

29. Comparison of orthologous loci from small grass genomes *Brachypodium* and rice: implications for wheat genomics and grass genome annotation / E. Bossolini, T. Wicker, P. A. Knobel, B. Keller // *Plant Journal*. – 2007. – Vol. 49, № 4. – P. 704–717.
30. Куперман Ф. М. Биология развития культурных растений / Ф. М. Куперман. – М. : Высшая школа, 1982. – 343 с.
31. Балашов В. В. Зимостойкость озимой пшеницы / В. В. Балашов, Ю. И. Голев // *Зерновое хозяйство*. – 1975. – № 11. – С. 21–25.

*T. Iefimenko, T. Ternovska*

## GENETIC CONTROL OF PLANT ROOT SYSTEM ARCHITECTURE DEVELOPMENT AND ITS RELATION TO WINTER HARDINESS

*Characteristic features of root system development of monocots and dicots are presented in the article. Analysis of modern scientific sources on root development genetic control is presented; main groups of transcriptional factors regulating root development are characterized. Data on AGL (AGAMOUS-LIKE) MADS box transcription factors regulation of auxin biosynthesis and transport is summarized. Brachypodium is characterized as an appropriate model for cereal root system investigation. The perspective of studying genome-substitution amphidiploid Aurotica for searching candidate genes controlling plant root system development is discussed.*

**Keywords:** root system, transcriptional factors, auxin, *Arabidopsis*, *Brachypodium*, rice.

*Матеріал надійшов 12.09.2015*

УДК 525.22+577.29

*Кирієнко А. В., Михайлик С. Ю., Антонюк М. З.*

## ПОЛІМОРФІЗМ ЗА ГЕНАМИ *GLU* ТА *GLI* В ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ, СТАБІЛЬНИХ ЗА ОЗНАКАМИ МОРФОЛОГІЇ КОЛОСА

*За результатами дослідження компонентів електрофоретичного спектра гліадинів та глютенінів, а також аналізу внутрішньогенних мікросателітних послідовностей генів гліадинів інтрогресивних ліній м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) з чужинним генетичним матеріалом *Aegilops speltoides* Tausch, *Ae. sharonensis* Eig., *Ae. umbellulata* Zhuk. продемонстровано мінливість за генами *Glu* та *Gli*. Серед досліджуваних ліній частина виявила внутрішньолінійну гетерогенність, яка спостерігалась як на рівні запасних білків, так і на рівні внутрішньогенних мікросателітних послідовностей.*

**Ключові слова:** інтрогресивні лінії м'якої пшениці, гліадини, глютеніни, мінливість, інтрогресія, мікросателіти.

### Вступ

Проламіни – це група запасних білків ендосперму пшениці. Сюди належать мономерні білки гліадини та полімерні глютеніни [1]. Вони становлять близько 80 % від усіх білків

пшениці. Гліадини є запасними білками пшениці, які мають мономерну структуру, їх розділяють на чотири групи залежно від їхньої рухливості в електрофоретичному гелі з низьким показником рН. Так, виділяють  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - і  $\omega$ -гліадини [2; 3].

Гени запасних білків є зручними молекулярними маркерами для виявлення і вивчення поліморфізму між різними генотипами пшениці. У м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) локуси генів гліадинів та глютенінів мають кластерну будову [5; 6]. Білки гліадини кодується шістьма мажорними локусами: *Gli-1A*, *Gli-1B*, *Gli-1D*, *Gli-2A*, *Gli-2B* та *Gli-2D*, що локалізовані в дистальній частині короткого плеча хромосом першої та шостої гомеологічних груп геному м'якої пшениці [2–4].

Глутеніни – це ще одні мажорні запасні білки ендосперму зернівки пшениці. Вони є макрополімерами, що складаються з окремих білкових мономерів, поєднаних між собою дисульфідними зв'язками. Високомолекулярні глютеніни м'якої пшениці кодується локусом *Glu-1*, що локалізований на довгому плечі хромосом 1A, 1B, 1D. Для локусу *Glu-1B* відомо 5 алелів, а для локусів *Glu-1A* і *Glu-1D* – по 3 алелі [5–7].

Досліджувані інтрогресивні лінії м'якої пшениці є похідними від схрещування генотипу сорту Аврора (геном AABBDD) із трьома геномно-заміщеними амфідиплоїдами: Авродесом (AABBSS), Аврозисом (AABBS<sup>sh</sup>S<sup>sh</sup>) та Аврolatoю (AABBUU). Ці лінії є унікальними та створеними раніше в нашій лабораторії [7–9].

Попередні дослідження [10; 11] продемонстрували мінливість за генами *Gli* в інтрогресивних ліній м'якої пшениці, що показують нестабільність за ознаками морфології колоса. Об'єктом наших досліджень стали лінії, що так само є похідними від схрещування сорту Аврора з геномно-заміщеними амфідиплоїдами, проте вони є стабільними за ознаками морфології колоса. Для оцінки мінливості запасні білки (глютеніни та гліадини) було обрано через те, що вони є високополіморфними генетичними маркерами.

### Матеріали та методи

Для дослідження було взято 60 інтрогресивних ліній м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), що походять від схрещування сорту Аврора (геном AABBDD) із трьома геномно-заміщеними амфідиплоїдами, а саме: Авродесом (AABBSS), що містить субгеном SS від *Aegilops speltoides* Tausch, – 20 ліній (табл. 1); Аврозисом (AABBS<sup>sh</sup>S<sup>sh</sup>) – субгеном S<sup>sh</sup>S<sup>sh</sup> від *Ae. sharonensis* Eig. – 20 ліній (табл. 1); Аврolatoю (AABBUU) – субгеном UU від *Ae. umbellulata* Zhuk. – 20 ліній (табл. 2). Аналізували по 4 зернівки з кожної генерації кожної групи. Ці лінії є резистентними (res) до патогенного гриба (*Blumeria graminis*

Speer.), який викликає захворювання (борошнисту росу). Використовували насіння, зібране з генерації рослин 2009 р.

Таблиця 1. Лінії, які є похідними від схрещування сорту Аврора з Авродесом та від схрещування сорту Аврора з Аврозисом

Номер лінії	Лінії-похідні Авродесу	Номер лінії	Лінії-похідні Аврозису
1	83	21	104
2	83	22	104
3	15	23	105/2
4	15	24	105/2
5	38	25	121
6	38	26	121
7	92	27	115
8	92	28	115
9	31	29	118
10	31	30	118
11	19	31	132
12	19	32	132
13	20	33	141
14	20	34	141
15	25	35	112
16	25	36	112
17	72	37	114
18	72	38	114
19	76	39	129
20	76	40	129

Таблиця 2. Лінії, які є похідними від схрещування сорту Аврора з Аврolatoю

Номер лінії	Лінії-похідні Аврolatoю	Номер лінії	Лінії-похідні Аврolatoю
41	165	51	217
42	165	52	217
43	176	53	222
44	176	54	222
45	189	55	177
46	189	56	177
47	201	57	218
48	201	58	218
49	207	59	243
50	207	60	243

Для електрофоретичного розділення гліадинів використовували поліакриламідний гель (ПААГ, рН 3.2). Електрофорез виконували в модифікованій методиці Бжезинського [8]. Білки екстрагували з половинки сухої зернівки, її подрібнювали, потім заливали 120 мкл 70 % етилового спирту на 1,5 години. Після цього відбирали 60 мкл супернатанту і випаровували. Сухий осад розчиняли у 50 мкл 5,5 М розчину сечовини. В одну слоту вносили 20 мкл зразка. Умови розділення: 200 В, 20 мА – 20 хв, 350–400 В та 40–60 мА – до завершення електрофорезу (з розрахунку на 2 гелі). Розділення виконували

від «анода» до «катода». Тривалість електрофорезу становила 4 години.

Для електрофоретичного розділення глютенінів використовували ПААГ за Леммлі [12]. Білки екстрагували з тієї ж половинки зернівки, з якої перед цим виділяли гліадини. Екстракцію здійснювали протягом 1,5 години в екстракційному буфері (гліцерин, 1М Трис-НСІ рН 6,8, додецил сульфату натрію, бета-меркаптоетанол, декілька кристалів бромфенолового синього), потім зразки прогрівали на водяній бані при +95 °С 3 хв. У кожну слоту вносили 11 мкл зразка. Розділяли від «катода» до «анода». Умови розділення: 300 В та 35 мА – 30 хв, 300 В та 55–60 мА – до кінця електрофорезу. Загальна тривалість електрофорезу – близько 3–3,5 годин.

ДНК виділяли з половинок сухих зернівок. Для цього половинку кожної зернівки розтирали, додавали 250 мкл екстракційного буфера (СТАВ – 2 %, 20 мМ EDTA рН 8,0, 1М Трис-НСІ рН 8,0, 1,5 М розчин NaCl, 1 % полівінілпір-

агарозному гелі, розділяли від «катода» до «анода» при 110 В та 105 мА протягом 45–50 хв.

Було використано три пари праймерів до мікросателітних послідовностей всередині генів  $\alpha$ -,  $\beta$ - та  $\omega$ -гліадинів. Праймери було розроблено у 2013 р. на основі бази даних секвенованих гліадинових генів – Shigen (SHared Information of GENetic Resources). Послідовності секвенованих ділянок було проаналізовано на наявність мікросателітних локусів з використанням програм порталу [ncbi.nlm.nih.gov Blast](http://ncbi.nlm.nih.gov/Blast) та [SSR Finder](http://ncbi.nlm.nih.gov/SSRFinder). Нумери секвенованих генів, що містили мікросателітні локуси, у порталі [ncbi.nlm.nih.gov GenBank](http://ncbi.nlm.nih.gov/GenBank) представлені як AJ133604.1 (ген  $\alpha$ -гліадинів), AF419254.1 (ген  $\beta$ -гліадинів) та DQ861428.1 (ген  $\omega$ -гліадинів). До повторів у послідовностях було розроблено праймери з використанням програмного забезпечення Primer 3 та програми Primer-BLAST, що наявні у відкритому доступі на порталі [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov) [11]. Послідовності праймерів та мікросателітну послідовність, що аналізувалась, вказано в таблиці 3.

Таблиця 3. Характеристика праймерів, використаних у роботі [11]

Пара праймерів	Послідовність праймерів	Мікросателітна послідовність
wggm-P3-a1-R/L	Правий: ACAGCCGCAACCACAGTATT Лівий: TTCCATGCGC TATGTTGTGT	288–306 (CAG) <sub>6</sub> , 307–330 (CAA) <sub>8</sub>
wggm-N-o1-R/ L	Правий: CAGCCACAACCATTTTCGACCACA Лівий: CCATGCGCTATGTTGTGTGCTGC	378–410 (CAA) <sub>8</sub>
wggm-P3-b1- R /L	Правий: AAGCCTCCACAATGTTGTTC Лівий: CCTGTGGGTTTTGCTGAGAT	91–102 (CAC) <sub>4</sub> , 103–132 (CAA) <sub>10</sub>

ролідон, протеїназа К – 50 мкг/мл). Зернівки в епендорфах інкубували 1 годину за температури +65 °С. Потім додавали по 250 мкл суміші хлороформу та ізоамілового спирту (24:1) і перемішували 15 хв. Центрифугували при 12 000 об/хв 10 хв. Збирали 200 мкл супернатанту і додавали до нього 400 мкл (2/3) охолодженого ізопропанолу, перемішували протягом 5 хв. Суміш ставили в морозильну камеру (–20 °С) на 30 хв для осадження ДНК. Центрифугували при 13 500 об/хв 10 хв. Супернатант зливали, до отриманого осаду додавали 250 мкл розчину 70 % етилового спирту. Спирт зливали, а до осаду додавали 50 мкл ТЕ буфера з РНКазою (10 мг/мл). Зразки ДНК для їхнього розчинення інкубували на водяній бані протягом 1 години за температури +37 °С.

Реакцію ПЛР здійснювали з трьома парами праймерів специфічних до мікросателітів гліадинових генів, що кодують білки трьох зон гліадинового спектра  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ . Наявність продукту ПЛР та його поліморфізму здійснювали в 2 %

### Результати та обговорення

Аналізуючи електрофоретичний спектр запасних білків (глютенінів та гліадинів), давали відповіді на такі запитання: 1) чи спостерігається внутрішньолінійне розщеплення в гліадиновому спектрі для 4 зернівок? 2) чи є представлений спектр ідентичним спектру сорту Аврора? 3) чи наявні лінії зі спектром, який повністю повторює спектр геномно-заміщених амфідиплоїдів? 4) якщо проаналізований спектр не є ідентичним, то чому і як проявляються ці відмінності в порівнянні з батьківським спектром?

Аналіз гліадинових спектрів показав, що жодна із 60 інтрогресивних ліній не повторює повністю ні спектр Аврори, ні геномно-заміщених амфідиплоїдів. Натомість кожна група похідних демонструє внутрішньолінійне розщеплення, загалом таких ліній виявилось 13. Серед 20 інтрогресивних ліній-похідних від схрещування сорту Аврора та Авродесу було виявлено 4 лінії, які демонструють внутрішньолінійну

мінливість. Ліній, не ідентичних за спектрами 4 зернівок, виявилось найбільше для похідних Аврори та Арозису – 6. Для похідних Аврори та Аврорати було ідентифіковано 3 таких ліній.

Кожна із 60 інтрогресивних ліній демонструє втрату щонайменше одного компонента гліадинового спектра (табл. 4). Із 60 проаналізованих ліній 58 демонструють появу принаймні

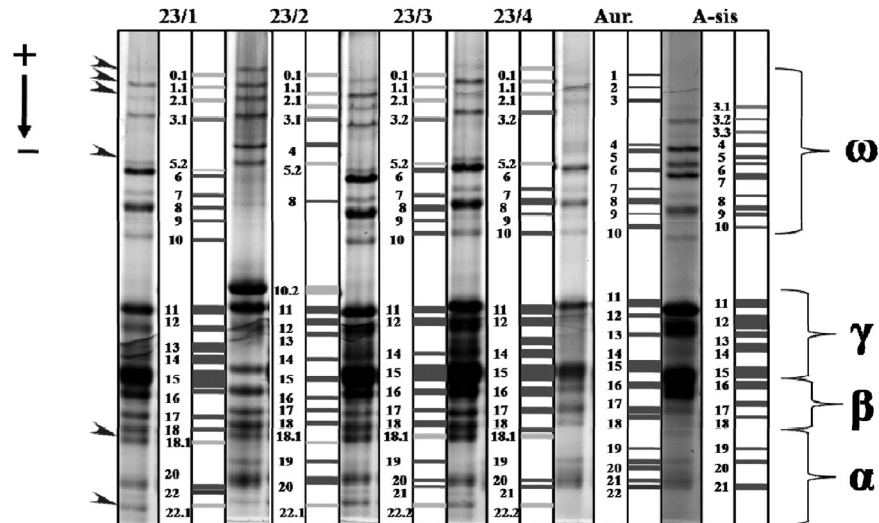


Рис. 1. Компоненти спектра гліадинів у лінії 23 похідної Аврозису: Aur. – Аврора, A-sis. – Аврозис; стрілками вказано відмінності між компонентами всередині ліній (поява нових компонентів), праворуч зазначено зони гліадинового спектра

Таблиця 4. Втрата компонентів гліадинового спектра в ліній, які демонструють внутрішньолінійну мінливість

Номер зразка	ω-гліадини	γ-гліадини	β-гліадини	α-гліадини
17/1	4, 5, 7, 8	11, 13	–	–
17/2	4, 5, 7, 8	11, 13	18	–
17/3	4, 5, 7, 8	11, 13	18	–
17/4	4, 5, 7, 8	11, 13	18	–
19/1	4, 7	11, 14	–	19
19/2	4, 7	11, 14	–	19
19/3	7	14	–	19, 21
19/4	7	14	–	19, 21
20/1	7	11, 14	–	19
20/2	7, 8, 10	11, 14	–	19
20/3	7	11, 14	–	19
20/4	7	11	–	19
21/1	6, 8, 10	11	–	–
21/2	6, 8, 10	11	–	–
21/3	6, 7, 8, 10	11	–	20, 21, 22
21/4	6, 7, 8, 10	11	–	20, 21, 22
22/1	6, 7, 8, 10	11	–	–
22/2	6, 7, 8, 10	11	–	–
22/3	6, 7, 8, 10	11	–	–
22/4	6, 7, 8, 9, 10	11, 14, 15	16, 17, 18	19, 20, 21, 22
23/1	3, 4, 7	–	–	19, 20, 21
23/2	3, 6, 7, 8, 10	11, 14	–	–
23/3	3, 4, 6, 7, 8	–	–	–
23/4	3, 4, 6, 7, 8	11	–	–
24/1	3, 6, 7, 8, 9, 10	11, 14	–	–
24/2	3, 4, 7	11, 14	–	20, 22
24/3	3, 7	11, 14	–	20, 22
24/4	3, 7	11, 14	–	20, 22
25/1	3, 7, 8, 10	11, 14	–	–
25/2	3, 6, 7, 8, 9, 10	11, 14, 15	–	19, 20
25/3	3, 6, 7, 8, 9, 10	11, 14, 15	–	20
25/4	3, 6, 7, 8, 9, 10	11, 14, 15	–	20
43/1	–	13, 15	–	20
43/2	–	13, 15	–	19
43/3	–	13, 15	–	20
43/4	–	13, 15	–	20

Примітка. «–» – відсутні нові компоненти у відповідній зоні гліадинового спектра.

Таблиця 5. Характеристика нових компонентів гліадинового спектра в ліній, які демонструють внутрішньолінійну мінливість

Номер зразка	ω-гліадини	γ-гліадини	β-гліадини	α-гліадини
19/1	0.1, 1.1, 2.1, 5.2	11.2	18.1	22.1
19/2	0.1, 1.1, 2.1, 5.2	11.2	18.1	22.1
19/3	–	11.2	18.1	22.1
19/4	–	11.2	18.1	22.1
20/1	–	11.1, 11.2	18.1	22.1
20/2	5.2	11.1, 11.2	–	22.1
20/3	5.2	11.1, 11.2	–	22.1
20/4	5.2	11.1, 11.2	–	22.1
21/1	3.2	11.2	–	22.1
21/2	3.2	11.2	–	22.1
21/3	3.2	11.2	–	–
21/4	3.2	11.2	–	–
23/1	0.1, 1.1, 2.1	–	18.1	22.1
23/2	0.1, 1.1, 2.1	10.2	–	22.1
23/3	0.1, 1.1, 2.1	–	–	22.2
23/4	0.1, 1.1, 2.1	–	–	22.2
24/1	0.1, 1.1, 2.1	11.2	–	22.1
24/2	0.1, 1.1, 2.1	–	–	22.1
24/3	1.1, 2.1	10.1	–	22.1
24/4	1.1, 2.1	10.1, 11.2	–	22.1
25/1	1.1, 2.1	11.2, 13.1, 14.1	–	22.1
25/2	1.1, 2.1	11.2	–	–
25/3	1.1, 2.1	11.2, 13.1, 14.1	–	–
25/4	1.1, 2.1	11.2, 13.1, 14.1	–	–
27/1	–	10.1	–	19.1
27/2	–	10.1	–	19.1
27/3	–	10.1	–	19.1
27/4	3.2	10.1, 11.2	–	–
43/1	0.1, 4.1	11.2	–	–
43/2	0.1, 4.1	11.2	–	–
43/3	0.1, 4.1	11.2	–	–
43/4	0.1, 1.1	11.2	–	–

Примітка. «–» – відсутні нові компоненти у відповідній зоні гліадинового спектра.

1 нового компонента спектра, не характерного для батьківських форм. Лише дві лінії – 59 та 60, похідні Авролати, не мають у своєму спектрі нових гліадинових компонентів. Найчастіше зміни в складі компонентів гліадинового спектра спостерігались у зонах α-, ω-, γ-гліадинів і дещо рідше в зоні β-гліадинів, яка, втім, є більш складною для електрофоретичного розділення (рис. 1, табл. 5).

Під час аналізу електрофоретичного спектра високомолекулярних глютенінів із 60 інтрогресивних ліній було виявлено 9 ліній, які повністю повторюють спектр Аврори. Жодна лінія повністю не повторювала спектр геномно-заміщених амфідиплоїдів.

Загалом було ідентифіковано 25 ліній, що демонструють внутрішньолінійну мінливість за електрофоретичним спектром. Серед них

Таблиця 6. Лінії, які демонструють мінливість за компонентами глютенінового спектра

Ліній-похідні	Внутрішня мінливість	Відсутня внутрішня мінливість	Повторюють спектр Аврори	Повторюють спектр геномно-заміщених амфідиплоїдів
Авродесу	1, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20	3, 4, 8, 10, 14, 15	19 (крім зразка 19/3)	–
Аврозису	21, 23, 24, 33, 34, 35, 38, 40	22, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 36, 37, 39	37, 38 (крім 38/1, 38/2, 38/3), 39, 40 (крім 40/2)	–
Авролати	43, 44, 47	41, 42, 45, 46, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60	43 (крім 43/4), 44 (крім 44/1), 59, 60	–

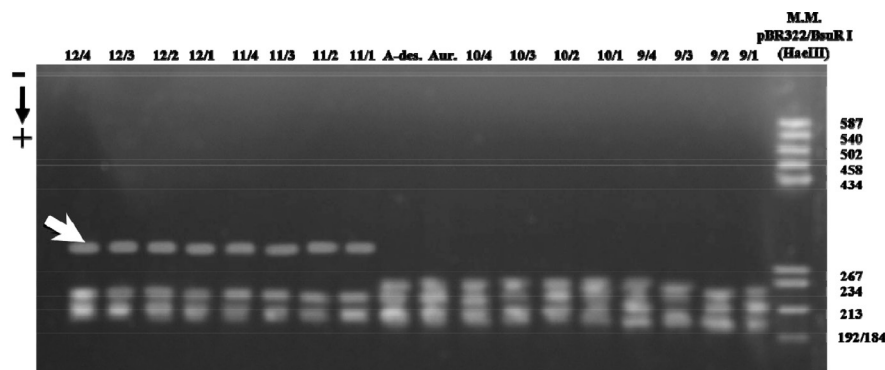
Примітка. «–» – відсутність відповідних ліній.

14 ліній похідних Авродесу, 8 – Аврозису, 3 – Авролати (табл. 6).

Серед усіх 60 інтрогресивних ліній, що проаналізовані за генами *Gli* та *Glu*, на рівні поліморфізму запасних білків вдалось виявити лінії, які в обох випадках були гетерогенними за спектрами 4 зернівок, показуючи поліморфізм усередині лінії. До таких ліній можна віднести похідні Авродесу – 4 лінії-похідні; Аврозису – 3; Авролати – 1. Отже, найбільшу кількість таких ліній становлять лінії, похідні від схрещування Аврори з Авродесом. Цілком логічно постає питання про те, чому найбільша кількість ліній, які демонструють внутрішньолінійний поліморфізм як за спектрами глютенінів, так і загалом запасних білків 4 зернівок, належать до похідних Аврори та Авродесу. Експериментальні статті, зокрема [10], свідчать, що лінії, похідні Авродесу, справді характеризуються підвищеною внутрішньолінійною мінливістю. Це можна пояснити тим, що субгеном *SS Aegilops speltoides* Tausch, представлений у геномі Авродесу (AABBSS), кодує супресор *Ph1*-системи, яку містить AABB тетракомпонент Аврори та яка перешкоджає кон'югації гомеологічних хромосом. Наявність *Ph1*-системи знижує рівень рекомбінаційної мінливості. Своєю чергою присутність супресора цієї системи призводить до її інактивації і підвищення загального рівня рекомбінаційної мінливості, що як наслідок проявляється у внутрішньолінійному розщепленні за компонентами білкового спектра [10; 13].

аналіз внутрішньогенних мікросателітних послідовностей до генів  $\alpha$ -,  $\beta$ - та  $\omega$ -гліадинів.

Для дослідження внутрішньогенних мікросателітних послідовностей генів  $\alpha$ -гліадинів було використано пару праймерів *wggm-P3-a1-L/R*. Розмір очікуваного продукту для реакції ампліфікації становив 164 п.о. Кожна з батьківських форм Аврори, Авродесу, Аврозису та Авролати давала амплікон, представлений трьома компонентами, розмір яких становив близько 234 п.о., 213 п.о., 192/184 п.о. Отже, можна припустити, що отриманий спектр у батьківських форм, найвірогідніше, не є продуктом ампліфікації ділянки, що містить поліглютамінові повтори в генах  $\alpha$ -гліадинів, оскільки розміри продуктів ПЛР відрізняються від очікуваного розміру. Аналіз показав, що із 60 ліній-похідних 42 повністю повторюють батьківський спектр продуктів реакції ампліфікації. Решта 18 ліній відрізнялись за спектром фрагментів ампліфікації від батьківських форм. Для цих ліній характерною є втрата компонента розміром приблизно 234 п.о. і поява нового компонента розміром близько 267 п.о. (рис. 2). Це може бути пов'язано зі збільшенням розміру мікросателіта, збільшенням кількості поліглютамінових повторів. У цих ліній лишилися фрагменти з масою близько 213 та 192/184 п.о., що властиві батьківським формам. Жодна з проаналізованих ліній не демонструвала внутрішньолінійне розщеплення за спектром продуктів ампліфікації.



**Рис. 2.** Електрофоретичний спектр продуктів ампліфікації пари праймерів *wggm-P3-a1-L/R*, для ліній *res-31-f04-506* (робочий номер 9), *res-31-f07-507* (10), *res-19-f04-454* (11) та *res-19-f08-456* (12): М. М. – маркер мас, Aur. – Аврора, A-des. – Авродес; стрілкою вказано на наявність додаткового фрагмента для ліній *res-19-f04-454* (11) та *res-19-f08-456* (12)

Окрім того, для пояснення причини високої внутрішньолінійної мінливості не варто відкидати припущення про наявність значної кількості та різноманітності внутрішньогенних мікросателітних послідовностей у структурі генів запасних білків. З цією метою було здійснено

Для того щоб дослідити внутрішньогенні мікросателітні послідовності  $\omega$ -гліадинів, було використано пару праймерів *wggm-N-o1-L/R*, розмір очікуваного продукту від якої становив 206 п.о. Батьківські форми сорту Аврора та геномно-заміщених амфідиплоїдів дали спектр

продуктів ампліфікації, представлений двома фрагментами, а саме розміром близько 267 п.о. та 234 п.о. Аналіз електрофоретичних спектрів продуктів ампліфікації дав змогу всі проаналізовані лінії розділити на три групи, а саме: ті, які повторюють батьківський спектр; ті, які демонструють спектр, відмінний від батьківського; ті, які виявляють внутрішньолінійну мінливість. Так, до першої групи належать 54 лінії (19 ліній-похідних Авродесу, 15 – Аврозису, 20 – Авролати). До другої групи увійшли 14 ліній (1 лінія-похідна Авродесу, 13 – Аврозису). До третьої групи належать 12 ліній (1 лінія-похідна Авродесу, 11 – Аврозису). Важливо зауважити, що одна й та сама лінія могла належати до трьох вказаних вище груп. Це пояснюється тим, що кожна лінія представлена 4 зернівками.

Для аналізу мікросателітних послідовностей усередині генів  $\beta$ -гліадинів було використано пару праймерів *wggm-P3-b1-L/R*, яка мала давати розмір очікуваного продукту в 174 п.о. Реакція ампліфікації для батьківських форм Аврори та геномно-заміщених дала продукт, який був представлений двома компонентами розміром близько 213 п.о. та 192/184 п.о. Мікросателітний аналіз показав, що всі досліджувані 60 інтрогресивних ліній не відрізняються як між собою (не виявляють внутрішньолінійного розщеплення), так і від батьківських форм за кількістю фрагментів амплікону та за їхнім розміром. У цьому випадку нам не вдалося виявити поліморфізм за мікросателітними послідовностями всередині генів  $\beta$ -гліадинів, своєю чергою це може бути свідченням того, що пара праймерів підібрана до мікросателітів, що не виявляють різниці в проаналізованих нами лініях-похідних. Натомість, можливо, зміна умов реакції ампліфікації або ж підбір іншої пари праймерів викликали би певну відмінність у розмірах мікросателітних послідовностей.

Аналіз мікросателітних послідовностей усередині генів  $\alpha$ -,  $\beta$ - та  $\omega$ -гліадинів, а також компонентів білкового спектра гліадинів дав змогу виокремити лінії, які відрізняються від батьківських форм як на рівні спектра запасних білків, так і на мікросателітному рівні. Варто нагадати, що жодна із 60 досліджуваних ліній не повторювала батьківський спектр гліадинів і жодна не демонструвала мінливості у спектрі продукту ПЛР з праймерами до мікросателітних локусів генів  $\beta$ -гліадинів. Це означає, що із 60 ліній було виявлено 25 ліній, які показують відмінність від батьківських форм за білковим спектром та мікросателітними послідовностями (до генів  $\alpha$ - та  $\omega$ -гліадинів). Серед похідних Авродесу таких 9 ліній. Із 20 ліній-похідних Аврозису за

аналогічними критеріями різницю показали 16 ліній. Лінії-похідні Авролати демонстрували мінливість за компонентами білкового спектра, проте були гомогенними за спектром продуктів реакції ампліфікації. Тому в цьому випадку ми їх не враховуємо в загальну кількість ліній, які демонструють мінливість як на рівні спектра запасних білків, так і мікросателітів.

Із 25 ліній неоднорідний гліадиновий спектр білків для 4 зернівок був у 4 ліній. Ці лінії були однорідні між собою за розміром компонентів амплікону внутрішньогенних мікросателітів генів  $\alpha$ -гліадинів, але відрізнялись від батьківських форм. Більше того, їхні мікросателітні послідовності всередині генів  $\beta$ -гліадинів та  $\omega$ -гліадинів узагалі не відрізнялись за розміром як між собою, так і з батьківськими формами. Це може означати, що внутрішньолінійна мінливість, яка проявляється в гліадиновому спектрі білків, спричинена не мікросателітними послідовностями в тих ділянках генів, які досліджувались: 288–306 (CAG)<sub>6</sub>, 307–330 (CAA)<sub>8</sub> ( $\alpha$ -гліадини), 91–102 (CAC)<sub>4</sub>, 103–132 (CAA)<sub>10</sub> ( $\beta$ -гліадини), 378–410 (CAA)<sub>8</sub> ( $\omega$ -гліадини). Водночас це не виключає можливості ролі інших мікросателітних локусів та ретротранспозонів, які нами не досліджувались, у формуванні мінливого білкового фенотипу цих ліній. Натомість мінливість білкового фенотипу, яка проявляється в порівнянні з батьківськими формами, може бути спричинена мінливістю мікросателітних локусів генів  $\alpha$ -гліадинів.

Разом з цим 3 лінії-похідні Аврозису виявляли неоднорідний білковий спектр для 4 зернівок. Вони демонстрували внутрішньолінійну мінливість у білковому спектрі гліадинів. Ці лінії відрізнялись від батьківських форм і у випадку використання праймерів до  $\alpha$ - та  $\omega$ -гліадинів, оскільки демонстрували нові компоненти спектра. Саме у випадку внутрішньогенних мікросателітних послідовностей генів  $\omega$ -гліадинів ці лінії виявили неоднорідність спектра для 4 зернівок. Разом з тим використання праймерів до мікросателітних локусів  $\alpha$ -гліадинів показало, що ці лінії відрізняються від батьківських форм, проте є однорідними між собою.

Таким чином, у частини інтрогресивних ліній, які не повторюють батьківський спектр запасних білків, спостерігалась різниця для розміру мікросателіта в цьому гені, у порівнянні з батьківськими. Поліморфізм на рівні компонентів білкового спектра, що відрізняє ці лінії від батьківських форм, може бути спричинений змінами розмірів мікросателітних послідовностей усередині генів гліадинів.

### Висновки

1. За електрофоретичним спектром запасних білків (глутенінів та гліадинів) та внутрішньогенних мікросателітних локусів проаналізовано 60 ліній м'якої пшениці інтрогресивного походження. За електрофоретичним спектром гліадинів жодна із 60 ліній повністю не повторює спектр сорту Аврора чи геномно-заміщених амфідиплоїдів. Натомість виявлено 13 ліній, які демонструють внутрішньолінійну мінливість за спектром. Так, із 60 проаналізованих ліній 58 виявляють щонайменше 1 новий компонент гліадинового спектра, що не характерний для батьківських форм. Усі лінії демонструють втрату частини батьківських компонентів. Найчастіше зміни в компонентному складі спостерігаються в зоні  $\omega$ -,  $\gamma$ -,  $\alpha$ -гліадинів і дещо рідше в зоні  $\beta$ -гліадинів.

2. Аналіз електрофоретичного спектра високомолекулярних глутенінів із 60 інтрогресивних ліній дав змогу виявити 9 ліній, які

повторюють спектр сорту Аврора. Жодна лінія не повторює електрофоретичний спектр геномно-заміщених амфідиплоїдів. Загалом ідентифіковано 25 інтрогресивних ліній-похідних, які демонструють внутрішньолінійну мінливість за спектром високомолекулярних глутенінів.

3. Аналіз електрофоретичних спектрів мікросателітів у генах  $\alpha$ -гліадинів виявив, що із 60 ліній-похідних 42 повторюють батьківський спектр продуктів реакції ампліфікації.

4. У дослідженні внутрішньогенних мікросателітних послідовностей генів  $\omega$ -гліадинів виявлено, що із 60 ліній-похідних внутрішньолінійне розщеплення за електрофоретичним спектром продуктів ампліфікації виявляють 12.

5. Загалом ідентифіковано 3 лінії, для яких показано зв'язок між мінливістю в гліадиновому спектрі та поліморфізмом за мікросателітними локусами всередині генів  $\omega$ -гліадинів стосовно батьківських форм.

### Список літератури

- Levy A. A. Polymorphism and genetic control of high molecular weight glutenin subunits in wild tetraploid wheat *Triticum turgidum* var. *dicoccoides* / A. A. Levy, G. Galili, M. Feldman // *J. Heredity*. – 1988. – Vol. 61. – P. 63–72.
- Anderson O. D. The  $\alpha$ -gliadin gene family. II. DNA and protein sequence variation, subfamily structure, and origins of pseudogenes / O. D. Anderson, F. C. Greene // *J. Theor. Appl. Genet.* – 1997. – Vol. 95. – P. 59–65.
- The wheat  $\omega$ -gliadin genes: structure and EST analysis / O. D. Anderson, Y. Q. Gu, X. Kong [et al.] // *J. Funct. Integr. Genomics*. – 2009. – Vol. 9. – P. 397–410.
- A new class of wheat gliadin genes and proteins / O. D. Anderson, L. Dong, N. Huo, Y. Q. Gu // *J. PLOS ONE*. – 2012. – Vol. 7, № 12. – P. 1–9.
- Izadi-Darbandi A. Marker-assisted selection of highmolecular weight glutenin alleles related to bread-making quality in Iranian common wheat (*Triticum aestivum* L.) / A. Izadi-Darbandi, B. Yazdi-Samadi // *J. Genetics*. – 2012. – Vol. 91, № 2. – P. 193–198.
- The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain / R. P. Shewry, G. N. Halford, S. P. Belton, A. S. Tatham // *J. Phil. Trans. R. Soc. Lond.* – 2002. – Vol. 357. – P. 133–142.
- Zhirov E. G. Investigation on wheat cytogenetics at Krasnodar Lukyanenko Research Institute of Agriculture / E. G. Zhirov, T. K. Ternovskaya, K. S. Bessarab // *EWAC Newsletter*. – Plant Breeding Inst., Cambridge, 1986. – P. 48–52.
- Антонюк М. З. Створення та генетичне маркування ліній пшениці з хромосомами трьох видів егілопу : дис. ... канд. біол. наук : 03.00.15 / Антонюк Максим Зиновійович. – К., 1995. – 163 с.
- Жиров Е. Г. Геномная инженерия у пшеницы / Е. Г. Жиров, Т. К. Терновская // *Вестник сельскохозяйственной науки*. – 1984. – № 10. – С. 58–66.
- Михайлик С. Ю. Генетична варіабельність інтрогресивних ліній м'якої пшениці за генами *GLI* / С. Ю. Михайлик, М. З. Антонюк, Т. К. Терновська // *Наукові записки НаУКМА*. – 2011. – Т. 119 : Біологія та екологія. – С. 8–13.
- Михайлик С. Ю. Можливі молекулярні механізми мінливості гліадинових генів в інтрогресивних лініях пшениці / С. Ю. Михайлик, М. З. Антонюк, Т. К. Терновська // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. – 2014. – Т. 14. – С. 62–66.
- Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *J. Nature*. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
- Dvorak J. Discovery and mapping of wheat *Ph1* suppressors / J. Dvorak, K. R. Deal, M.-C. Luo // *Genetics*. – 2006. – Vol. 174. – P. 17–27.

A. Kyriyenko, S. Mykhailyk, M. Antonyuk

### POLYMORPHISM OF *GLU* AND *GLI* GENES OF COMMON WHEAT INTROGRESSIVE LINES WITH STABLE SPIKE MORPHOLOGY

*In our research we studied introgressive common wheat (Triticum aestivum L.) lines, which have alien genetic material from Aegilops speltoides Tausch, Ae. sharonensis Eig., Ae. umbellulata Zhuk. The study of electrophoretic spectra of components of storage proteins gliadins and glutenins and analysis of introgenic microsatellite sequences of gliadin genes demonstrated variability of Glu and Gli genes. Among the studied lines introgenic heterogeneity was identified not only at the level of storage proteins, but also for introgenic microsatellite sequences.*

**Keywords:** common wheat introgressive lines, gliadins, glutenins, variability, introgression, microsatellites.

Матеріал надійшов 05.10.2015