

ВАРІАБЕЛЬНІСТЬ ВНУТРІШНЬОГЕННИХ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ПОВТОРІВ ГЕНІВ α -, β - ТА ω -ГЛІАДИНІВ В ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЯХ ПШЕНИЦІ

Гени запасних білків пшениці, зокрема гліадинів, завдяки кластерному розташуванню, високому рівню поліморфізму та особливостям структури є зручною моделлю для дослідження впливу інтрогресивного генетичного матеріалу на резидентний геном. У геномах інтрогресивних ліній привнесения чужинного генетичного матеріалу запускає процеси, які спричиняють структурні та функціональні зміни [1], і вивчення мінливості гліадинових генів є зручним інструментом для дослідження молекулярних особливостей цих процесів. Ще одна причина використання генів гліадинів для дослідження геномів у стані стресу полягає у функції гліадину як білка ендосперму, що є джерелом запасних речовин, з чого випливає, що гени гліадинів знаходяться під відносно низьким тиском природнього добору, а отже зміна у структурі таких генів не призводить до істотних змін функцій відповідного кодованого продукту. Під час попереднього дослідження інтрогресивних ліній м'якої пшениці, що походять від схрещування трьох геномно-заміщених амфідиплоїдів, Авродес, Авролата та Аврозис, з сортом Аврора, було встановлено, що електрофоретичний спектр гліадинів демонструє високий рівень мінливості при порівнянні спектрів різних ліній, а також різних рослин однієї і тієї самої лінії [2]. Гліадини складаються з мономерних білків і залежно від швидкості руху у поліакриламідному гелі за денатуруючих умов поділяються на 4 групи: α , β , γ та ω [3]. Попереднє вивчення розподілу поліморфних компонентів гліадинів інтрогресивних ліній м'якої пшениці продемонструвало, що більшість таких компонентів знаходиться у ω -зоні, рідше – у γ - та β -зонах та зовсім рідко – у α -зоні. Однак, такі особливості розподілу поліморфних компонентів, вочевидь не пов'язані зі структурними особливостями відповідної групи гліадинів, а скоріше є наслідком відмінностей у роздільній здатності та розмірах цих зон у електрофоретичному спектрі.

Гени гліадинів мають структурні особливості, характерні для всіх типів гліадинів, не зале-

жачи від швидкості руху у ПЛАГ – це наявність повторюваного домену(нів) та одного або двох поліглутамінових доменів. Такі домени (тракти) складаються з великої кількості тринуклеотидних повторів САА або САГ, що кодують глутамін [4]. Повтори триплетів у поліглутаміновому домені утворюють внутрішньогенні мікросателіти. Як відомо, мікросателітні послідовності можуть слугувати причиною проходження нерівного кросинговеру, а також спричиняти проковзування полімерази при реплікації, що є основним джерелом мутацій у мікросателітних локусах [5]. Такі мутації можуть бути причиною змін у послідовності гліадинових генів, що виражається у їхньому поліморфізмі. При вивченні гліадинових генів інтрогресивних пшеничних ліній – похідних Авродесу раніше нами було встановлено, що саме перебудови у мікросателітних локусах є причиною поліморфізму досліджуваних ліній за ПЛР-спектром α -, β - та ω -гліадинів [6]. Метою нашої роботи було з'ясування того, чи будуть характеризуватись подібним поліморфізмом за гліадиновими генами інші інтрогресивні лінії м'якої пшениці, похідні Авролати та Аврозису, які мають на тлі резидентного геному сорту Аврора чужинний хроматин іншого походження.

Матеріали і методи

ДНК виділяли з чотирьох різних зернівок за стандартною методикою з модифікаціями [7]. У дослідженні використовувалися три пари праймерів, послідовності яких були розроблені нами для попереднього дослідження мікросателітів гліадинів таким чином, щоб кожна пара характеризувала внутрішньогенну мікросателітну ділянку генів гліадинів і ділянки, що фланкують дані мікросателіти [6]. Перша пара праймерів, wggm-P3-b1-L/R, була розроблена для ампліфікації внутрішньогенної мікросателітної ділянки гена β -гліадину (GeneBank: AF419254.1). Праймери wggm-P3-b1-L/R характеризують ділянку (САС)₄ у положенні 91-102 та ділянку (САА)₁₀ у положенні 103-132 і фланкуючі послідовності цю-

го внутрішньогенного мікросателіту гена β -гліадину. Розмір очікуваного продукту ампліфікації становить 129 пар нуклеотидів. Праймери wggm-P3-a1-L/R є специфічними до α -гліадинового гена (GeneBank: AJ133604.1) і характеризують мікросателітну ділянку (CAG)₆ у положенні гена 288-306 та ділянку (CAA)₈ у положенні 307-330, а також фланкуючі послідовності цієї мікросателітної послідовності; розмір очікуваного продукту ампліфікації становить 177 пар нуклеотидів. Праймери wggm-N-o1-L/R є специфічними до ω -гліадину (GeneBank: DQ861428.1) і характеризують мікросателітну ділянку (CAA)₈ у положенні 378-410 гена та її фланкуючі послідовності; розмір очікуваного продукту ампліфікації становить 206 пар нуклеотидів [6]. Реакція ампліфікації була проведена за модифікованою методикою Рьодер [8]. Отримані результати ПЛР порівнювалися з використанням електрофорезу ампліфікованої ДНК у 2 % агарозному гелі.

ДНК виділяли з чотирьох різних зернівок за стандартною методикою з модифікаціями [7]. У дослідженні використовувалися три пари праймерів, послідовності яких були розроблені нами для попереднього дослідження мікросателітів гліадинів таким чином, щоб кожна пара характеризувала внутрішньогенну мікросателітну ділянку генів гліадинів і ділянки, що фланкують дані мікросателіти [6]. Перша пара праймерів, wggm-P3-b1-L/R, була розроблена для ампліфікації

внутрішньогенної мікросателітної ділянки гена β -гліадину (GeneBank: AF419254.1). Праймери wggm-P3-b1-L/R характеризують ділянку (CAC)₄ у положенні 91-102 та ділянку (CAA)₁₀ у положенні 103-132 і фланкуючі послідовності даного внутрішньогенного мікросателіту гена β -гліадину. Розмір очікуваного продукту ампліфікації становить 129 пар нуклеотидів. Праймери wggm-P3-a1-L/R є специфічними до α -гліадинового гена (GeneBank: AJ133604.1) і характеризують мікросателітну ділянку (CAG)₆ у положенні гена 288-306 та ділянку (CAA)₈ у положенні 307-330, а також фланкуючі послідовності даної мікросателітної послідовності, розмір очікуваного продукту ампліфікації становить 177 пар нуклеотидів. Праймери wggm-N-o1-L/R є специфічними до ω -гліадину (GeneBank: DQ861428.1) і характеризують мікросателітну ділянку (CAA)₈ у положенні 378-410 гена та її фланкуючі послідовності, розмір очікуваного продукту ампліфікації становить 206 пар нуклеотидів [6]. Реакція ампліфікації була проведена за модифікованою методикою Рьодер [8]. Отримані результати ПЛР порівнювалися з використанням електрофорезу ампліфікованої ДНК у 2% агарозному гелі.

Результати та обговорення

Очікуваним результатом ПЛР з використанням праймерів wggm-P3-a1-L/R є компонент розміром 164 п.н. Шляхом оптимізації процесу амп-

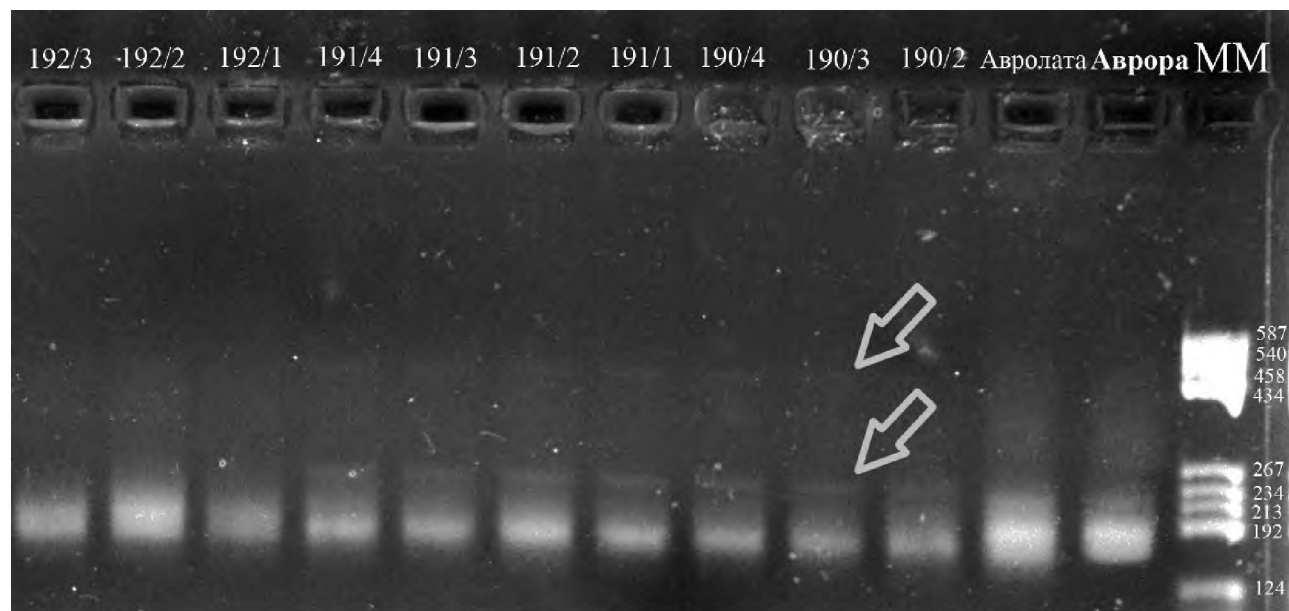


Рис. 1. Електрофоретичний спектр продуктів ампліфікації ДНК з праймерів wggm-P3-a1-L/R. Стрілками вказані додаткові компоненти. Числами вказано робочі назви інтрогресивних ліній, які враховують генерацію, після косої – номер зернівки. ММ – маркер мас. 190 – лінія res 189, 191 – res 189, 192 – res 195/2

ліфікації компонент спектру з розміром близько 160 пар нуклеотидів вдалося отримати у всіх лініях, які досліджували. Зернівки № 2, 3 та 4 лінії 190 та зернівки № 1, 2, 3 та 4 лінії 191 (лінії 190 та 191 є лінією res 189 у двох різних генераціях) демонстрували у своєму спектрі ампліфікації наявність додаткового компонента з розміром приблизно 220 пар нуклеотидів та мінорного додаткового компонента з довжиною приблизно 460 пар нуклеотидів (рис. 1).

Інтрогресивні лінії 206 (res 218), 207 (res 218), 210 (res 222) та 211 (res 222) демонстрували у своєму спектрі наявність двох компонентів: один з очікуваним розміром близько 160 пар нуклеотидів, інший з довжиною близько 150 пар нуклеотидів. Зернівки № 3 та 4 лінії 163 (res 121) та зернівки № 1 та 2 лінії 164 (res 122-1) також мали відмінність від спектру батьківських генотипів Аврора та Аврозису у вигляді додаткового компонента розміром приблизно 220 пар нуклеотидів. Зернівка № 1 та 2 лінії 178 (res 143), усі зернівки лінії 177 (res 143), 175 (res 143) та зернівки № 2, 3 та 4 лінії 174 (res 142) мали по два компоненти у своєму спектрі – один з очікуваним розміром близько 160 пар нуклеотидів, інший з масою 220 нуклеотидів. Зернівка № 1 лінії 174 (res 142) демонструвала у своєму спектрі наявність трьох компонентів з розміром близько 160, 190 та 220 пар нуклеотидів.

У ПЛР з використанням праймерів wggm-P3-b1-L/R утворюється продукт з очікуваним розміром 174 пари нуклеотидів. Усі досліджувані лінії мали у своєму спектрі компонент з довжиною близько 170 пар нуклеотидів. Компоненти батьківських форм Аврора, Аврозис та Аврлата демонстрували у своєму спектрі наявність додаткового мінорного компонента з розміром близько 250 пар нуклеотидів. Присутність такого ж компонента демонстрували зернівки ліній

189 (res 189), 190 (res 189), 191 (res 189), 192 (res 195/2), 193 (res 195/2), 194 (res 195/2), 195 (res 199), 196 (res 202). Електрофоретичний спектр ліній 197 (res 206), 199 (res 207), 200 (res 207), 201 (res 211) та 202 (res 217) демонстрував у своєму спектрі наявність додаткового мінорного компонента з довжиною близько 420 пар нуклеотидів, а також ще один додатковий компонент який мав довжину близько 80 пар нуклеотидів (можливо, це ДНК праймерів). Такий самий спектр був також притаманний лініям 169 (res 132), 170 (res 139-1), 172 (res 139-1), 174 (res 142) та 175 (res 143).

Маса очікуваного компонента, отриманого з використання праймерів wggm-N-o1-L/R, складає 206 пар нуклеотидів. Шляхом ампліфікації компонент спектру з розміром близько 210 пар нуклеотидів вдалося отримати у всіх досліджуваних інтрогресивних лініях. Компоненти зернівок ліній 185 (res 164), 186 (res 177) та 187 (res 177) мали у своєму спектрі три компоненти: мінорний компонент з довжиною приблизно 190 пар нуклеотидів та основний нечіткий компонент, який демонстрував молекулярну масу 210-220 (ймовірно, цей компонент складається з двох компонентів зі схожим розміром – 210 та 220 пар нуклеотидів). Зернівка № 1 лінії 189 (res 189) у своєму спектрі демонструвала відсутність компонента з довжиною 220 п.н. Спектри ліній 153 (res 113), 199 (res 207), 200 (res 207), 204 (res 217), 206 (res 218), 207 (res 218), 210 (res 222), 211 (res 222), 215 (res 250), 216 (res 254), 217 (res 254) та 218 (res 254) демонстрували наявність додаткового компонента з розміром близько 550 пар нуклеотидів (рис. 2). Зернівка № 1 лінії 193 та зернівки № 3 і 4 лінії 197 також мали додатковий компонент розміром 550 пар нуклеотидів у своєму спектрі. Такий компонент також демонстрував спектр Аврлати. У спектрах усіх інших ліній

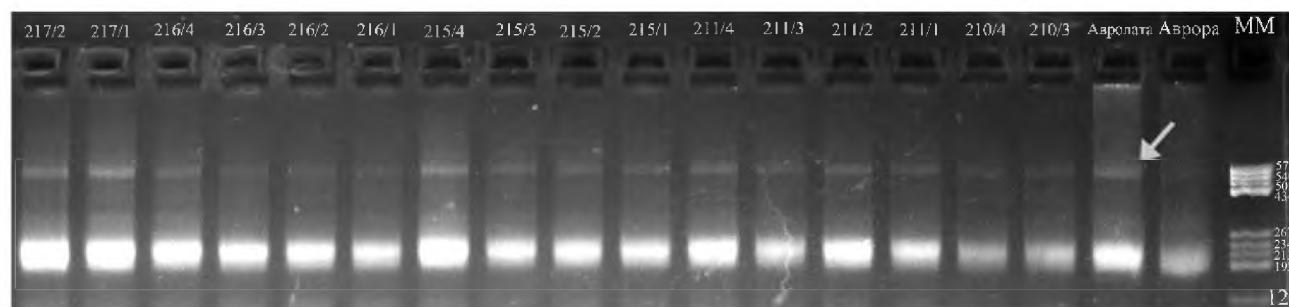


Рис. 2. Електрофоретичний спектр продуктів ампліфікації ДНК з праймерами wggm-N-o1-L/R. Стрілкою вказано додатковий компонент. Числами вказано робочі назви інтрогресивних ліній з номером зернівки. MM – маркер мас. 210 – лінія res 222, 211 – res 222, 215 – res 250, 216 – лінія res 254, 217 – лінія res 254

ній компонент з розміром близько 550 пар нуклеотидів був відсутній.

Скринінг інтрогресивних ліній – похідних геномно-заміщених форм Авролати та Аврозису на наявність поліморфних компонентів у спектрі ампліфікації мікросателітних локусів гліадинів підтвердив результати, отримані у попередньому дослідженні, де вивчалися інтрогресивні лінії – похідні Авродесу. Наявність таких поліморфних компонентів є свідченням перебудов, що виникають у мікросателітних локусах генів гліадинів або прилеглих до них ділянках. Додаткові компоненти спектру є характерними як для інтрогресивних ліній, що походять від Авролати та Аврозису так і для інтрогресивних ліній – похідних Авродесу, а отже факт наявності такого компонента не залежать від джерела інтрогресії. Лінії, які залучались до цього та попереднього досліджень, характеризувались перманентною мінливістю за декількома ознаками морфології пшеничної рослини, за якими зручно стежити: остистість, воскова осуга, опушення та колір луски [9]. Молекулярні механізми, що лежать в основі такої мінливості, ще лише вивчаються. Щодо гліадинових генів, які виявились зручною моделлю для вивчення мінливості усередині геномів інтрогресивних ліній, їхнє дослідження із залученням інтрогресивних ліній такого самого походження, але із стабільним виразом згаданих ознак морфології виявило відсутність поліморфізму за гліадиновими генами також [10]. Вочевидь, перебудови, що відбуваються у мікросателітних локусах гліадинів, викликаються через дію молекулярних механізмів, які зачіпають інші гени, в яких може і не бути мікросателітних повторів. Раніше нами було отримано дані на користь припущення про участь транспозонів у продукуванні мінливості, яку ми спостерігаємо на електрофоретичних спектрах гліадинів [6]. Можливо, задіяність транспозонів у багатьох процесах, що регулюють експресію генів, у тому числі, за участю мікро-РНК [11], може впливати на фенотипну

мінливість усередині ліній поряд із безпосередньою зміною нуклеотидних послідовностей, які викликаються рухом транспозонів.

Висновки

Інтрогресивні гексаплоїдні лінії пшениці, одержані від схрещування сорту Аврора з геномно-заміщеними формами Аврозис та Авролати, демонструють поліморфізм за спектрами ампліфікації внутрішньогенних мікросателітних повторів. Використання праймерів P3-a1-L/R, специфічних до внутрішньогенного мікросателіту α -гліадину (GeneBank: AJ133604.1), з ДНК інтрогресивних ліній, продемонструвало, що 14 ліній мають у своєму спектрі додаткові компоненти. 18 інтрогресивних ліній під час реакції ампліфікації з використанням праймерів P3-b1-L/R, специфічних до внутрішньогенного мікросателіту β -гліадину (GeneBank: AF419254.1), також мали у своєму спектрі додаткові компоненти. Використання праймерів N-o1-L/R, специфічних до внутрішньогенного мікросателіту ω -гліадину (GeneBank: DQ861428.1), показує, що 17 інтрогресивних ліній мають у своєму спектрі один або два додаткових компоненти. Виявлений упродовж дослідження поліморфізм свідчить про наявність перебудов у поліглутамінових трактах генів гліадинів або прилеглих до них ділянок. Можливо, ці перебудови самі по собі або разом з іншими факторами слугують причиною появи додаткових компонентів у гліадинових спектрах досліджуваних інтрогресивних ліній.

Використання ліній з інтрогресіями різного походження продемонструвало, що джерело інтрогресії не впливає на перебудови у мікросателітних локусах досліджуваних генів гліадинів. Вочевидь, поява таких перебудов пов'язана з процесами, які спричиняють структурні та функціональні зміни у резидентних геномах у відповідь на привнесення чужинного генетичного матеріалу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Kashkush K., Feldman M., Levy A. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid // *Genetics*. – 2002. – 160, No 4. – P. 1651–1659.
2. Михайлик С.Ю., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Генетична варіабельність інтрогесивних ліній м'якої пшениці за генами *Gli* // Наукові записки НаУКМА. Біологія та екологія. – 2011. – 119. – С. 8–14.
3. Metakovsky E. V., Novoselskaya A. Y., Sozinov A. A. Genetic analysis of gliadin components in winter wheat using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis // *Theoretical and applied genetics*. – 1984. – 69, No 1. – P. 31–37.
4. Anderson O. D., Greene F. C. The α -gliadin gene family // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1997. – 95, N 1–2. – P. 59–65.
5. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution // *Nature reviews. Genetics*. – 2004. – 5, N 6. – P. 435–445.
6. Mykhailyk S. Y., Antonyuk M. Z., Ternovska T. K. Possible molecular mechanisms of variability in gliadin genes in the wheat introgressive lines // *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. – 2014. – 1. – P. 21–29.
7. Pervaiz Z. H., Turi N. A., Khaliq I. Methodology: a modified method for high-quality DNA extraction for molecular analysis in cereal plants // *Genetics and molecular research*. – 2011. – 10, N 3. – P. 1669–1673.
8. Röder M. S., Korzun V., Wendehake K. A microsatellite map of wheat // *Genetics*. – 1998. – 149, No 4. – P. 2007–2023
9. Antonyuk M. Z., Shpylychyn V. V., Ternovska T. K. Permanent genetic variability in the introgressive lines and amphidiploids of *Triticeae* // *Cytology and Genetics*. – 2013. – 47, N 4. – P. 242–251.
10. Кирієнко А.В., Михайлик С.Ю., Антонюк М.З. Поліморфізм за генами *Glu* та *Gli* в інтрогесивних лініях м'якої пшениці, стабільних за ознаками морфології // Наукові записки НаУКМА. Біологія та екологія. – 2015. – 171. – С. 17–25.
11. Yaakov B., Kashkush K. Methylation, transcription and rearrangements of transposable elements in synthetic allopolyploids // *Intern. J. of Plant Genomics*. – 2011. doi:10.1155/2011/569826.

MYKHAILYK S.YU., MARTYNENKO V.S., ANTONYUK M.Z.

National University of "Kyiv-Mohyla Academy",

Ukraine, 04070, Kyiv, Skovorody str., 2, e-mail: sermuraha@gmail.com

THE VARIABILITY OF INTRAGENIC MICROSATELLITE REPEATS OF α -, β - AND ω -GLIADINS IN WHEAT INTROGRESSIVE LINES

Aim. To determine whether introgressive lines derived from Aurolata and Aurosis demonstrate polymorphism within their *Gli* genes similar to lines derived from Aurodes. **Methods.** PCR using primers specific to intragenic microsatellites of *Gli* genes. **Results.** Polymorphism in nucleotide sequences of three *Gli* genes encoding proteins in α -, β - and ω -zone of the spectrum was identified. Appearance of additional components in the spectrum is typical for introgressive lines originating from Aurolata and Aurosis as well as for introgressive lines originating from Aurodes. **Conclusions.** Probably, the gliadin electrophoretic spectra variability in introgressive lines is based on changes that occurred in the nucleotide sequences of *Gli* intragenic microsatellites or/and their adjacent regions. The introgression from particular amphidiploid does not affect rearrangements in microsatellite loci of investigated gliadin genes.

Keywords: gliadin, *Gli* genes, wheat introgressive line, intragenic microsatellite.