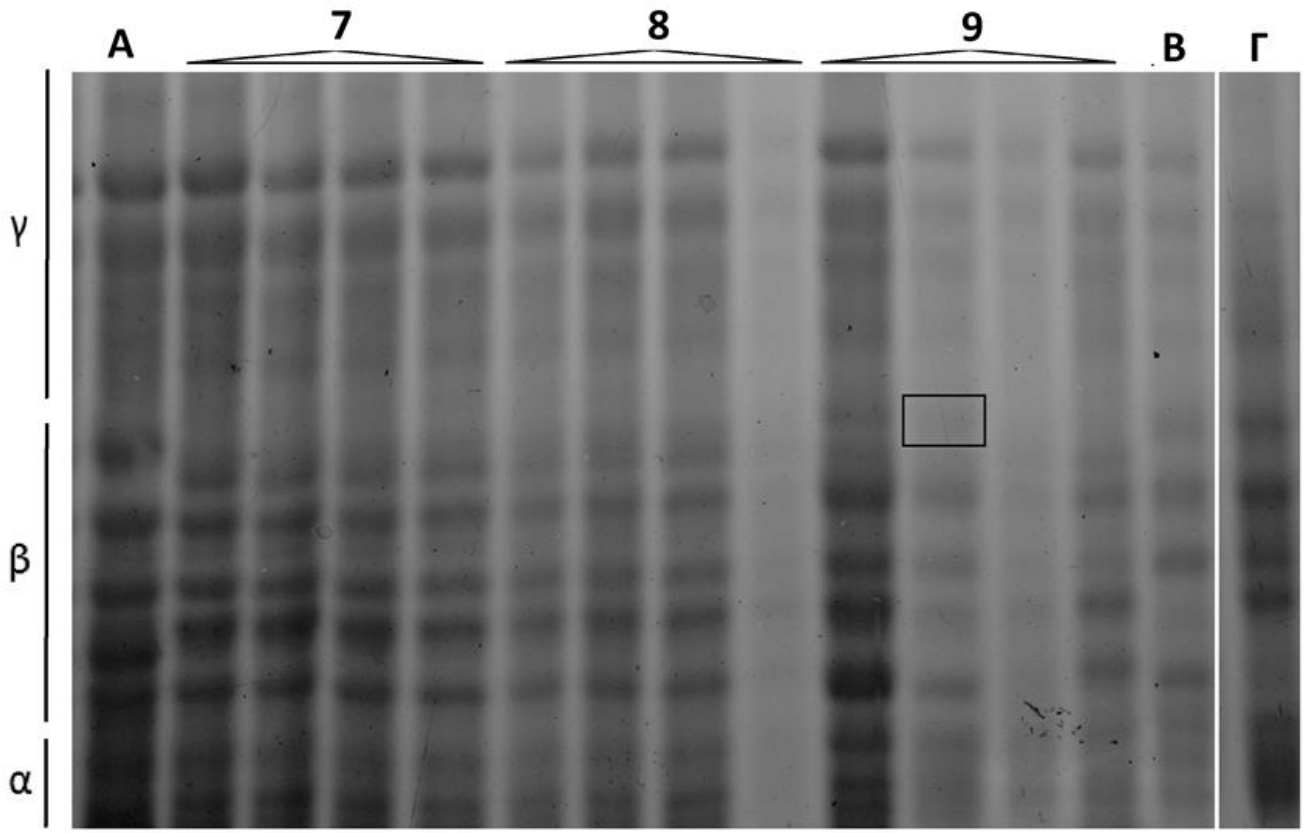


Рис. 3.9. γ, β, та α-зони гліадинового спектру гібридів № 7; 8 та 9: грецькими літерами позначено зони спектру, рамками позначені комплекси поліморфних компонентів, цифрами позначені номери гібридів у табл. 2.1, А – Вдала, В – Авротіка, Г – Аврора.

На рис 3.9 показано, що внутрішньогенераційна поліморфність наявна в β-зоні гібриду №9, зоча в ω-зоні внутрішньогенераційна поліморфність – не виявлена. У той час коли гібрид №7 поліморфний в ω-зоні, а гібрид №8 – є однорідним за всіма зонами.

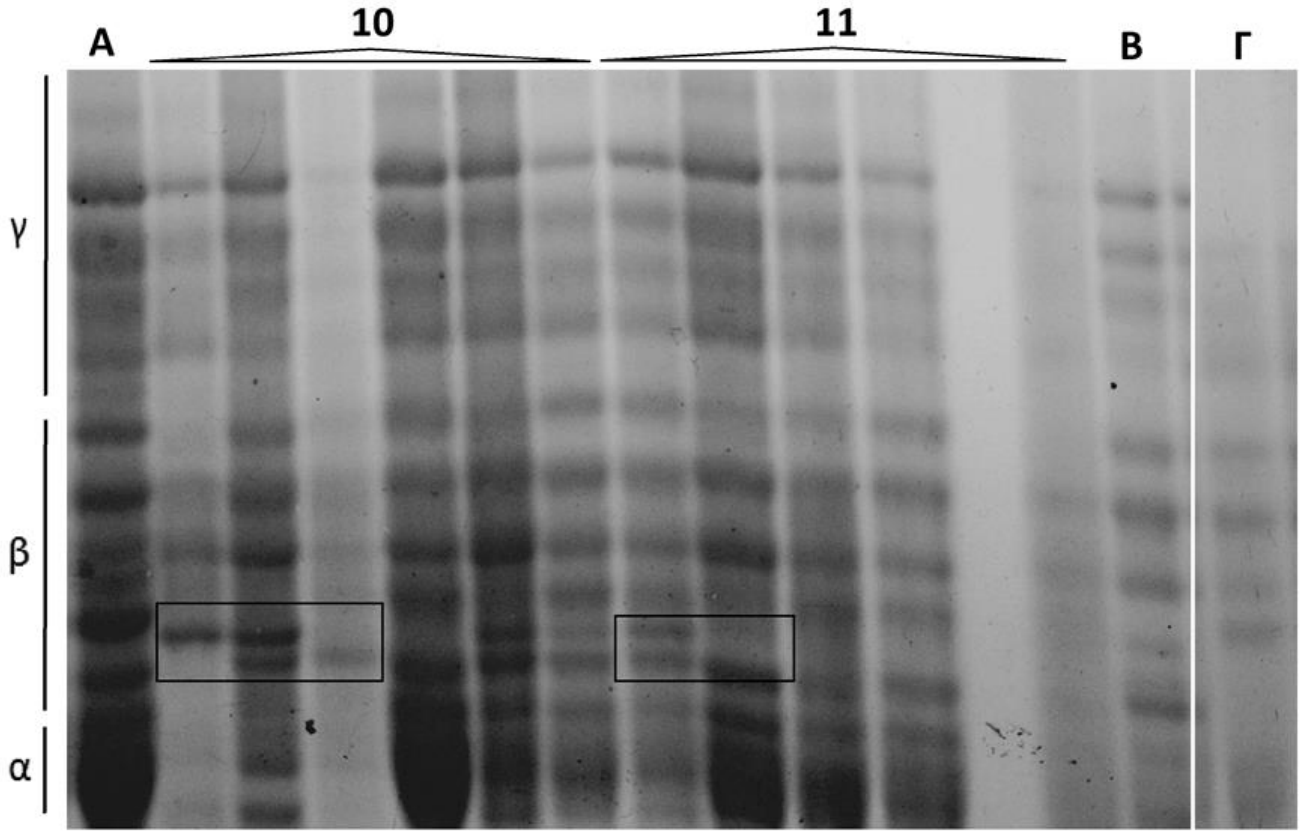


Рис. 3.10. γ, β, та α-зони гліадинового спектру гібридів № 10 та 11: грецькими літерами позначено зони спектру, рамками позначені комплекси поліморфних компонентів, цифрами позначені номери гібридів у табл. 2.1, А – Панна, В – Авротіка, Г – Аврора.

Також цікаво, що переважна кількість внутрішньогенераційних поліморфізмів, серед γ, β, та α-зон (рис 3.7 – 3.10), належить саме β-зоні.

Поліморфні компоненти спектрів, що не відносяться до жодної з батьківських особин зареєстровані не були. Це може свідчити про низький рівень точкових мутацій та/або активності транспозонів [8,39].

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Отже, у ході дослідження були отримані як спектри гібридів, що є однорідними за фенотипним проявом, так і спектри багаті на внутрішньогенераційні поліморфізми (табл. 3.1). Можливою причиною даного розходження може слугувати нестабільність геному, що може призводити до неправильного розходження хромосом з утворенням як різних частин геному, в кожній гаметі, так і до утворення стерильних гамет. У першому випадку можуть утворюватися гібриди з високою кількістю поліморфізмів в середині одної генерації. У другому випадку можуть утворюватися гібриди, ідентичні до материнської особини. Також, одним з наслідків генетичної нестабільності може бути підвищена активність транспозонів, що, в свою чергу, може спричинити внутрішньогенераційні поліморфізми. Однак це тільки припущення [9,27,29,39].

Таблиця 3.1

Рівень внутрішньогенераційної поліморфності досліджуваних гібридів

Рівень внутрішньогенераційної поліморфності	**№ гібридів (відповідно до табл. 2.1)**
Високий	1, 4, 5, 6, 10, 11
Низький	2, 3, 7, 9
Внутрішньогенераційна поліморфність відсутня	8

За літературними даними генетична нестабільність інтрогресивних ліній є дуже розповсюдженою. Часто, на перший погляд, інтрогресивна лінія може здаватися стабільною, але через певну кількість поколінь можуть вищеплятися ознаки, притаманні джерелу інтрогресованого матеріалу. Крім цього загальна поліморфність таких ліній, зокрема в кластерах гліадинів, може підвищуватися. Можливою причиною даного феномену можуть слугувати транспозони, чия активність може бути спровокована будь-яким

стресом. У цьому випадку найбільший вплив, на гліадиновий кластер, транспозони справляють у частинах генів, що кодують повторювані, багаті на глутамін, домени. Таким чином, вплив транспозонів на регуляцію експресії генів, зокрема через мікро-РНК, може спричиняти внутрішньогенераційну мінлиність [27,37,39].

Іншою можливо причиною розходження може бути наявність у ТТ геномі Авротіки, внесеному від *Aegilops mutica*, репресора Ph-системи, подібного до такого у *Aegilops speltoides.* Як відомо, Ph-система забезпечує видоспецифічне схрещування у пшениці, а отже її репресія дозволяє кон'югацію та рекомбінацію між гомеологічними хромосомами, а не тільки гомологічними. Таким чином, при наявності репресорів Ph-системи у ТТ геномі *Aegilops mutica*, можлива сильніша рекомбінація, у геномах гібридів, а отже вищий рівень внутрішньогенераційної поліморфності. Крім цього, дози геномів ендосперму а також, можливі системи репресії чужинних геномів, також є факторами, які здатні впливати на поліморфність гібридів [39,40].

Проведене дослідження, також, подемонструвало внутрішньогенераційну поліморфність гібридів № 3 та 9 в α- чи β-зонах, хоча в ω-зоні вони були однорідні. Та зворотній випадок у гібридів № 4 та 7, які були поліморфні в ω-зоні, але в інших зонах – однорідні. Оскільки ω- та, переважно, γ-гліадини кодуються хромосомами групи 1, а β- та α-гліадини кодуються хромосомами групи 6, можна припустити наявність нерівномірно ї рекомбінації між різними групами хромосом [7,22,25].

Як вже було вказано, тракти генів , що кодують повторювані домени, є мікросателітними послідовностями які можуть спричиняти проходження нерівного кросинговеру та проковзування полімерази при реплікації геному. Через це можуть формуватися нерівні гамети, що в свою чергу може призвести до виникнення поліморфності всередині однієї генерації [27,39].

ВИСНОВКИ

1) Визначено, що поміж досліджених гібридів F_1 наявні однорідні, за фенотипним проявом, гібриди з низьким рівнем внутрішньогенераційної поліморфності, і багаті на внутрішньогенераційні поліморфізми.

2) Можливою причиною даної розбіжності млже бути: генетична нестабільність інтрогресивних ліній; можлива наявність репресора Ph-системи в ТТ геномі Авротіки; репресія батьківського геному, чи розбіжність в дозі геномів ендосперму; мутаційні процеси в повторюваних доменах; активність транспозонів, тощо.

3) Високий рівень поліморфізмів яскраво виражений в ω-зоні гліадинового спектру, тоді як в ɣ, β та α-зонах поліморфність незначна, причиною чого може слугувати різниця в генетичній структурі різних типів гліадинів, та різна кількість компонентів в електрофоретичному спектрі.

4) Компоненти спектру гібридів, що не відносяться до батьківських спектрів – відсутні. Це може свідчити про низький рівень мінливості у їхніх геномах.

5) Серед досліджуваних гібридів наявні такі, внутрішньогенераційна поліморфність яких представлена або тільки в ω-зоні спектру, або лише в α- чи β-зонах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Di Sabatino A, Corazza GR. Coeliac disease. Lancet [Internet]. 2009;373(9673):1480–93. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60254-3
2. Sahli L, Renard D, Solé-Jamault V, Giuliani A, Boire A. Role of protein conformation and weak interactions on γ-gliadin liquid-liquid phase separation. Sci Rep. 2019;9(1):1–13.
3. Shewry PR, Tatham AS. The Characteristics, Structures and Evolutionary Relationships of Prolamins. Seed Proteins. 1999;(1819):11–33.
4. Shewry PR, Tatham AS, Halford NG. The Prolamins of the Triticeae. Seed Proteins. 1999;35–78.
5. Ruiz M. Relationships between different prolamin proteins and some quality properties in durum wheat. 1995;44:40–5.
6. Sturgess R, Day P, Ellis H, Kontakou M, Ciclitira P, Lundin KE, et al. Wheat peptide challenge in coeliac disease. Lancet. 1994;758–61.
7. Shewry PR, Halford NG, Lafiandra D. Genetics of Wheat Gluten Proteins. Adv Genet. 2003;49:111–84.
8. Антонюк МЗ. Інтрогресія як індуктор мінливості геному пшениці Triticum aestivum L. (зміст-2. Vol. 53, Journal of Chemical Information and Modeling. 2019. 547 p.
9. Leonova IN, Orlovskaya OA, Röder MS, Nesterov MA, Budashkina EB. Molecular diversity of common wheat introgression lines (T. aestivum/T. timopheevii). Russ J Genet Appl Res. 2015;5(3):191–7.
10. Панин ВМ. Глиадины как генетические маркеры в генетике и селекции озимой твёрдой пшеницы. J Chem Inf Model. 2019;53(9):1689–99.
11. Wieser H. Chemistry of gluten proteins. Food Microbiol. 2007;24(2):115–9.
12. Šramková Z, Gregová E, Šturdík E. Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. Acta Chim Slovaca. 2009;2(1):115–38.

13. Khan K, Shewry PR. Wheat chemsitry and technology. Vol. 53, Journal of Chemical Information and Modeling. 2019. 1689–1699 p.
14. Anderson OD, Gu YQ, Kong X, Lazo GR, Wu J. The wheat ω-gliadin genes: Structure and EST analysis. Funct Integr Genomics. 2009;9(3):397–410.
15. Shewry PR, Tatham AS. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. Biochem J. 1990;267(1):1–12.
16. Yong QG, Crossman C, Kong X, Luo M, You FM, Coleman-Derr D, et al. Genomic organization of the complex α-gliadin gene loci in wheat. Theor Appl Genet. 2004;109(3):648–57.
17. Hassani ME, Shariflou MR, Gianibelli MC, Sharp PJ. Characterisation of a ω-gliadin gene in Triticum tauschii. J Cereal Sci. 2008;47(1):59–67.
18. Hsia CC, Anderson OD. Isolation and characterization of wheat ω-gliadin genes. Theor Appl Genet. 2001;103(1):37–44.
19. Anderson OD, Dong L, Huo N, Gu YQ. A New Class of Wheat Gliadin Genes and Proteins. PLoS One. 2012;7(12):1–9.
20. Pogna NE, Metakovsky E V, Redaelli R, Dachkevitch T. Recombination mapping of Gli-5, a new gliadin-coding locus on chromosomes 1A and 1B in common wheat. Springer - Verlag. 1993;113–21.
21. Rafalski JA. Structure of wheat gamma-gliadin genes. Gene. 1986;43(3):221–9.
22. Sabelli PA, Shewry PR. Characterization and organization of gene families at the Gli-1 loci of bread and durum wheats by restriction fragment analysis. Theor Appl Genet. 1991;83(2):209–16.
23. Rodrigo L, Giménez MJ, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Barro F. Wheat Varieties Suitable for Celiac Patients. Celiac Dis Non-Celiac Gluten Sensit. 2014;(June 2015):461–75.
24. Huo N, Zhu T, Altenbach S, Dong L, Wang Y, Mohr T, et al. Dynamic Evolution of α-Gliadin Prolamin Gene Family in Homeologous Genomes of Hexaploid Wheat. Sci Rep [Internet]. 2018;8(1):1–13. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-23570-5

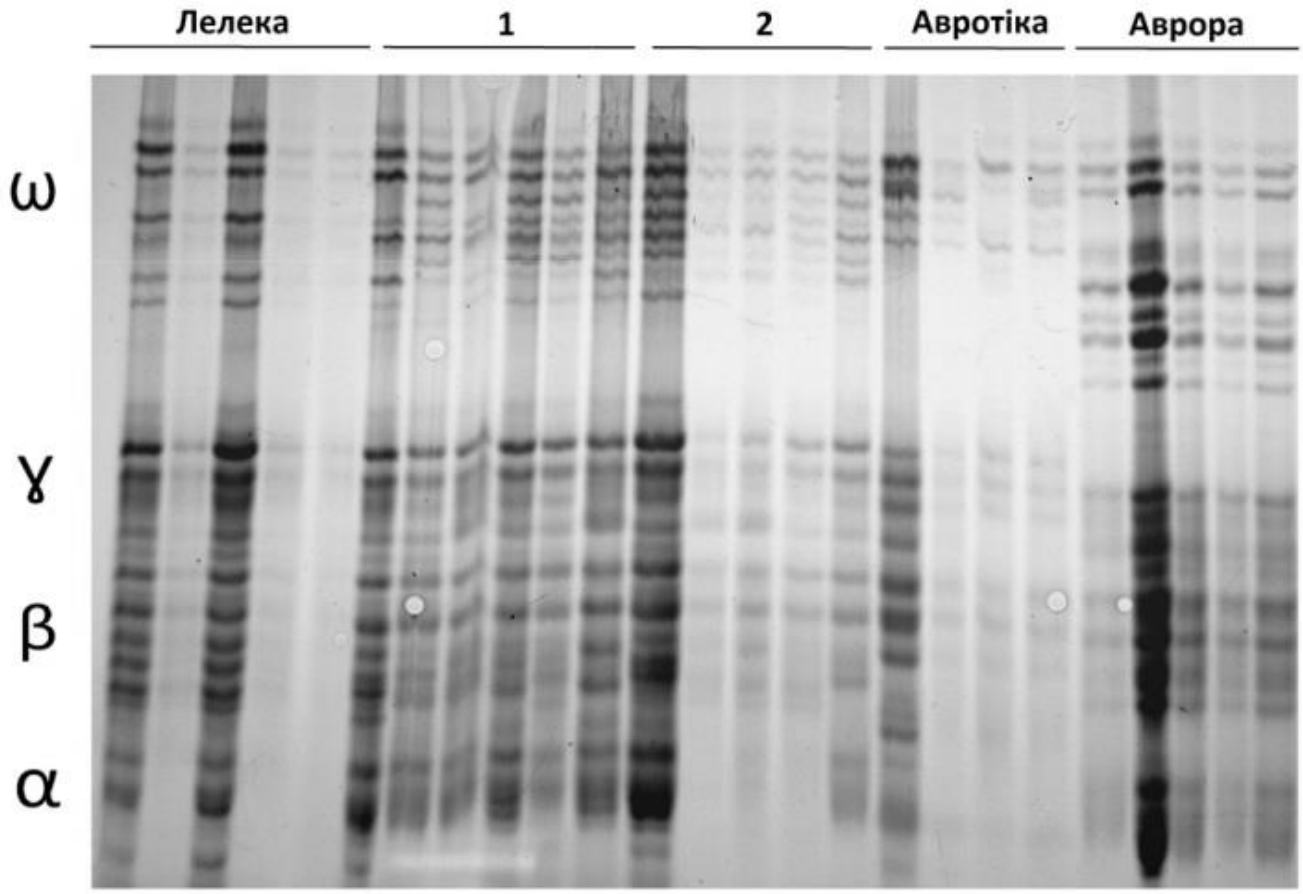
25. Mecham DK, Kasarda DD, Qualset CO. Genetic aspects of wheat gliadin proteins. Biochem Genet. 1978;16(7–8):831–53.
26. Qi PF, Wei YM, Yue YW, Yan ZH, Zheng YL. Biochemical and Molecular Characterization of Gliadins *. Mol Biol. 2006;40(5):713–23.
27. Михайлик СЮ, Мартиненко ВС, Антонюк МЗ. Варіабельність внутрішньогенних мікросателітних повторів генів α- , β- та ω-гліадинів в інтрогесивних лініях пшениці. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016;19:33–7.
28. Wulft BBH, Moscou MJ. Strategies for transferring resistance into wheat: From wide crosses to GM cassettes. Front Plant Sci. 2014;5(DEC):1–11.
29. Khlebova LP, Barysheva NV. Cytogenetic features of durum wheat introgressive lines. Acta Biol Sib. 2015;1908(2412–1908):160–70.
30. Sears ER. Genetic Control of Chromosome Pairing in Wheat. Annu Rev Genet. 1976;10(1):31–51.
31. Терновська ТК. Перестройка генома мягкой пшеници для ее генетического анализа и интрогрессии генов. Київ; 1999.
32. Ceoloni C, Dole J, Biology M. Alien Introgression in Wheat. 2015. 213–226 p.
33. Molnár-Láng M, Ceoloni C, Doležel J. Alien introgression in wheat: Cytogenetics, molecular biology, and genomics. Alien Introgression Wheat Cytogenet Mol Biol Genomics. 2015;1–385.
34. Schoenenberger N, Felber F, Savova-Bianchi D, Guadagnuolo R. Introgression of wheat DNA markers from A, B and D genomes in early generation progeny of Aegilops cylindrica Host x Triticum aestivum L. hybrids. Theor Appl Genet. 2005;111(7):1338–46.
35. Ceoloni C, Kuzmanović L, Ruggeri R, Rossini F, Forte P, Cuccurullo A, et al. Harnessing genetic diversity of wild gene pools to enhance wheat crop production and sustainability: Challenges and opportunities. Diversity. 2017;9(4).
36. Антонюк М., Єфіменко ТС, Терновська ТК. Мінливість у послідовності

гена GLU1 у популяціях пирію середнього як можлива адаптивна ознака. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2018;3826:96–101.

37. Антонюк МЗ, Шпильчин ВВ, Терновська ТК. Перманентна генетична мінливість у інтрогресивних лініях та амфідиплоїдах. Цитологія та генетика. 2013;4(0564–3783):58–68.
38. Орловская ОА, Леонова ИН, Салина ЕА, Хотылева ЛВ. Особенности поведения хромосом в мейозе у линий мягкой пшеницы с интрогрессией генетического материала тетраплоидных видов рода Triticum. Генетические основы эволюции систем. 2015;16–25.
39. Михайлик СЮ, Антонюк МЗ, Терновська ТК. Генетична варіабельність інтрогресивних ліній м’якої пшениці за генами Gli. Наукові Записки Наукма Біологія Та Екологія. 2011;Т. 119:С. 8-14.
40. Iefimenko TS, Fedak YG, Antonyuk MZ, Ternovska TK. Microsatellite analysis of chromosomes from the fifth homoeologous group in the introgressive Triticum aestivum/Amblyopyrum muticum wheat lines. Cytol Genet. 2015;49(3):183–91.

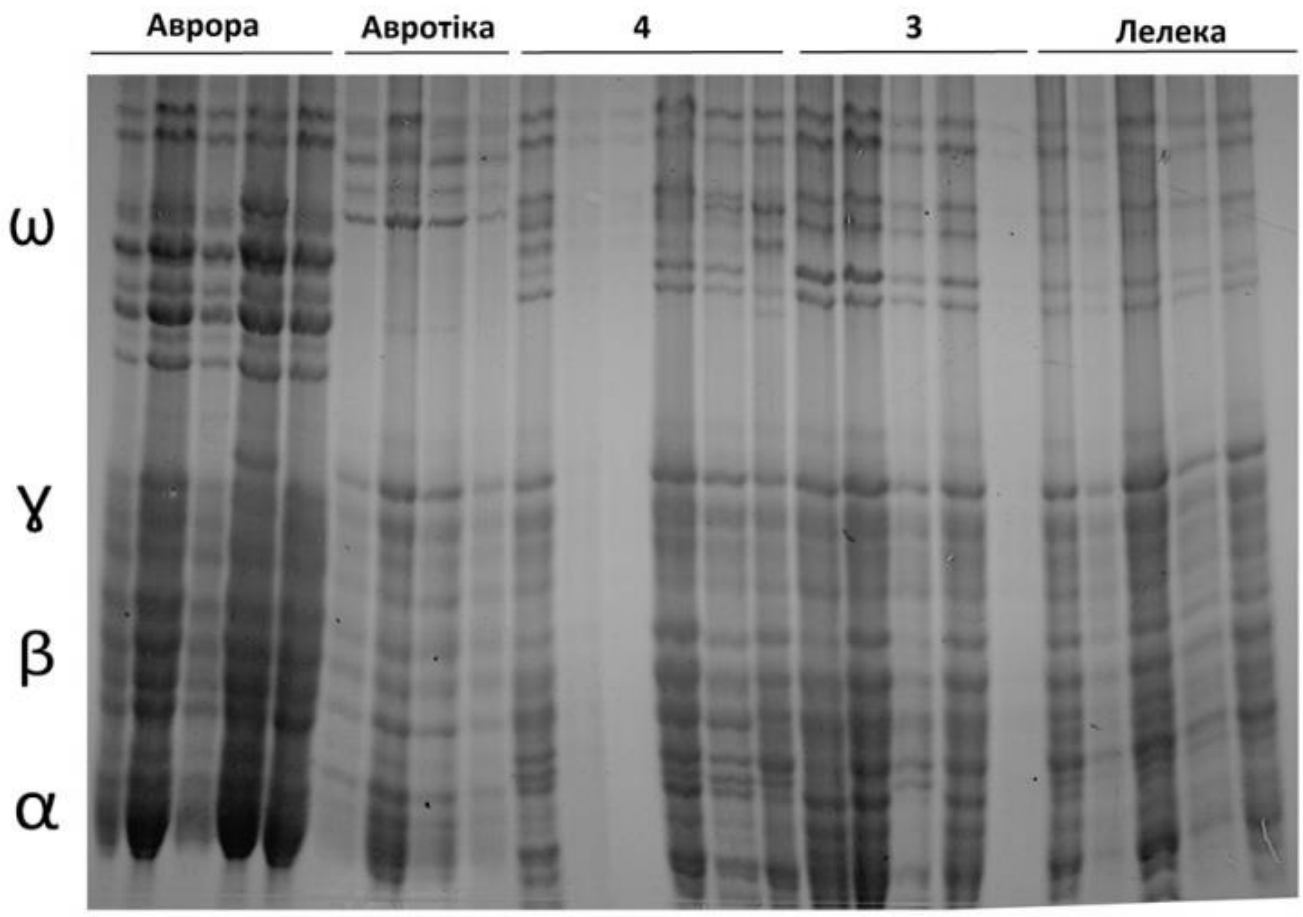
Додаток 1

(*фотографії отриманих електрофоретичних спектрів*)



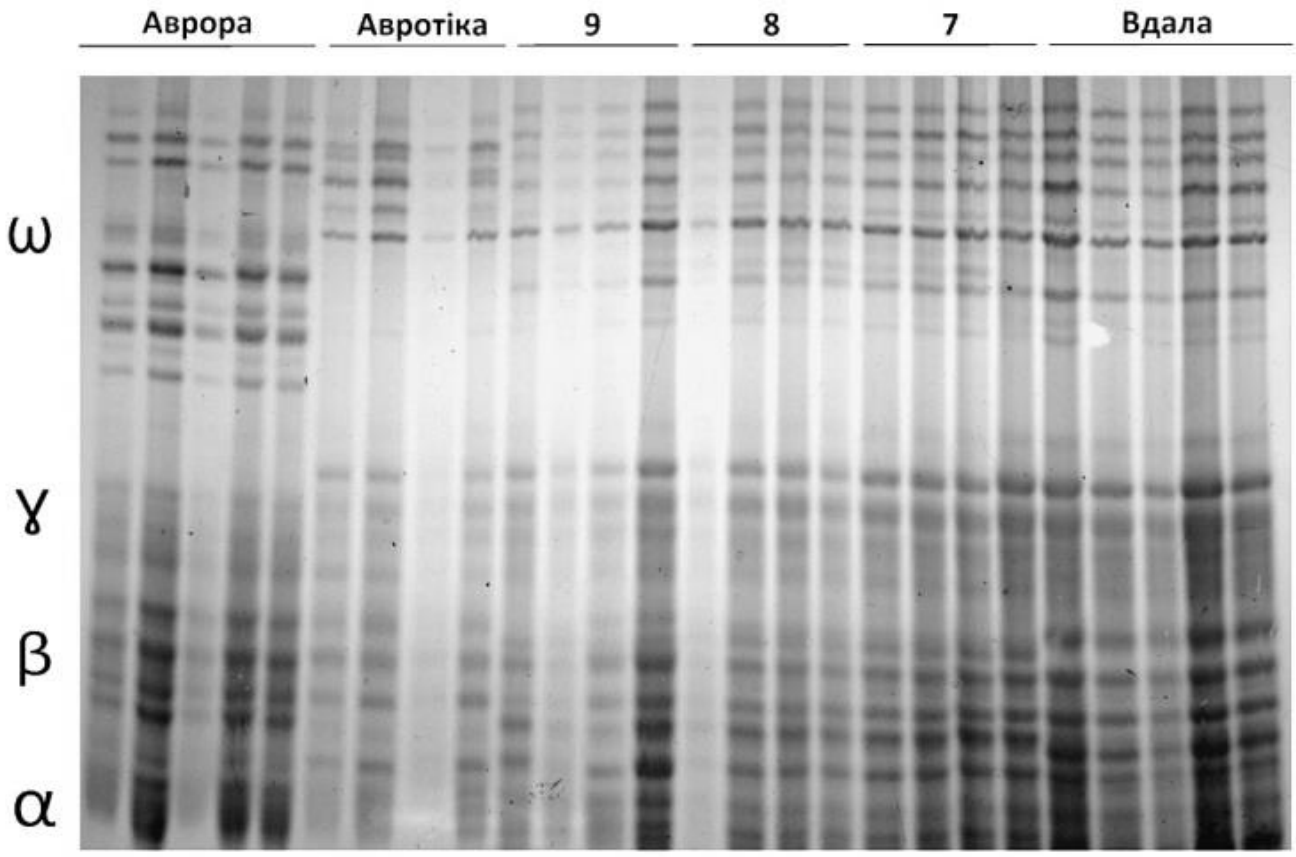
Грецькими літерами виділено зони гліадинів; номери з 1 по 11 – номери гібридів (див. табл 2.1).

Продовження додатку 1



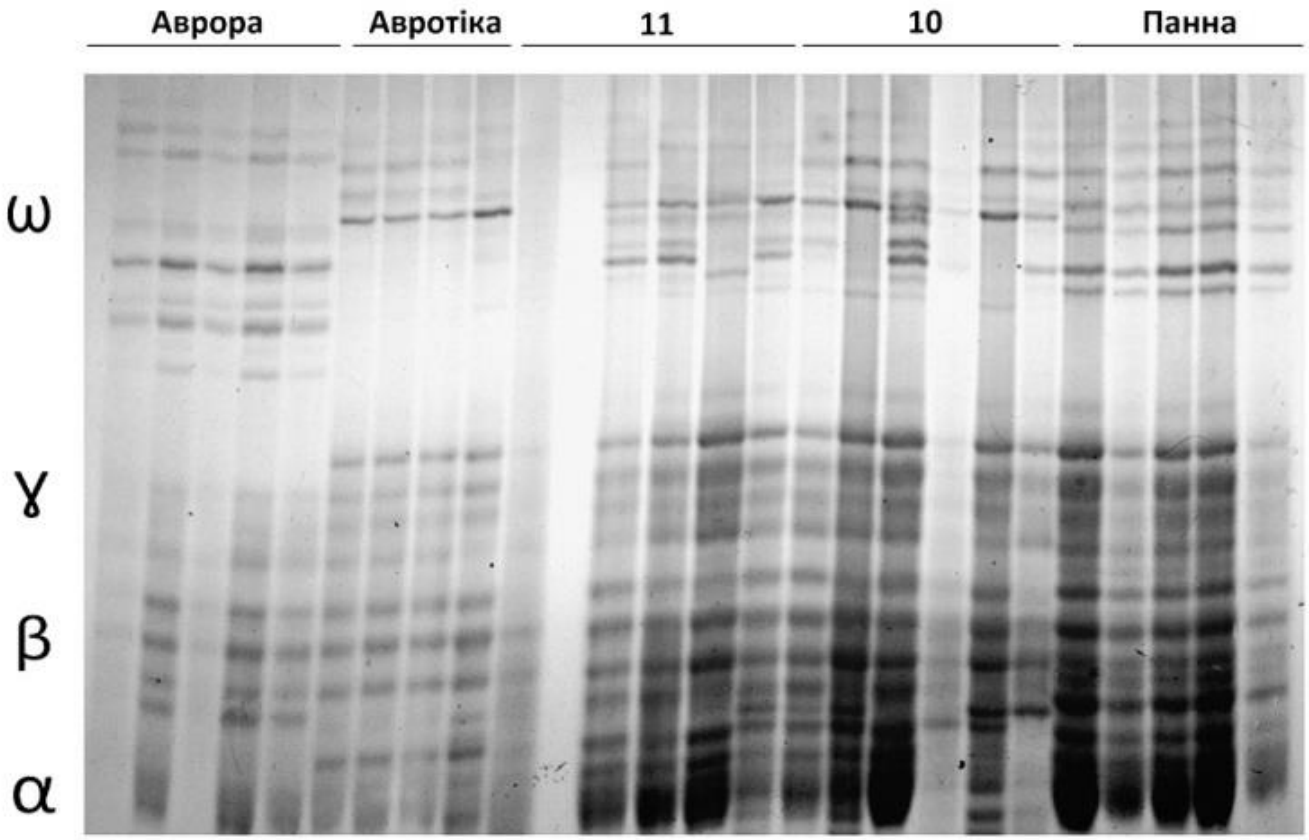
Грецькими літерами виділено зони гліадинів; номери з 1 по 11 – номери гібридів (див. табл 2.1).

Продовження додатку 1



Грецькими літерами виділено зони гліадинів; номери з 1 по 11 – номери гібридів (див. табл 2.1).

Продовження додатку 1



Грецькими літерами виділено зони гліадинів; номери з 1 по 11 – номери гібридів (див. табл 2.1).