

ПОЛІМОРФІЗМ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ *TRITICUM AESTIVUM* / *AMBLYPYRUM MUTICUM* ЗА ГЕНОМ *AGL21*, ПРОМОТОРОМ РОЗВИТКУ КОРЕНІВ

Особливості будови кореневої системи та її зміни у відповідь на зміну умов зростання є важливими для пристосування рослини до специфічних умов довкілля, до оптимального використання присутньої в ґрунті води і мінеральних речовин [1]. Створення сортів рослин, зокрема пшениці, з оптимальними характеристиками кореневої системи теоретично дозволить отримати кращі врожаї навіть за умов абіотичних стресів (посуха, низькі температури у зимовий період) та, можливо, з використанням меншої кількості добрив [2]. Отже, дослідження характеристик кореневої системи і генів, що контролюють розвиток коренів, є важливим і може мати практичну цінність.

Дикорослі родичі пшениці, що використовуються як джерела генів стійкості до різних хвороб пшениці, також можуть бути використані для збагачення генофонду пшениці генами, що беруть участь у контролі розвитку кореня і можуть забезпечити утворення такої кореневої системи, яка зумовить кращу пристосованість рослин пшениці до певних абіотичних стресів. *Amblyopyrum muticum* (*Aegilops mutica*) є диплоїдним дикорослим родичем пшениці. Цей вид має геном Т, який характеризується значним рівнем гомології з D геномом пшениці, і хромосоми двох геномів можуть кон'югувати [3]. Геномно-заміщений амфідиплоїд Авротіка (AABBTT) був створений Жировим і Терновською [цит. за 4], і об'єднує у своєму геномі тетраплоїдний компонент сорту м'якої пшениці Аврора (AABB) і Т геном виду *A. muticum*. Авротіка характеризується кращою зимостійкістю, порівняно з сортом Аврора, та більш розвиненою кореневою системою. На сьогодні вже показано, що коренева система злаків теплого клімату формується по-іншому порівняно зі злаками, які є озимими та можуть витримувати зимові стреси [5]. Ми припускаємо, що властивості кореневої системи Авротіки сприяють її кращій зимостійкості та можуть бути зумовлені генами Т геному *A. muticum*.

Основним фітогормоном в сигналюванні для регуляції розвитку коренів у покритонасінних є ауксин. Зокрема, формування примордіїв бічних коренів регулюється через його градієнт [6]. Гени *AGL21* та *AGL14* кодують MADS box транскрипційні фактори. Перший позитивно регулює накопичення ауксину в примордіях бічних коренів через позитивну регуляцію біосинтезу ауксину. Ауксин стимулює ініціацію і ріст бічних коренів, отже ген *AGL21* впливає на архітектуру кореневої системи рослини через ауксин [7]. Продукт гена *AGL14* впливає на транспорт ауксину [8]. Крім того, доведено, що морозостійкість злаків залежить від гена *CBF-A14*, який кодує транскрипційний фактор CBF (C-repeat Binding Factor) – один з родини транскрипційних факторів, що є основними транскрипційними регуляторами морозостійкості рослин [9].

У статті наведено результати дослідження поліморфізму раніше створених нами інтрогресивних ліній *T. aestivum* / *A. muticum* [10] та вихідних генотипів за генами *AGL21*, *AGL14* та *CBF-A14* з метою встановити, чи відрізняються лінії з алелями, властивими Авротіці, від ліній з алелями, властивими Аврорі, за ступенем збереження після зимування в польових умовах.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал. У роботі використовували такий рослинний матеріал: сорт м'якої озимої пшениці Аврора (AABBDD), геномно-заміщений амфідиплоїд Авротіка (AABBTT), що об'єднує в своєму геномі тетраплоїдний компонент сорту Аврора (AABB) та Т геном диплоїдного виду *Amblyopyrum muticum*, та набір інтрогресивних ліній, що походять від схрещування Аврора x Авротіка та наступного самозапилення.

Успішність перезимівлі оцінювали як кількість рослин, які збереглися і почали вегетувати навесні з тих 20 для кожної лінії, що були наявні у рядку восени. Для статистичної обробки ви-

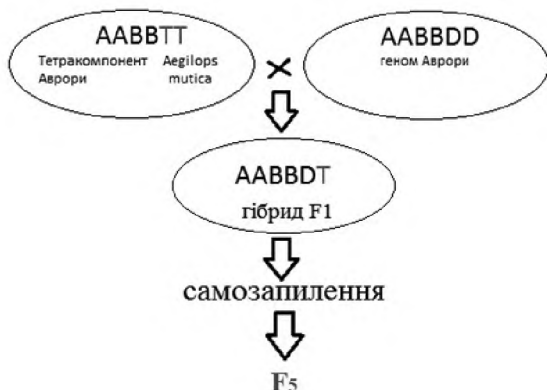


Рис. 1. Створення ліній *T. aestivum* / *A. muticum* методом заміщення геномів

користано критерії Манна-Уїтні та Колмогорова-Смірнова [11].

ДНК виділяли з листків рослин з використанням ЦТАБ буфера.

Полімеразно-ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили з праймерами до генів пшениці *Ta-AGL21*, *Ta-AGL14* та *Ta-CBF-A14*. 30 мкл ПЛР-суміші містила 250 нМ кожного праймера, 50 нг ДНК, по 0,2 мМ кожного дезокситрифосфату, 1,5 мМ $MgCl_2$, 1,2 U Taq-полімерази (Fermentas, Литва). Реакцію ПЛР проводили в ампліфікаторі Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, умови реакції відповідали тим, що були рекомендовані виробником праймерів. Послідовності праймерів до генів *Ta-AGL21*, *Ta-AGL14* та *Ta-CBF-A14* (до початку гена – 1, та до другої частини гена – 2), що були розроблені з використанням програми Primer3 [12, 13]:

TaAGL21-1-L CGGATAGAGAACCCGACGAG
TaAGL21-1-R GTCTTCATTGCCCTGATGCC

TaAGL21-2-L AATGAAGACTCGGCGGTTTG
TaAGL21-2-R TTTTCTCGAGCGTTGTCAGC

CBF-A14-1-L GATGGACGCCGCTGATGC
CBF-A14-1-R GGTGCTGCCTTTGGAACG

CBF-A14-2-L AAGGAGATCAAGGATGCCGT
CBF-A14-2-R CGAACAAGTAGCTCCATGGC

TaAGL14-1-L GATGGACGCCGCTGATGC
TaAGL14-1-R GGTGCTGCCTTTGGAACG

TaAGL14-2-L AAGGAGATCAAGGATGCCGT
TaAGL14-2-R CGAACAAGTAGCTCCATGGC

Розділення продуктів ампліфікації проводили в поліакриламідному гелі (ПААГ) за денатуруючих умов (з додаванням сечовини). Візуалі-

зацію продуктів здійснювали за допомогою нітрату срібла.

Результати та обговорення

З ДНК Аврори та Авротіки дали продукти ампліфікації всі шість пар праймерів (дві пари на кожен ген). Проте, між ДНК Аврори та Авротіки не було виявлено поліморфізму за спектрами продуктів, отриманих з праймерами до транскрипційних факторів *CBF-A14* (рис. 2) та *AGL14*. Отже, інтрогресивні лінії за цими генами не скринували.

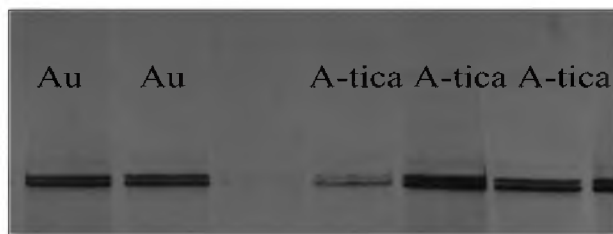


Рис. 2. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації, утворених з праймерами до гена *CBF-A14* з ДНК Аврори (Au) та Авротіки (A-tica)

Унаслідок аналізу електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації Аврори і Авротіки, утворених з розробленими праймерами до першої та другої частини гена *TaAGL21*, було показано наявність поліморфізму (один компонент для Аврора та подвійний компонент для амфідиплоїда Авротіка; рис. 3) для продуктів ампліфікації, утворених з праймерами до другої частини гена *TaAGL21* (*TaAGL21-2*). Ці праймери були використані для утворення продуктів ампліфікації з ДНК ліній похідних Авротіки та аналізу продуктів ампліфікації щодо того, чи вони є схожі за масою на продукт Авротіки, чи на продукт Аврори.

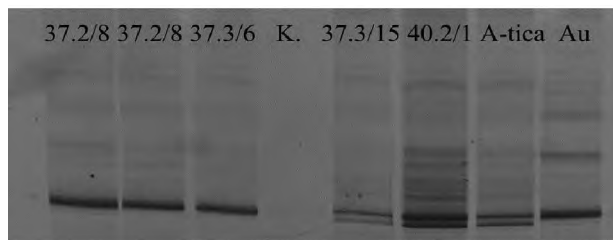


Рис. 3. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації з праймерами *TaAGL21-2*. Au – сорт Аврора (AABVDD), A-tica – геномно-заміщений амфідиплоїд Авротіка (AABVTT), 37.2/8, 37.3/6, 37.3/15, 40.2/1 – номери інтрогресивних ліній похідних Авротіки

Як видно на рисунку 3, лінії 37.3/15, 40.2/1 мають спектри, схожі на спектр амфідиплоїда

Таблиця 1

Результат оцінки зимостійкості інтрогресивних ліній з різними алелями гена *TaAGL21*

Кількість рослин, що вижили	Кількість ліній з алелем гена <i>TaAGL21</i>		Кількість рослин, що вижили	Кількість ліній з алелем гена <i>TaAGL21</i>	
	Аврори	Авротіки		Аврори	Авротіки
1	1	3	11	3	9
2	3	5	12	1	6
3	3	6	13	1	2
4	3	8	14	2	8
5	3	14	15	0	21
6	8	7	16	0	3
7	2	4	17	0	1
8	3	11	18	0	1
9	2	5	19	0	0
10	0	17	20	0	2

Авротіка (подвійний компонент), а лінії 37.2/8, 37.3/6 мають спектр, схожий на Аврору (одинарний компонент спектру). Всього серед 186 проаналізованих рослин інтрогресивних ліній (для багатьох ліній було проаналізовано більше, ніж одну рослину (покоління F_3)) було виявлено 35 рослин, що утворювали з праймерами до гена *TaAGL21-2* продукт ампліфікації, що не відрізнявся від продукту Аврори, та 133 рослин, що утворювали такий продукт ампліфікації, як Авротіка. ДНК 18-ти рослин не дала продуктів ампліфікації. Внутрішньолінійного поліморфізму щодо алелів гена *TaAGL21* не реєструвалося. Велика кількість рослин, що мали алель Авротіки, можна пояснити способом створення інтрогресивних ліній [10]. Починаючи з F_2 , рослини вирощували в польових умовах і отримували нащадків від їхнього самозапилення до F_5 . Звичайно, нащадків отримували лише від тих рослин попередньої генерації, які пережили зимові стреси та виявились фертильними. Отже, під час створення ліній відбувся природний добір рослин, здатних зимувати. Якщо зимостійкість пов'язана з формуванням кореневої системи, особливості якої залежать від експресії гена *TaAGL21* [7], можна припустити, що саме цим пояснюється, що серед інтрогресивних ліній співвідношення таких, що мають алель Аврори чи алель Авротіки відрізняється від очікуваного 1:1 на користь останніх.

Зіставлення результатів оцінки ліній за здатністю зимувати (кількість рослин, що вижили до весни з тих 20, що були у рядку восени) з їхнім генотипуванням за геном *AGL21* справляє враження, що краще перезимовують рослини з алелем цього гена, що притаманний Авротіці (табл. 1).

Перевірка статистичної значущості гіпотези про те, що лінії, які мають алель гена *AGL21*, властивий Авротіці, зимують більш успішно порівняно з лініями, що мають алель Аврори, підтвердила наявність такої відмінності. Порівняння розподілів ліній за класами з різною кількістю рослин, які вижили, методом Колмогорова-Смирнова дало величину $\lambda = 1,72$ при критичному значенні цього показника 1,63 для $p=0,01$. Зіставлення центральних тенденцій методом Манна-Уїтні підтвердило наявність різниці, оскільки $u = 3,54$ перевищує критичне значення 2,58 для $p = 0,01$.

Наведені результати мають подвійне значення для подальшої роботи з даними інтрогресивними лініями. Отримано підтвердження, що ці лінії за своєю зимостійкістю мають алель гена *AGL21*, роль якого у розвитку кореневої системи вже показана [7]. Отже, здається перспективним дослідження розвитку коренів в інтрогресивних лініях *T. aestivum / A. muticum* для з'ясування механізмів забезпечення підвищеної зимостійкості тих з них, які за цією характеристикою відрізняються від сорту Аврора. Ген *AGL21* у цьому генетичному матеріалі може слугувати генетичним маркером при скринуванні популяцій, що розщеплюються, для пошуку паростків з підвищеним потенціалом зимостійкості. Щодо популяцій, створених з іншими генотипами м'якої пшениці, маркерні властивості гена *AGL21* слід досліджувати додатково.

Висновки

Геномно-заміщений амфідиплоїд Авротіка та сорт м'якої пшениці Аврора мають відмінні продукти ампліфікації, утворені з праймерами до другої частини кодуєчої частини гена транскрипційного фактора *AGL21*, який позитивно

регулює синтез ауксину в примордіях бічних коренів і таким чином бере участь у контролі розвитку коренів. Серед 250 проаналізованих рослин інтрогресивних ліній, що походять від схрещування Аврора х Авротіка, були виявлені такі, що мають такий компонент, як Аврора (56 рослин), і такі, що мають такий компонент, як Авротіка. Лінії з алелем цього гена, властивим Авротіці, за успішністю перенесення зимових стресів перевищують лінії, яким властивий алель Аврори за геном *AGL21*. Цей ген можна використовувати як молекулярно-генетичний маркер зимостійкості при скринуванні популяцій, що розщеплюються, отриманих від схрещування інтрогресивних ліній *T. aestivum* / *A. muticum*.

сів перевищують лінії, яким властивий алель Аврори за геном *AGL21*. Цей ген можна використовувати як молекулярно-генетичний маркер зимостійкості при скринуванні популяцій, що розщеплюються, отриманих від схрещування інтрогресивних ліній *T. aestivum* / *A. muticum*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Jung J.K.H., McCouch S. Getting to the roots of it: genetic and hormonal control of root architecture // *Frontiers in Plant Sci.* – 2013. – 4, № 186. – P. 1–21.
2. Kong X., Zhang M., Smet I.D., Ding Z. Designer crops: optimal root system architecture for nutrient acquisition // *Trends in Biotech.* – 2014. – 32, № 12. – P. 597–598.
3. Ohta S. Phylogenetic relationship of *Aegilops mutica* Boiss. with the diploid species of congeneric *Aegilops-Triticum* complex, based on the new method of genome analysis using its B-chromosomes // *Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ.* – 1991. – № 137. – P. 1–116.
4. Antonyuk M.Z., Shpylchyn V.V., Ternovska T.K. Permanent genetic variability in the introgressive lines and amphidiploids of *Triticeae* // *Cytol. and Genet.* – 2013. – 47, № 4. – P. 242–251.
5. Chochois V., Vogel J.P., Watt M. Application of *Brachypodium* to the genetic improvement of wheat roots // *J. of Experim. Botany.* – 2012. – 63, № 9. – P. 3467–3474.
6. Goh T., Kasahara H., Mimura T., Kamiya Y., Fukaki H. Multiple AUX/IAA-ARF modules regulate lateral root formation: the role of *Arabidopsis* SHY2/LAA3-mediated auxin signaling // *Philosophical Transactions of The Royal Society Biological Sciences.* – 2012. – 367, № 1595. – P. 1461–1468.
7. Yu L.-H., Miao Z.-Q., Qi G.-F., Wu J., Cai X.-T., Miao J.-L., Xiang C.-B. MADS box transcription factor *AGL21* regulates lateral root development and responds to multiple external and physiological signals // *Mol. Plant.* – 2014. – 7, № 11. – P. 1653–1669.
8. Garay-Arroyo A., Ortiz-Moreno E., de la Paz Sanchez M., Murphy A.S., Garcia-Ponce B., Marsch-Martinez N., de Folter S., Corvera-Poire A., Jaimes-Miranda F., Pacheco-Escobedo M.A., Dubrovsky J.G., Pelaz S., Alvarez-Buylla E.R. The MADS transcription factor *XAL2/AGL14* modulates auxin transport during *Arabidopsis* root development by regulating *PIN* expression // *The EMBO Journal.* – 2013. – 32, № 1. – P. 2884–2895.
9. Medina J., Catala R., Salinas J. The CBFs: three *Arabidopsis* transcription factors to cold acclimate // *Plant Sci.* – 2011. – 180, № 1. – P. 3–11.
10. Iefimenko T., Antonyuk M., Ternovska T. Development of introgressive lines *Triticum aestivum* / *Aegilops mutica* resistant to powdery mildew by the method of chromosome mixing // *Disease Risk and Food Security. Proceedings of the 13th International Cereal Rust and Powdery Mildews Conference.* 28 Aug. – 1 Sep. 2012. – P. 154–155.
11. Малета Ю.С., Тарасов В.В. Непараметрические методы статистического анализа в биологии и медицине. – М.: Изд-во Московского университета, 1982. – 178 с.
12. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. Primer3 – new capabilities and interfaces // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – 40, № 15. – P. e115.
13. Koressaar T., Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3 // *Bioinformatics.* – 2007. – 23, № 10. – P. 1289–1291.

IEFIMENKO T.S., ANTONYUK M.Z., TERNOVSKA T.K.

National University of “Kyiv-Mohyla Academy”,

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

TRITICUM AESTIVUM/AMBLYOPYRUM MUTICUM INTROGRESSIVE LINES POLYMORPHISM OF *AGL21* GENE, WHICH IS PROMOMOR OF ROOT DEVELOPMENT

Aim. Investigate *T. aestivum* / *A. muticum* introgressive lines and their parental genotypes for polymorphism at genes *AGL21*, *AGL14* and *CBF-A14*, and determine whether lines with Aurotica alleles differ from the lines with Aurora alleles for the winter field survival. **Methods.** PCR with primers specific to the coding region of wheat *AGL21*, *AGL14*, and *CBF-A14* genes, electrophoresis in PAAG in denaturing conditions, visualization by silver staining. **Results.** No polymorphism was found between Aurora and Aurotica for amplification products produced with primers *AGL14* and *CBF-A14* gene. With primers to second part of the *AGL21* gene Aurora and Aurotica produced polymorphic products, and these primers were used for analysis of introgressive lines, the results of this analysis were compared to lines' persistency under winter stress. **Conclusions.** Lines with Aurotica allele of gene *AGL21* have better persistency under winter stress. Gene *AGL21* may be used as molecular marker for winter resistance in segregating populations.

Keywords: wheat introgressive lines, winter resistance, *AGL21*, *Amblyopyrum muticum*, auxin.