

Єфіменко Т. С., Мартиненко В. С., Терновська Т. К.

ВПЛИВ УМОВ ЗАГАРТОВУВАННЯ НА ЗИМОСТІЙКІСТЬ ПШЕНИЧНИХ ЛІНІЙ З ІНТРОГРЕСІЯМИ ВІД АМФІДИПЛОЇДА АВРОТІКА

Геномно-заміщений амфідиплоїд Авротіка та створені з його залученням інтрогресивні лінії пшениці м'якої мають підвищену зимостійкість. Певну роль у забезпеченні цієї властивості відіграє ген *TaAGL21*, який контролює *MADS*-бокс ТФ з функцією контролю транспорту ауксину в корені. Мета роботи полягає у визначенні впливу цього ТФ за різних умов загартовування рослин на архітектуру коренів. Порівняльне вивчення амфідиплоїда, сортів пшениці м'якої та її інтрогресивних ліній показало, що алейноспецифічний вплив гена *TaAGL21* на архітектуру кореневої системи залежить від умов загартовування пшеничних рослин на стадії онтогенезу, що передує куцінню. Без природного загартовування низькими температурами на цій онтогенетичній стадії вплив специфічного алеля гена *TaAGL21* на ознаки кореневої системи, якими визначається його архітектоніка, не спостерігається.

Ключові слова: амфідиплоїд Авротіка, інтрогресивні лінії, *Aegilops mutica* (*Amblyopyrum muticum*), коренева система, зимостійкість, ауксин, ген *TaAGL21*.

Серед небагатьох озимих культур, які мають вирішальне значення для забезпечення населення продуктами рослинного походження, – пшениця м'яка, яка забезпечує 30 % світового виробництва зерна. Як озима рослина вона зазнає впливу несприятливих умов довкілля взимку, що негативно відбивається на її урожайності. Стійкість рослин пшениці до зимових умов визначається низкою ознак фізіології та морфології, серед останніх часто називають будову кореневої системи [1]. Особливості будови кореневої системи є, звісно, генетично зумовленою характеристикою. Тому актуальним є не лише визначити, які параметри архітектури кореневої системи мають позитивний вплив на здатність рослин зимувати успішно, а й встановити, які гени беруть участь у формуванні таких ознак.

Відомо, що комерційні сорти пшениці поступаються зимо- та морозостійкістю своїм дикорослим родичам, що зростають у набагато менш комфортних умовах щодо характеристик ґрунту. Можливо, серед них є такі, що можуть слугувати джерелом генів, які позитивно вплинуть на зимостійкість пшениці. Зокрема, високу зимостійкість, за багато років спостережень, має амфідиплоїд Авротіка, до складу геному якого входить геном диплоїдного дикорослого злаку *Aegilops mutica* Boissier (*Amblyopyrum muticum*) (AABBTT, $2n = 42$, субгеном Т від *Aegilops mutica*), ендеміка Вірменії та Центральної Туреччини [2]. Субгеноми А та В Авротіки

є тетракомпонентом AABB геному пшениці м'якої сорту Аврора. Досліджені нами інтрогресивні лінії пшениці *Triticum aestivum* / *Ae. mutica* походять від схрещування Аврори та Авротіки з наступним самозапиленням [4]. Серед сукупності цих ліній було виявлено групу ліній з більш розвинутою кореневою системою у порівнянні з такою ж сорту Аврора [5].

Ауксин є одним з основних фітогормонів, що контролює розвиток кореневої системи рослин. Транскрипційний фактор з *MADS*-бокс доменом, що кодується геном *AGL21*, є позитивним регулятором накопичення ауксину в сайтах ініціації розвитку бічних коренів. Саме ауксин стимулює як ініціацію, так і ріст бічних коренів [6,7]. Раніше ми показали наявність поліморфізму за алелями пшеничного ортолога цього гена для Авротіки та Аврори [8] і встановили, що інтрогресивні лінії *Triticum aestivum* / *Ae. mutica* з алелем *TaAGL21-2*, властивим Авротіці, краще зимують у польових умовах у порівнянні з лініями з алелем *TaAGL21-1*, яким характеризується Аврора. У статті наведено результати оцінки ліній, що відрізняються за алелями гена *TaAGL21*, за параметрами кореневої системи залежно від умов довкілля, в яких пройшла стадія онтогенезу від проростання насінин до куціння. Наведено дані, які показують, що наявність чи відсутність зв'язку між алелями гена *TaAGL21* та розвитком кореневої системи залежить від умов зростання рослин на стадії, яка передує куцінню.

Матеріали та методи

Як рослинний матеріал було використано генно-заміщений амфідиплоїд Авротіка, інтрогресивні лінії *Ae. aestivum* / *Ae. mutica*, сорти пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L., AABBDD, 2n = 42) Аврора, Панна, Ніконія. У дослідженні було отримано та вивчено рослини F₂ від схрещування інтрогресивних ліній з сортами пшениці м'якої, вирощені в польових умовах 2015–2016 рр. разом із лініями та компонентами ініціального схрещування. Рослини інтрогресивних ліній і компонентів ініціального схрещування вирощували в пакетах з ґрунтовою сумішшю в умовах світлової кімнати від проростання насіння до онтогенетичної стадії кушіння, коли розпочинали вимірювання ознак кореневої системи, обраних для вивчення раніше [5]: кількість осьових (тих, що пішли від первинних корінців) коренів, довжина найдовшого кореня (серед усіх, осьових і тих, що йдуть від вузла кушіння), об'єм рідини, яка витісняється під час занурення живої чистої кореневої системи в посудину з рідиною. Так визначали об'єм кореневої системи.

Всі досліджувані рослини характеризували за алелем гена *TaAGL21* методом ПЛР з праймерами до цього гена. ДНК для реакції виділяли з листків індивідуальних рослин методом з ЦТАБ буфером. Склад суміші для ПЛР: 250 нМ кожного праймера, 50 нг ДНК, по 0,2 мМ кожного дезоксинуклеотидтрифосфату, 1,5 мМ хлористого магнію, 1,2 одиниці Taq-полімерази (Fermentas, Литва) на 30 мкл. Ампліфікатор Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, проходження реакції за умов, рекомендованих виробником праймерів [9,10].

Середні арифметичні значення порівнювали за допомогою критерію Ст'юдента після доведення відповідності розподілу варіант ознак у кожній вибірці закону Гауса методом Шапіро–Уїлка. Порівняння емпіричних і теоретичних розподілів варіант за фенотипними класами здійснювали методом χ^2 та точним критерієм Фішера [11].

Результати та обговорення

Зимостійкість рослин інтрогресивних ліній, оцінена як кількість рослин, що перезимували, із 20 наявних у рядку восени у 2015–2016 рр., оцінювалась як $\bar{x} = 16,5 \pm 0,89$ для рослин із генотипом *TaAGL21-1* та $\bar{x} = 16,8 \pm 0,39$ для рослин із генотипом *TaAGL21-2*. Різниця статистично незначуща, $t_{\text{факт.}} = 0,31$, $t_{\text{табл.0,05}} = 2,0$. Водночас саме значуща різниця в кількості рослин, що перезимували, із двох зазначених генотипних груп

у зимовий період 2014–2015 рр. [8] привернула нашу увагу до гена *TaAGL21* як кандидата на роль критичного гена для підсилення зимостійкості рослин через вплив на формування кореневої системи. На нашу думку, це можна пояснити різними умовами зимівлі рослин у два зазначених періоди. Отже, зв'язок між виживаністю рослин узимку і алелем за геном *TaAGL21* не є однозначним. Він може опосередковуватися умовами загартовування та перебігу зимового періоду при вирощуванні рослин за польових умов.

Для перевірки припущення про залежність впливу алеля *TaAGL21-2* на зимостійкість використали рослини F₂ від схрещування одинадцяти інтрогресивних ліній *Ae. aestivum* / *Ae. mutica* із зазначеним алелем із декількома сортами пшениці м'якої. Генотип за геном *TaAGL21* визначали у рослин F₂, що зростали в полі після перезимівлі. Висівали на одну комбінацію схрещування по 20 рослин, їхню кількість після перезимівлі зазначено в табл. 1. Крім цього, генотипували паростки тих самих комбінацій схрещування, що виростили в чашках Петрі, з 10 насінин із кожної комбінації схрещування. У табл. 1 наведено результати визначення генотипу за *TaAGL21* для тих рослин із поля та паростків із чашок Петрі, для яких вдалось отримати результати ПЛР. Зрозуміло, що паростки з чашок Петрі, на відміну від рослин, які збереглися в полі після зимування, не зазнавали впливу зимових стресових факторів. Потрібно було порівняти кількість рослин із різними алелями за геном *TaAGL21* серед рослин, що росли в полі, та тих, що росли в чашці Петрі.

Перевірка за допомогою точного критерію Фішера на однорідність розподілів на групи рослин *TaAGL21-1* та *TaAGL21-2* в жодному випадку не виявила різниці для різних комбінацій схрещування. Для рослин із поля мінімальне значення $P = 0,20$ спостерігали при порівнянні найбільш різних розподілів у комбінаціях 21-4/8 x Аврора та 21-4/8 x Панна, і ця різниця не виявилася статистично значущою [11]. Отже, різниці не було виявлено при порівнянні всіх інших можливих сполучень комбінацій, і дані, перевірені на однорідність, були об'єднані. За об'єднаними даними, серед рослин, що росли в полі, 113 характеризувались алелем *TaAGL21-2* та 18 – алелем *TaAGL21-1*. Такий розподіл за фенотипними класами не відповідає очікуваному, відповідно, 98 та 33, для моногібридного розщеплення з домінуванням алеля *TaAGL21-2* над алелем *TaAGL21-1* ($\chi^2_{\text{факт.}} = 8,86$, $\chi^2_{\text{табл.0,01}} = 3,84$). Розглядається саме модель з домінуванням, тому що поодинокий компонент, що продукується останнім алелем, збігається за рухливістю з одним із компонентів

подвійного продукту ампліфікації з праймером до алеля *TaAGL21-2* [8]. І такий результат цілком можна тлумачити на користь припущення про селективну цінність алеля *TaAGL21-2* для збереження рослин, що зимували в полі.

Розподіли рослин, вирощених у чашках Петрі, на два фенотипні класи за геном *TaAGL21* також були перевірені на однорідність (мінімальна $P = 0,18$ при порівнянні максимально різних комбінацій 24-1/7 x Панна та 24-5/5 x Ніконія, всі інші значення P ще більші) і тоді об'єднані: 75 паростків з алелем *TaAGL21-2* та 19 з алелем *TaAGL21-1* статистично не відрізнялися від очікуваної кількості 71 та 23, відповідно ($\chi^2_{\text{факт.}} = 1,15$, $\chi^2_{\text{табл.0,01}} = 3,84$). Тобто серед рослин, які не зазнавали зимового стресу, зберігається очікувана частота альтернативних алелів 0,5, і жодної селективної переваги носії алеля *TaAGL21-2* не демонструють.

Щоб перевірити припущення про залежність селективної значущості алеля *TaAGL21-2* у порівнянні з алелем *TaAGL21-1* від умов зростання рослин, було повторено експеримент з вирощування рослин у пакетах у світловій кімнаті, виконаний у 2015 р. [5], але за інших умов. На відміну від першого експерименту, коли рослини проходили стадію загартовування за природних умов, на вулиці, у 2016 р. цієї стадії не було. Насінини висівали в пакет із ґрунтовою сумішшю, і рослини вирощували в них у кімнаті штучного клімату 2,5 місяці, після чого виміряли їхню кореневу систему. В описаних експериментах коренева система рослин формувалась геть за різних умов: за природного загартовування у 2015 р. та без нього у 2016 р. Прагнули зрозуміти, чи залежить селективна значущість алеля *TaAGL21-2* для формування кореневої системи від умов вирощування рослин під час її

формування. Як і в роботі [5], розраховали генотипні арифметичні середні значення для кожної лінії окремо (табл. 2). Для кожного року дослідження розраховали групове арифметичне середнє для всіх генотипів.

Всі ознаки, за якими порівнювали кореневу систему рослин, вирощених у світловій кімнаті з попереднім загартовуванням (2015 р.) та без загартовування (2016 р.), мали більше кількісне вираження у 2015 р., хоча для кількості коренів різниця не була статистично значущою (табл. 2). Групи рослин 2015 та 2016 рр. розділили на підгрупи за наявністю алеля *TaAGL21-1* чи *TaAGL21-2* і порівняли арифметичні середні для підгруп у межах кожної групи (табл. 3).

За жодною з трьох ознак кореневої системи не було статистично достовірної різниці між середніми значеннями, розрахованими окремо для рослин з алелем *TaAGL21-1* та рослин з алелем *TaAGL21-2*. На нашу думку, при таких маленьких вибірках, особливо маленька вибірка рослин з алелем *TaAGL21-1* – шість зразків, навіть якщо варіювання ознаки не виходить за межі, які визначаються законом Гауса, стандартні похибки можуть бути завеликі, що призводить до зменшення значення критерію Ст'юдента t . Проте в табл. 3 можна бачити цікаву тенденцію: абсолютне вираження ознак довжина кореня та кількість коренів для рослин з алелем *TaAGL21-1* більше без загартовування (2016 р.), а для рослин з алелем *TaAGL21-2* – із загартовуванням (2015 р.). За ознакою об'єм витісненої рідини без загартовування підгрупові середні значення практично однакові, тоді як за умов загартовування більше значення мають зразки – носії алеля *TaAGL21-2*. Ця візуальна тенденція примушує дослідити коливання нормованих відхилень середніх значень за генотипами в різні роки дослідження.

Таблиця 1. Результати генотипування рослин F_2 , вирощених у різних умовах, за геном *TaAGL21*

Назва рослин	Кількість рослин F_2 з різними алелями			
	серед тих, що росли в полі		серед тих, що росли в чашках Петрі	
	<i>TaAGL21-1</i>	<i>TaAGL21-2</i>	<i>TaAGL21-1</i>	<i>TaAGL21-2</i>
(24.3/6 x Аврора) F_2	3	9	1	7
(24.3/6 x Ніконія) F_2	2	7	2	7
(24.5/5 x Аврора) F_2	1	12	0	7
(24.5/5 x Ніконія) F_2	1	11	4	6
(21.4/8 x Аврора) F_2	0	8	2	3
(21.4/8 x Панна) F_2	3	5	1	9
(24.1/7 x Аврора) F_2	0	12	2	6
(24.1/7 x Панна) F_2	2	11	0	8
(24.4/2 x Аврора) F_2	1	12	2	7
(29.5/4 x Аврора) F_2	2	15	2	8
(29.5/4 x Ніконія) F_2	3	11	3	7

Таблиця 2. Генотипні арифметичні середні зі стандартними відхиленнями за ознаками кореневої системи рослин, вирощених у світловій кімнаті без стадії загартовування

Номер лінії (алель гена <i>TaAGL21</i>)	Максимальна довжина	Кількість коренів	Об'єм витісної рідини
1 (2)	21,7±4,53	6,17±0,58	0,09±0,04
2 (2)	26,7±4,96	7,18±1,33	0,11±0,06
3 (2)	27,1±8,40	7,08±1,68	0,14±0,10
4 (1)	28,4±7,09	8,83±1,75	0,15±0,05
5 (1)	29,8±8,12	9,92±1,56	0,16±0,08
6 (2)	23,1±5,27	8,00±1,18	0,10±0,04
7 (не визначено)	24,2±6,08	4,83±1,47	0,17±0,13
8 (2)	18,4±7,98	6,75±1,29	0,09±0,06
9 (не визначено)	20,8±6,31	7,75±1,36	0,15±0,12
10 (не визначено)	20,7±4,35	7,42±1,78	0,10±0,04
11 (2)	24,4±6,68	6,92±1,24	0,12±0,05
12(1)	19,6±5,40	6,33±1,50	0,04±0,04
13 (2)	21,3±4,65	6,83±0,94	0,04±0,02
14 (1)	21,9±4,14	6,50±0,90	0,05±0,03
15 (1)	16,6±3,87	5,50±1,31	0,01±0,05
16 (2)	19,3±5,36	4,42±1,56	0,02±0,009
17 (2)	22,9±4,68	5,45±1,13	0,08±0,08
18 (2)	16,9±5,10	5,00±1,21	0,05±0,03
19 (2)	14,9±4,68	5,18±1,40	0,06±0,04
20 (2)	16,8±5,24	4,91±1,22	0,03±0,02
21 (2)	16±4,43	5,00±1,28	0,03±0,02
22 (2)	19,9±5,26	5,25±1,54	0,05±0,03
23 (2)	19,4±6,57	5,33±1,82	0,05±0,04
24 (2)	24,1±6,98	7,18±1,78	0,16±0,04
25 (2)	20,9±5,54	5,92±1,62	0,08±0,05
26 (2)	18,8±5,46	5,36±1,57	0,06±0,02
27 (2)	21,5±7,63	5,67±1,37	0,15±0,09
28 (не визначено)	20,1±4,13	7,00±1	0,20±0,15
29 (не визначено)	20,3±4,85	4,67±1	0,09±0,05
30 (не визначено)	18,1±5,39	3,64±1,57	0,02±0,01
31 (не визначено)	19,9±3,87	5,17±1,58	0,02±0,01
32 (не визначено)	18,7±3,80	5,75±1,60	0,06±0,06
Аврора (1)	18,3±4,43	5,25±1,21	0,02±0,005
Авротіка (2)	19,1±5,00	4,7±1,49	0,03±0,01
Групові арифметичні середні ± похибка, 2016	20,9±0,60	6,08±0,23	0,08±0,009
Групові арифметичні середні ± похибка, 2015	25,7±0,66	6,15±0,13	0,33±0,015
$t_{\text{факт}}$	5,38	0,26	14,29
$t_{\text{табл.0,05/0,01}}$ для кількості ступенів свободи 66			2,00/2,66

Таблиця 3. Результати порівняння показників розвитку кореневої системи у рослин із різними алелями гена *TaAGL21*, вирощених у пакетах у 2015 та 2016 рр.

Підгрупа рослин з алелем	Арифметичне середнє ± стандартна похибка за ознаками					
	довжина кореня		кількість коренів		об'єм витісної рідини	
	2015	2016	2015	2016	2015	2016
<i>TaAGL21-1</i>	24,5±0,99	22,4±2,23	5,92±0,448	7,06±0,772	0,29±0,105	0,07±0,066
<i>TaAGL21-2</i>	26,6±0,95	20,7±0,76	6,29±0,144	5,92±0,228	0,36±0,078	0,08±0,042
$t_{\text{факт.}}$	1,53	0,72	0,79	1,42	0,53	0,13
$t_{\text{табл.0,05}}$ для кількості ступенів свободи 24						2,06

Кожному генотипу властиве нормоване відхилення від групового середнього значення, яке може бути позитивним ($0 \rightarrow +3$) або негативним ($0 \rightarrow -3$). Якщо в обидва роки дослідження конкретний генотип демонструє однаковий напрямок відхилень, чи в обидва роки в позитивний бік, чи в обидва роки в негативний, нормовані відхилення характеризуються як такі, що збігаються. Якщо напрямок відхилень різний – позитивний в один рік і негативний в інший, нормовані відхилення протилежні. Коли нормовані відхилення збігаються за напрямком, це показує, що внесок генотипної компоненти у фенотипне вираження ознаки переважає над внеском середовищної компоненти чи взаємодії генотип–середовище. Протилежність напрямку нормованих відхилень у різні роки дослідження може свідчити про суттєвий внесок до фенотипної мінливості компоненти, яка визначається взаємодією генотип–середовище. Хоча водночас це може бути наслідком випадкових коливань відповіді на умови довкілля при формуванні фенотипу [15].

Для трьох ознак, за якими оцінювали кореневу систему, порівняли напрямок нормованих відхилень за два роки досліджень для всіх 34 генотипів (рис. 1–3) та для зразків з алелем *TaAGL21-2* (рис. 4–6). Окрема перевірка зразків із таким генотипом зумовлена тим, що ген *TaAGL21* ми досліджуємо як ген-кандидат на участь у розвитку кореневої системи, як чинник підвищеної зимостійкості інтрогресивних ліній, а саме цим алелем характеризується Авротіка, відома своєю високою зимостійкістю [16]. За довжиною найдовшого кореня (рис. 1) було 18 генотипних середніх із протилежними нормованими відхиленнями та 16 з однаковими, що

не відрізняється статистично від очікуваних кількостей 17–17 ($\chi^2_{\text{факт.}}=0,12$, $\chi^2_{\text{табл.0,05}}=3,84$), які мають бути, якщо напрямок відхилень визначається випадково. Такі самі результати отримано для ознак кількість коренів (рис. 2, 21 генотип із протилежними нормованими відхиленнями, 13 з однаковими, $\chi^2_{\text{факт.}}=1,88 < 3,84$) та об'єм витісненої рідини (рис. 3, 22 генотипи з протилежним та 12 з однаковим, $\chi^2_{\text{факт.}}=2,94 < 3,84$).

Для ознак максимальна довжина кореня та кількість коренів такі самі результати було отримано і під час дослідження нормованих відхилень для генотипів з алелем *TaAGL21-2*: 11 зразків із протилежними напрямками відхилень та 9 з односпрямованими ($\chi^2=0,20$) для першої ознаки (рис. 4), 8 генотипів із протилежними напрямками відхилень та 12 з односпрямованими ($\chi^2_{\text{факт.}}=0,8$) для другої (рис. 5).

З наведених результатів зрозуміло, що розвиток ознак максимальна довжина кореня та кількість коренів не залежить від наявності чи відсутності загартовування і формується переважно під впливом генотипних особливостей зразків. Причому рослини з алелем *TaAGL21-2* за коливаннями нормованих відхилень не відрізняються від їхнього коливання в загальному пулі генотипів. Отже, не можна стверджувати, що ген *TaAGL21* бере участь у формуванні згаданих ознак кореневої системи.

Більш складними для аналізу виявились результати оцінки ознаки об'єм витісненої рідини. За цією ознакою рослини Авротіки від рослин сорту Аврора значуще відрізнялися в більший бік за умов загартовування ($t_{\text{факт.}}=4,81$, $t_{\text{табл.0,01}}=2,88$), а без нього (2016 р.) – лише на рівні значущості 0,05. Арифметичні середні значення за групами по роках відрізнялися значуще

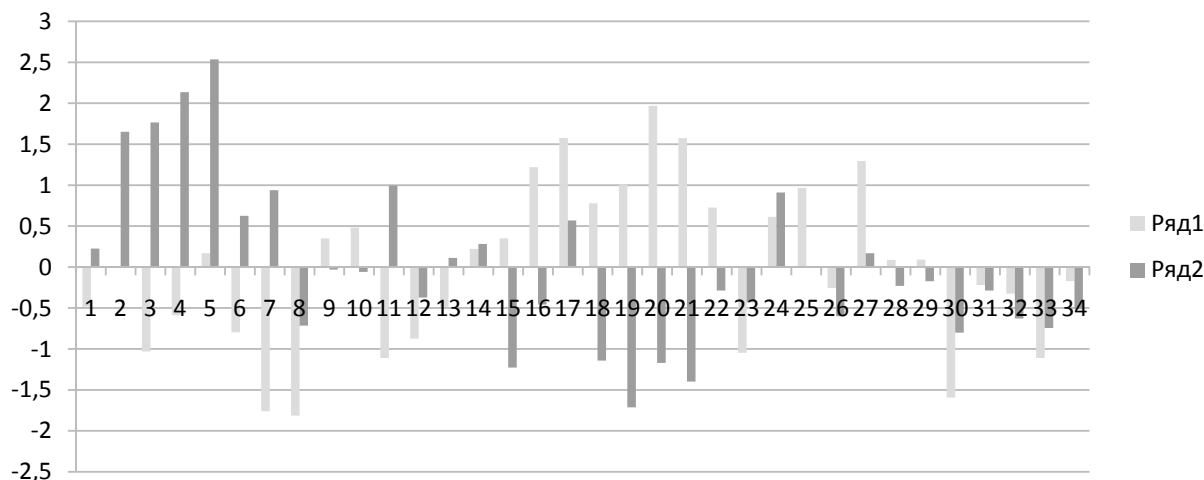


Рис. 1. За віссю ординат значення величин t (нормоване відхилення) арифметичних середніх за довжиною найдовшого кореня для окремих генотипів у 2015 р. (ряд 1) та 2016 р. (ряд 2).

На рис. 1–6 за віссю абсцис 1...34 – номери генотипів, відповідають наведеному у табл. 2

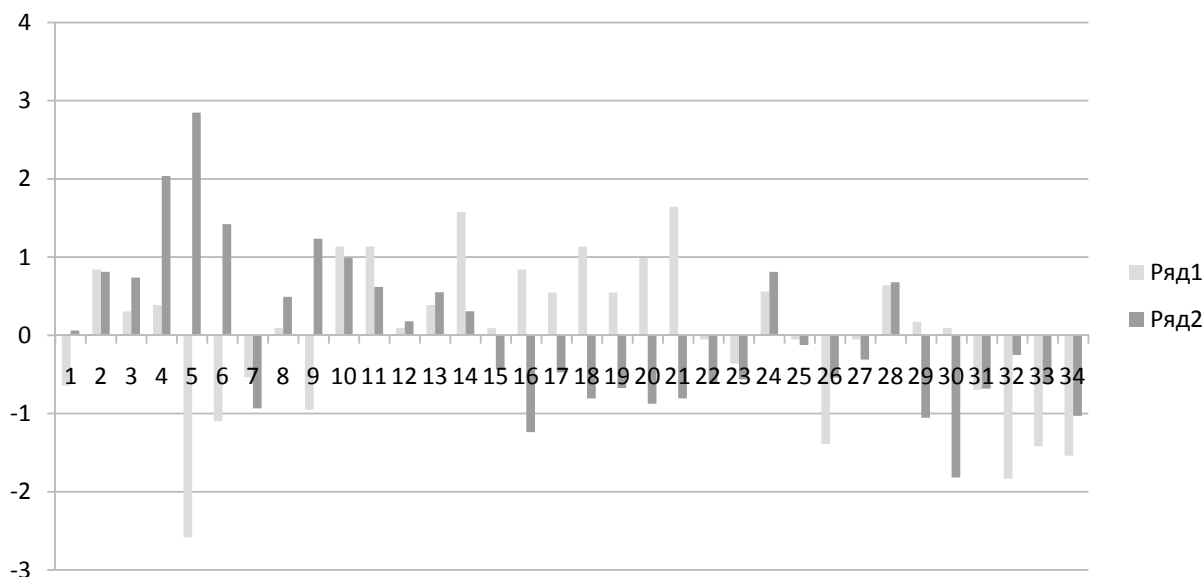


Рис. 2. За віссю ординат значення величин t (нормоване відхилення) арифметичних середніх за кількістю коренів для окремих генотипів за довжиною кореня у 2015 р. (ряд 1) та 2016 р. (ряд 2)

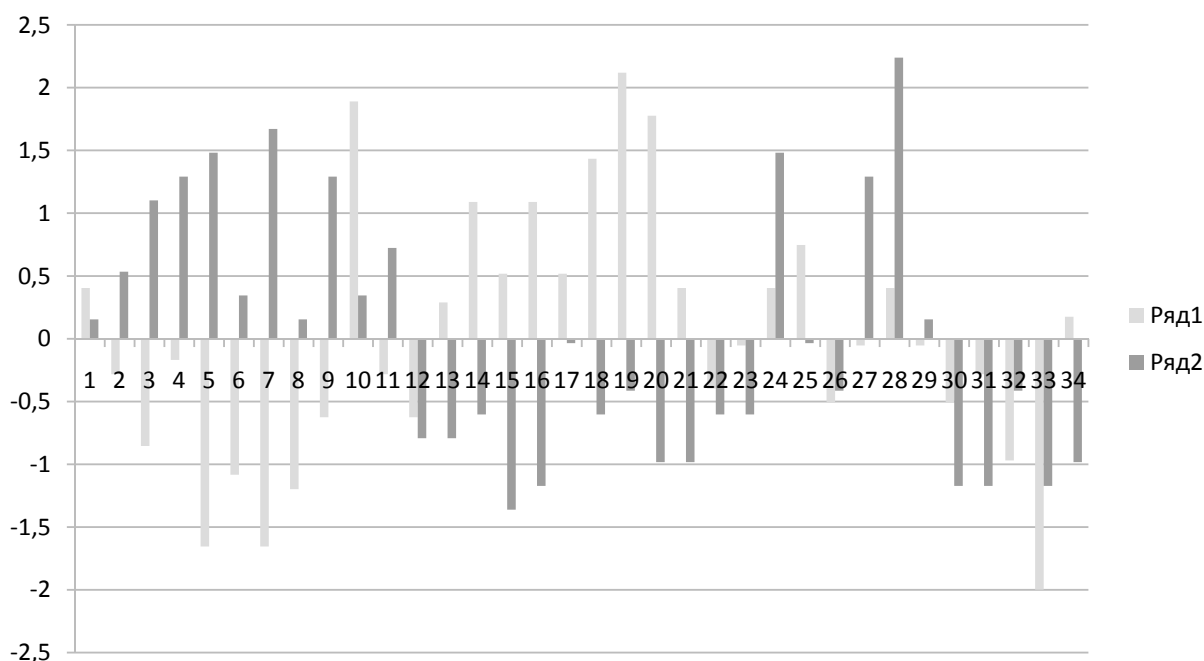


Рис. 3. За віссю ординат значення величин t (нормоване відхилення) арифметичних середніх за об'ємом витісненої рідини для окремих генотипів за довжиною кореня у 2015 р. (ряд 1) та 2016 р. (ряд 2)

($0,08 \pm 0,009$ у 2016 р. та $0,33 \pm 0,015$ у 2015 р., $t_{\text{факт.}} = 14,29$, $t_{\text{табл. } 0,01} = 2,66$). Розбіжність між груповими середніми для цієї ознаки набагато більша, ніж встановлена вище різниця за ознакою максимальна довжина кореня, а різниця за кількістю коренів узагалі не реєструється. На відміну від ознак кількість коренів та максимальна довжина кореня, для ознаки об'єм витісненої рідини картина варіювання нормованих відхилень змінюється при порівнянні субгруп зразків з алелем *TaAGL21-2* та з алелем *TaAGL21-1*. 15 генотипів з алелем *TaAGL21-2* з наявних 20

мали протилежний напрямок нормованих відхилень у різні роки дослідження, однакові відхилення мали лише 5 генотипів (рис. 6). Такий розподіл значуще відрізняється від теоретичного 10 – 10 на рівні значущості 0,05 ($\chi^2_{\text{факт.}} = 5,0$). Для генотипів з алелем *TaAGL21-1* протилежні нормовані відхилення виявили в чотирьох випадках, однакові – у двох, що статистично збігається з теоретичним 3 – 3 (за точним двобічним критерієм Фішера $P = 1$). Отже, формування генотипних арифметичних середніх значень за ознакою об'єм витісненої рідини для рослин з алелем

TaAGL21-1 та рослин з алелем *TaAGL21-2* відбувається по-різному, тобто ген *TaAGL21* справді можна розглядати як ген-кандидат, задіяний у формуванні архітектури кореневої системи

у пшениці. За зміною умов вирощування (загартування є чи немає) спостерігається зміна напрямку нормованого відхилення для окремих генотипів з алелем *TaAGL21-2*: генотипи

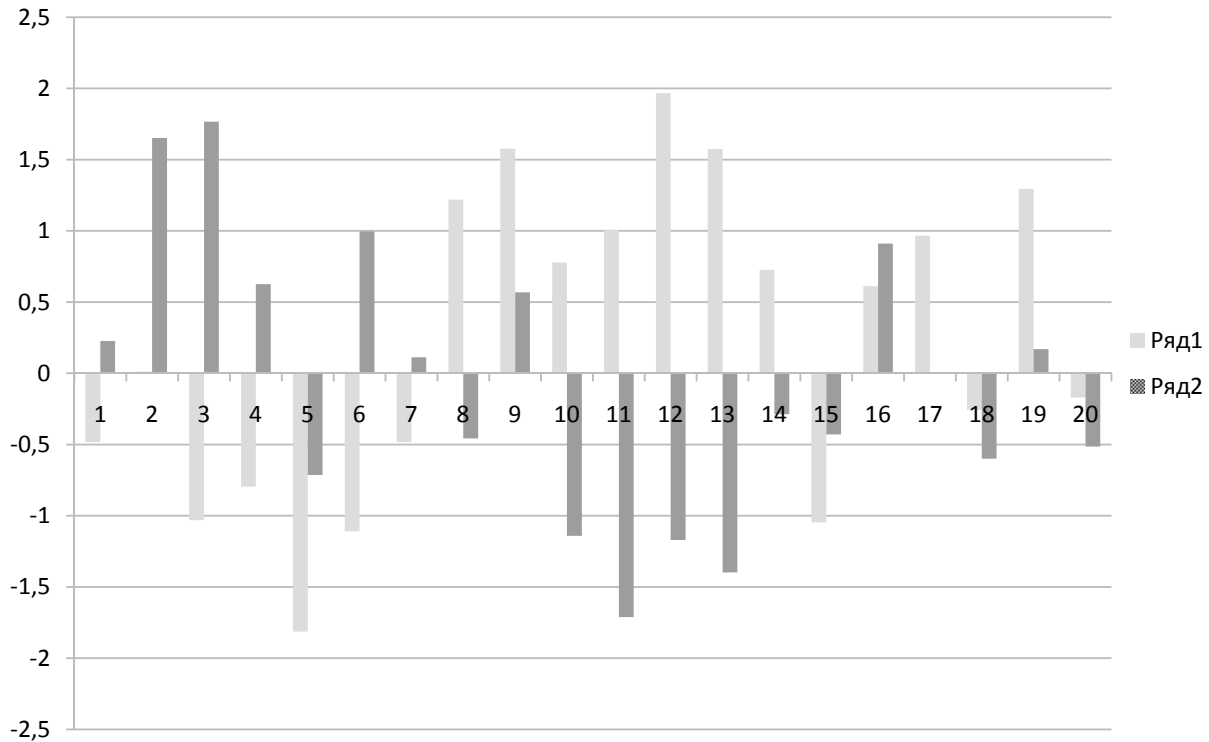


Рис. 4. За віссю ординат значення величин t (нормоване відхилення) арифметичних середніх за довжиною найдовшого кореня для окремих генотипів з алелем *TaAGL-21* у 2015 р. (ряд 1) та 2016 р. (ряд 2)

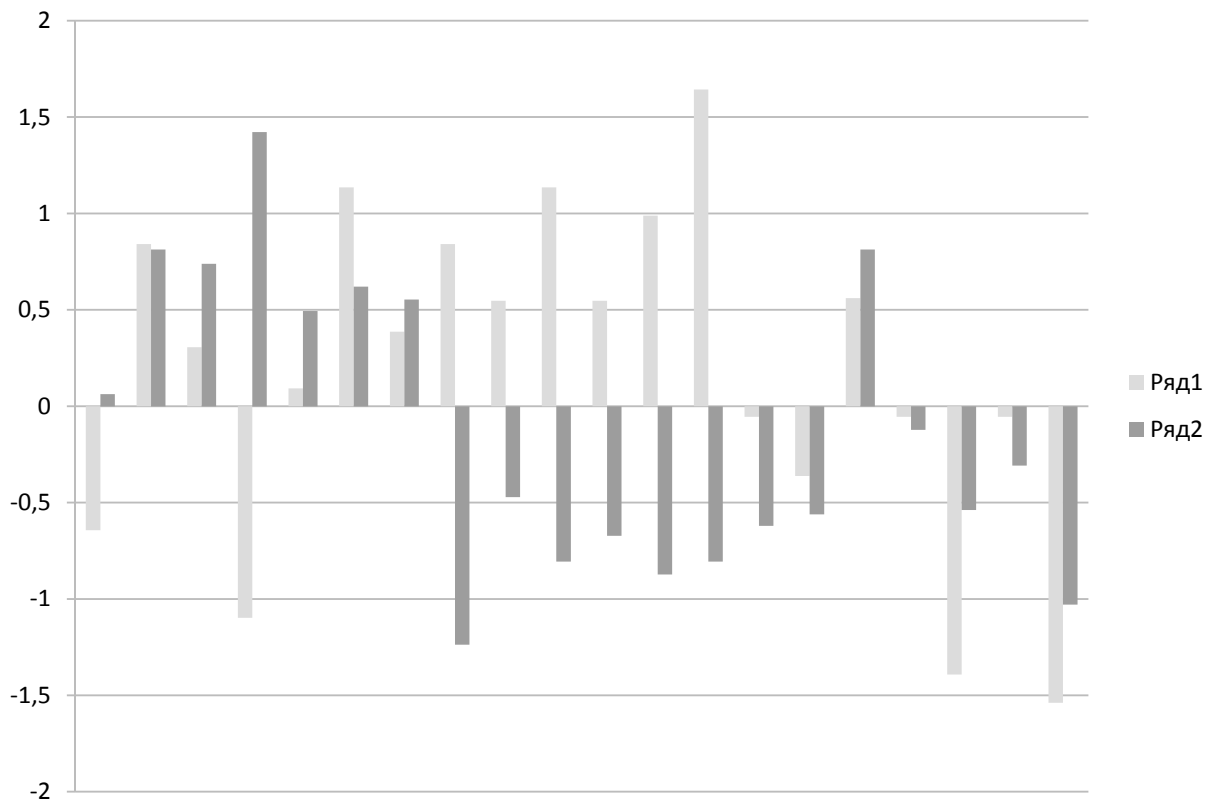


Рис. 5. За віссю ординат значення величин t (нормоване відхилення) арифметичних середніх за кількістю коренів для окремих генотипів з алелем *TaAGL-21* у 2015 р. (ряд 1) та 2016 р. (ряд 2)

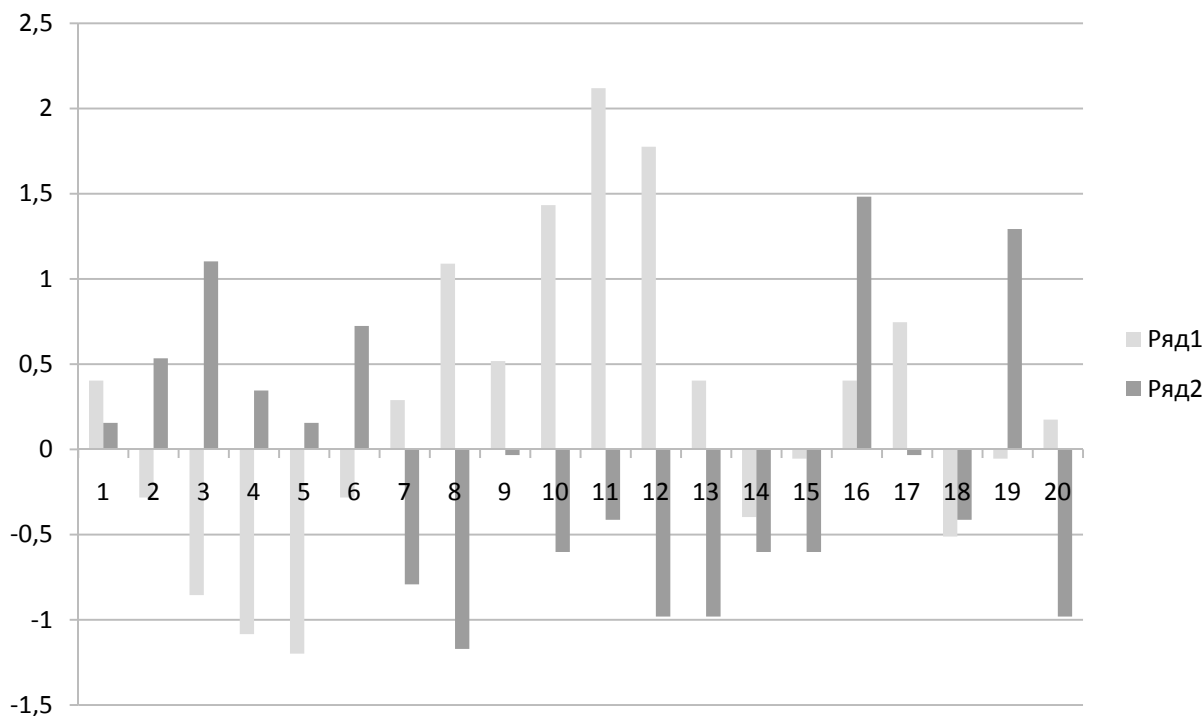


Рис. 6. За віссю ординат значення величин t (нормоване відхилення) арифметичних середніх за об'ємом витісної рідини для окремих генотипів з алелем *TaAGL-21* у 2015 р. (ряд 1) та 2016 р. (ряд 2)

з позитивним нормованим відхиленням при вирощуванні за умов загартовування змінювали його напрямок на протилежний без загартовування (рис. 6). *TaAGL2* кодує транскрипційний фактор, задіяний у синтезі ауксину [7], сайти накопичення якого ініціюють утворення бічних коренів. За архітектурою кореневої системи рослини, вирощені із загартовуванням (2015 р.) та без нього (2016 р.), відрізняються насамперед за ознакою об'єм витісної рідини. А цей об'єм визначається не так кількістю бокових коренів, як кутом відходження їх від осьового кореня, а також кількістю утворених на них розгалужень наступного порядку. Тому виникає припущення, що значення алеля гена *TaAGL21* для розвитку кореневої системи полягає саме у зростанні кількості сайтів накопичення ауксину при вирощуванні рослин за умов загартовування.

У літературі є інформація, яку можна трактувати на користь нашого припущення про значущість взаємодії генотипу за геном *TaAGL21*, що кодує транскрипційний фактор, важливий для синтезу ауксину, та умов його експресії при вирощуванні рослини: наявність загартовування у 2015 р. та його відсутність у 2016 р. Дослідження кореневої системи рослин кукурудзи (*Zea mays*), вирощених за різних температурних умов, показало, що підсилений ріст кореневої системи за умов низької температури має більш холодостійка лінія кукурудзи у порівнянні з менш холодостійкою [17]. Вивчення на тому

самому рослинному матеріалі транскриптому методом місгоагау за контрольних умов та при вирощуванні за низьких температур показало його зміни для двох із чотирьох досліджених ліній кукурудзи. Це були саме ті лінії, які виявляли підсилений ріст кореневої системи при вирощуванні за низьких температур. Це показує, що здатність витримувати більш низькі температури, яка супроводжується формуванням більш розвиненої кореневої системи, забезпечується специфічністю регуляції експресії генів. Коли умови вирощування були субоптимальними для рослин кукурудзи, експресія генів, що регулюється холодом (ICE (Inducer of CBF expression), CBF/DREB1 (C-repeat binding factor)), була одна й та сама. Різниця в їхній експресії починалась, коли умови вирощування ставали стресовими через занижку для кукурудзи температуру. Тоді спостерігали різницю в експресії деяких інших генів: гени пероксидаз, гени патогенез споріднених білків, РНК-зв'язувальних факторів, специфічних для рослин транскрипційних факторів NAC, роль яких зареєстрована у відповіді на холодостійкий стрес [17].

Встановлено, що оптимальна температура для розвитку кореневої системи є видоспецифічною ознакою рослин, для пшениці це 14–18 °С. За температурних умов, які не є оптимальними для цього виду рослин, збільшується співвідношення маса кореневої системи – маса надземної частини рослин, якщо, звісно, температура не

виходить за межі, в яких ще можливий розвиток кореня. І це підтверджено даними, які ми отримали раніше: зимові умови більш успішно витримують рослини ліній Авротіки, в яких збільшується маса коренів, яка припадає на одне стебло [5]. Можливо, це є пристосуванням для подолання нестачі води і мінеральних речовин, оскільки за низьких температур вода є менш доступною через збільшення в'язкості і зменшується провідність кореня для води з наявними в ній мінеральними речовинами [18].

Ще одне підтвердження значення співвідношення об'єм кореневої системи – об'єм надземної маси було отримано на рослинах ячменю [19]. Рослини вирощували за умов вертикального градієнта температури від 20 °C до 10 °C, і такі рослини мали більшу суху масу кореня та більше співвідношення корінь – пагін, ніж рослини, які зростали за оптимальних 20 °C. Причому більша біомаса кореня у рослин, вирощених у субоптимальних умовах, пояснювалась не збільшенням довжини коренів чи їхньої кількості, а збільшенням товщини коренів. Це дуже нагадує результати, отримані в нашому дослідженні.

На томаті *Solanum habrochaites* показано, що при зростанні за неоптимальних (занизьких) температур передовсім інгібується подовження кореня [цит. за: 18]. На моделі арабідопсису такий ефект пояснюють зниженням частоти поділів клітин кореневої меристеми, що може відбуватися через зменшення накопичення ауксину в апексі кореня. В арабідопсису при вирощуванні за

неоптимальних (занизьких) температур зафіксовано інгібування експресії генів, що кодують транспортери ауксину *PINI3/7*. Тобто реакція рослини на зниження температури полягає не лише у зниженні синтезу ауксину, а й у зменшенні кількості молекул, що його транспортують. Мутантам арабідопсису *gain-of-function* за генами *PINI3* притаманне більш помірне зменшення накопичення ауксину в корені за низьких температур у порівнянні з рослинами дикого типу за вказаними генами [цит. за: 18]. Наведений огляд робіт підтверджує наше припущення, що ген *TaAGL21* можна розглядати як ген-кандидат на участь у розвитку кореневої системи за певних умов, а саме загартовування.

Висновки

Рослини інтрогресивних ліній пшениці м'якої *T. aestivum* / *Aegilops mutica* та вихідні генотипи Аврора і Авротіка відрізняються за архітектурою кореневої системи при її формуванні за умов загартовування рослин та без нього. Мінливість за ознакою об'єм витісненої рідини залежно від умов вирощування характерна для рослин з алелем *TaAGL21-2*, властивим Авротіці та частині інтрогресивних ліній. Ген *TaAGL21* кодує транскрипційний фактор, задіяний у синтезі ауксину, і знайдений поліморфізм за його алелями серед ліній з різною архітектурою кореневої системи робить цей ген кандидатом на участь у розвитку кореневої системи за умов загартовування рослин перед стадією кушіння.

Список літератури

- Kong X, Zhang M, Smet ID, Ding Z. Designer crops: optimal root system architecture for nutrient acquisition. Trends in Biotechnology. 2014;32(12):597–8.
- Naruntunyuan M, Dulloo ME, Yeritsyan N, Danielyan A. Red List assessment of nine *Aegilops* species in Armenia. Genetic Resources and Crop Evolution. 2010;57(8):1177–89.
- Жиров ЕГ. Геномы пшеницы: исследование и перестройка. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. Специальность Генетика: 03.00.15. Краснодар; 1989. 366 с.
- Iefimenko TS, Antonyuk MZ, Martynenko VS, Navalihina AG, Ternovska TK. Introgression of *Aegilops mutica* genes into common wheat genome. Cytol Genet. 2018;52(1):21–30.
- Єфіменко ТС, Антонюк МЗ, Терновська ТК. Характеристика кореневої системи інтрогресивних ліній пшениці з генетичним матеріалом від *Amblyopyrum muticum*. Наукові записки НаУКМА. Біологія та екологія. 2016;184:10–16.
- Goh T, Kasahara H, Mimura T, Kamiya Y, Fukaki H. Multiple AUX/IAA-ARF modules regulate lateral root formation: the role of Arabidopsis SHY2/IAA3-mediated auxin signaling. Philosophical Transactions of The Royal Society Biological Sciences. 2012;367(1595):1461–68.
- Yu L-H, Miao Z-Q, Qi G-F, Wu J, Cai X-T, Miao J-L, et al. MADS box transcription factor *AGL21* regulates lateral root development and responds to multiple external and physiological signals. Mol Plant. 2014 Nov;7(11):1653–69.
- Єфіменко ТС, Антонюк МЗ, Терновська ТК. Поліморфізм інтрогресивних ліній *Triticum aestivum* / *Amblyopyrum muticum* за геном *AGL21*, промотором розвитку коренів. Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. 2016;19:25–8.
- KOMUGI: Wheat Genetic Resources Database. Composite Wheat Map [Internet]. Available from: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/maps/markerMap.jsp;jsessionid=40E62A525FB63D69D63275DF645E308C.lb1?chromosome=5>
- GrainGenes: A Database for Triticeae and Avena [Internet]. Available from: <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. Москва: Практика; 1998. 459 с.
- Ehdaie B, Whitkus RW, Waines JG. Rootbiomass, water-use efficiency and performance of wheat-rye translocations of chromosomes 1 and 2 in spring bread wheat 'Pavon'. CropSci. 2003;43(2):710–7.
- Waines JG, Ehdaie B. Optimizing root characters and grain yield in wheat. Czech J GenetPlantBreed. 2005;41:326–30.
- Waines JG, Ehdaie B. Domestication and crop physiology: roots of Green Revolution wheat. AnnBot. 2007;100(5):991–8.
- Мазер К, Джинс Дж. Биометрическая генетика. Москва: Мир, 1985. 463 с.

16. Єфіменко Т.С., Терновська Т.К. Генетичний контроль формування архітектури кореневої системи рослин та її зв'язок із зимостійкістю. Наукові записки НаУКМА. Біологія та екологія. 2015;171:10–17.
17. Di Fenza M, Hogg B, Grant J, Barth S. Transcriptomic response of maize primary roots to low temperatures at seedling emergence. Peer J. 2017; DOI: 10.7717/peerj.2839
18. Koevoets IT, Venema HJ, Elzenga TM, Testerink C. Roots with standing their environment: exploiting root system architecture responses to abiotic stress to improve crop tolerance. Front Plant Sci. 2016; DOI: 10.3389/fpls.2016.01335
19. Fullner K, Temperton VM, Rascher U, Jahnke S, Rist R, et al. Vertical gradient in soil temperature stimulates development and increases biomass accumulation in barley. Plant Cell Environ. 2012;35(5):884–92.

T. Iefimenko, V. Martynenko, T. Ternovska

INFLUENCE OF ACCLIMATION CONDITIONS ON WINTER HARDINESS OF WHEAT LINES WITH INTROGRESSIONS FROM AUROTICA AMPHIDIPOID

Aim. Genome substituted amphidiploid Aurotica and developed common wheat introgressive lines have higher winter hardiness. Gene *TaAGL21*, which encodes MADS-box TF controlling auxin transport in the root, plays some role in providing winter hardiness. The aim of this work was to determine the influence of this TF on the root architecture in different cold acclimation conditions. **Methods.** Quantitative assessment of the root system parameters, genotyping of plants using PCR, the statistical method for comparison of normalized deviations of genotypes in two groups with different alleles of *TaAGL21* gene. **Results.** The root system characteristics such as the maximum root length, the root number, the root quantity, and the root system volume have been determined for Aurora, Aurotica, and introgressive lines grown without natural cold acclimation. Genotypes were grouped for *TaAGL21* alleles: allele 2 inherent to Aurotica with better winter hardiness than Aurora, and allele 1 inherent to Aurora. A comparative analysis of the arithmetic mean values for the studied traits with the arithmetic mean values of the same traits assessed in 2015 on plants grown in conditions of natural cold acclimation were conducted. For the plants grown in the natural cold acclimation conditions genotypes with allele 2 of *TaAGL* gene differed from genotypes with allele 1 of the same gene; whereas, in the absence of cold acclimation no difference was observed for this trait between two groups of plants. Contrasting results were obtained for the plants grown under the conditions of the natural cold acclimation for their normalized deviations. **Conclusions.** Allele specific influence of *TaAGL21* gene on the root system architecture of common wheat plants and amphidiploid Aurotica depends on the conditions of cold acclimation of wheat plants on the developmental stage before branching of the stem.

Keywords: amphidiploid Aurotica, introgression lines, *Aegilops mutica* (*Amblyopyrum muticum*), root system, winter hardiness, auxin, gene *TaAGL21*.

Матеріал надійшов 17.05.2019