

ЗАЙКА Є. В.¹✉, КОЗУБ Н. О.^{2,3}, СОЗИНОВ І. О.², БІДНИК Г. Я.^{2,3}, КАРАЖБЕЙ П. П.¹¹ ННЦ «Інститут землеробства НААН»,

Україна, 08163, смт. Чабани, Києво-Святошинський р-н, вул. Машинобудівників, 2б

² Інститут захисту рослин НААН,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 33

³ Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

✉ za-ika@ukr.net, (067) 376-53-81

ПОЛІМОРФІЗМ ЗАПАСНИХ БІЛКІВ ГРЕЧКИ ЇСТІВНОЇ (*FAGOPYRUM ESCULENTUM* MOENCH.) У ГРУПАХ СОРТІВ ІЗ РІЗНИМ КОЛЬБОРОМ КВІТКИ

Мета. Встановити наявність поліморфізму та відмінностей за варіантами білкового спектра насінини гречки у групах сортів з різним забарвленням віночка квітки. **Методи.** Електрофорез за методикою Laemmli в 17,5 %-му розділяючому РААГ гелі, візуалізація та ідентифікація варіантів спектра. **Результати.** Виявлено спільні для усіх груп сортів гречки варіанти електрофоретичного спектра та наявність гетерогенності у кожній з досліджуваних груп генотипів. За частотами варіантів електрофоретичного спектра між групами сортів встановлено статистично істотні відмінності і достовірне переважання одиничних варіантів у зеленоквіткових морфотипів гречки. **Висновки.** Відмінності у частотах зустрічальності варіантів електрофоретичного спектра у різних морфотипів гречки вказують на ймовірні процеси накопичення адаптивних алелів генів запасних білків, які відбулися у популяціях під час створення сортів через їх різну селекційну цінність.

Ключові слова: гречка їстівна, запасні білки, глобуліни, альбуміни, поліморфізм.

Гречка (*Fagopyrum esculentum* Moench.) – цінна круп'яна культура, харчові продукти з якої мають високу цінність та унікальне поєднання позитивних лікувально-дієтичних властивостей [1, 2]. Це також зумовлено високим вмістом білка (від 10 до 18%), що добре засвоюється та збалансований за амінокислотним складом [3].

Більшу частину загального білка насінини гречки становлять запасні білки, які відіграють важливу роль як джерело азоту у живленні проростків на початкових фазах розвитку [4, 5]. Запасні білки включають два основних класи: солерозчинні глобуліни і водорозчинні альбуміни [4]. Альбуміни мають коефіцієнт седимента-

ції від 1,7–2S, тоді як глобуліни мають коефіцієнт седиментації в межах 7S і 8S, що притаманне для віциліноподібних білків, і коефіцієнт седиментації від 11 до 13S, характерний для леугміноподібних білків [5]. Встановлено, що найістотнішою фракцією білків гречки є 13S глобулін, що складає близько 33% від запасних білків насінини [6]. Він складається з двох неідентичних субодиниць: більшої масою 32–43 kDa і другої – 23–25 kDa, які зв'язані дисульфідними зв'язками [5]. Також порівняно недавно ідентифіковано мінорні класи 8S глобулінів та 2S альбумінів, що становлять близько 6,5% від загального білка насінини [6, 7]. Встановлено, що фракція 8S глобулінів є трьохланковими полімерами, складається з субодиниць масою 57–58 kDa [6]. 2S фракція альбумінів представлена одностанцюговими поліпептидами з молекулярною масою 8–16 kDa і є багатогою на незамінні амінокислоти (9,2% метіоніну і 5,6% лізину) [6].

Дослідження поліморфізму запасних білків гречки є важливим для вивчення еволюції цієї культури, з'ясування процесів, що відбуваються у популяціях гречки під впливом екологічних факторів та під тиском селекційного процесу [8, 9]. Запасні білки насіння використовуються як генетичні маркери у селекційному процесі та насінництві [10], для паспортизації сортів [11, 12]. Між тим використання молекулярно-генетичних маркерів у селекції гречки їстівної ускладнене тим, що ця культура погано піддається інбридингу, а найбільш цінні сорти є здебільшого високогетерогенними синтетичними популяціями [14]. Деякі дослідження генетичного різноманіття гречки їстівної були зроблені з використанням специфічних методик електрофорезу запасних білків, за допомогою яких було виявлено внутрішньо і мі-

жвидовий поліморфізм у досліджуваних популяціях [13, 15, 16, 17].

Серед різних науковців існують думки, що, незважаючи на низьке генетичне різноманіття гречки їстівної, окремі фенотипні ознаки можуть бути пов'язані з господарсько-цінними ознаками. Наприклад, деякі зразки з червоною або темно-рожевою квіткою походять з високогірних районів Китаю та Непалу, їх появу деякі дослідники пов'язують з просуванням гречки у прохолодніші гірські райони з підвищеною сонячною інсоляцією [18]. Зеленоквіткова різновидність гречки відібрана штучно з мутантної популяції в Україні у Інституті круп'яних культур при Подільському державному аграрно-технічному університеті (м. Кам'янець-Подільський) [19]. На її основі створено групу сортів, що характеризуються стійкістю проти осипання. Білоквіткові генотипи є широко розповсюдженими: біле забарвлення віночка квітки є домінантним відносно зелено- і червоноквіткових генотипів, тому його прийнято вважати диким типом [18]. Ймовірно, саме колір віночка квітки був тим фенотиповим маркером, за яким прадавні землероби несвідомо відбирали місцеві сорти гречки як до початку синтетичної селекції, так і у період широкого використання мутагенезу та гібридизації у ХХ ст., що має прослідковуватися у відмінностях на рівні запасних білків.

Тому метою роботи було дослідження поліморфізму запасних білків сортів гречки їстівної української, білоруської і російської селекції та пошук відмінностей за частотами електрофоретичних варіантів у різних за забарвленням віночка квітки групах сортів.

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень були отримані з Устимівської дослідної станції Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН зеленоквіткові сорти гречки: Зеленоквіткова-10, Зеленоквіткова-90, Зеленоквіткова-16, Зеленоквіткова-22, Зеленоквіткова-12; червоноквіткові: Башкирська червоностебла, Червоноквіткова, Рожевоквіткова продуктивна, Рожевоквіткова-1, Рубінова та біло-квіткові: Українка, Лакнея, Влада, Білоруська гомостильна та Ольга (табл. 1). За забарвленням віночка квітки сорти були розподілені на групи: червоноквіткові – група I, зеленоквіткові – група II та білоквіткові – група III.

Досліджували електрофоретичний спектр

запасних білків гречки 10–30 окремих насінин кожного сорту. Для цього подрібнену насінину заливали 400 мкл буфера для екстракції і витримували протягом ночі, потім центрифугували, відбирали надосад і прогрівали 10 хв на киплячій водянній бані. Електрофорез білків у присутності додецилсульфату натрію (SDS) здійснювали за методикою Laemmli в 17,5%-му розділяючому гелі [20].

Для реєстрації певних компонентів спектра у всіх досліджуваних сортах було використано біохімічний підхід. Для опису поліморфізму електрофореграми запасних білків гречки були умовно розділені на 4 зони – А, В, С і D (рис. 2). Для статистичної оцінки розподілу частот використовували точний критерій Фішера та χ^2 («хі-квадрат»).

Результати та обговорення

У досліджуваних сортах виявлено поліморфізм у А, В, С, D ділянках отриманого електрофоретичного спектра розділення білків. Загалом ідентифіковано близько 30 компонентів різної інтенсивності (табл. 1, рис. 1, 2).

У ділянці електрофоретичного спектра А серед усієї вибірки сортів ідентифіковано 2 варіанти – 1 і 1a. У білоквіткових зразків частота варіанта 1 складала 58%, тоді як у зеленоквіткових та червоноквіткових – 70 і 76% відповідно. У цій же зоні спектра дещо вищу частоту зустрічальності варіанта 1a мали білоквіткові сорти, проте ці відмінності не є статистично істотними.

У зоні В електрофоретичного спектра по усіх сортах ідентифіковано 11 варіантів. За частотами варіантів спектра 2a, 2j, 2h між червоноквітковими та білоквітковими групами генотипів також визначено статистично істотні відмінності при $P < 0,05$. Між групами зеленоквіткових та білоквіткових генотипів теж спостерігалися статистично істотні відмінності ($P < 0,05$). Так варіант 2 у білоквіткових сортів зустрічався з частотою 35%, а у зеленоквіткових лише 14%, що є статистично істотним ($P < 0,05$).

Також були виявлені компоненти, що специфічні конкретним групам сортів гречки. Варіант 2h притаманний лише для окремих зеленоквіткових генотипів і має частоту 10%, чим статистично істотно відрізняється від інших груп генотипів ($P < 0,05$). Електрофоретичний варіант 2j знайдено і у червоноквіткових і у білоквіткових генотипів з частотою 14%, що статистично істотно ($P < 0,05$) відрізняється від зе-

леноквіткової групи сортів гречки, де його не ідентифіковано. Були виявлені варіанти елект-

рофоретичного спектра 2f, 2g, що зустрілися з близькою частотою в усіх трьох групах сортів.

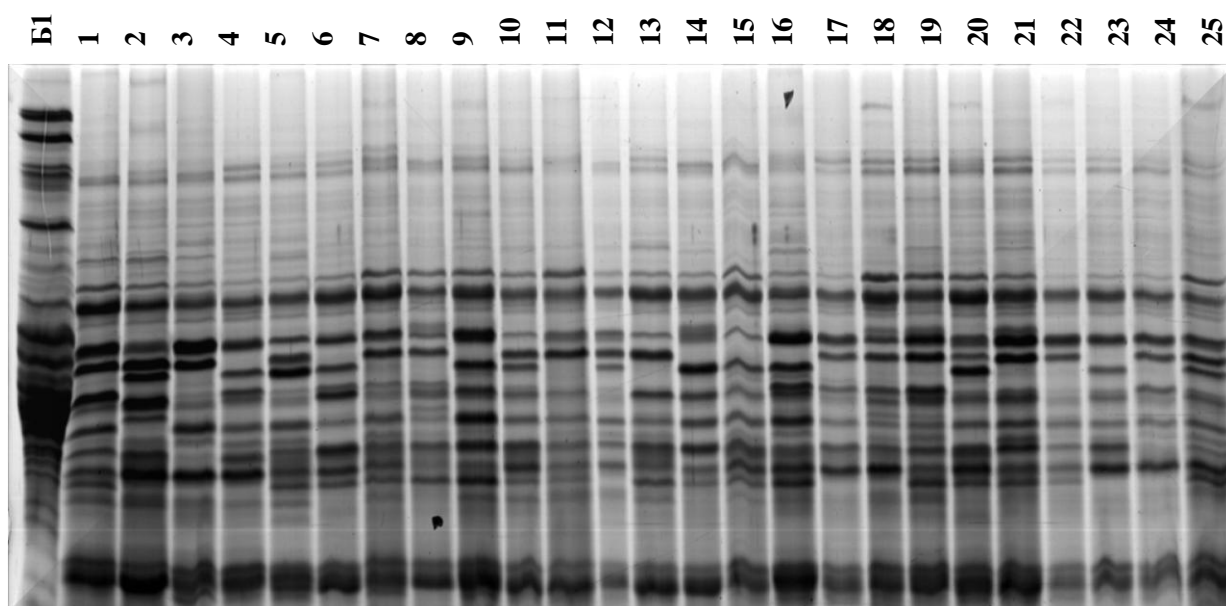


Рис. 1. Електрофореграми запасних білків: Б – пшениця м'яка Безоста-1; 1–5 – сорт гречки Рожевоквіткова-1; 6–16 – сорт гречки Рожевоквіткова продуктивна; 17–25 – сорт гречки Рубінова.

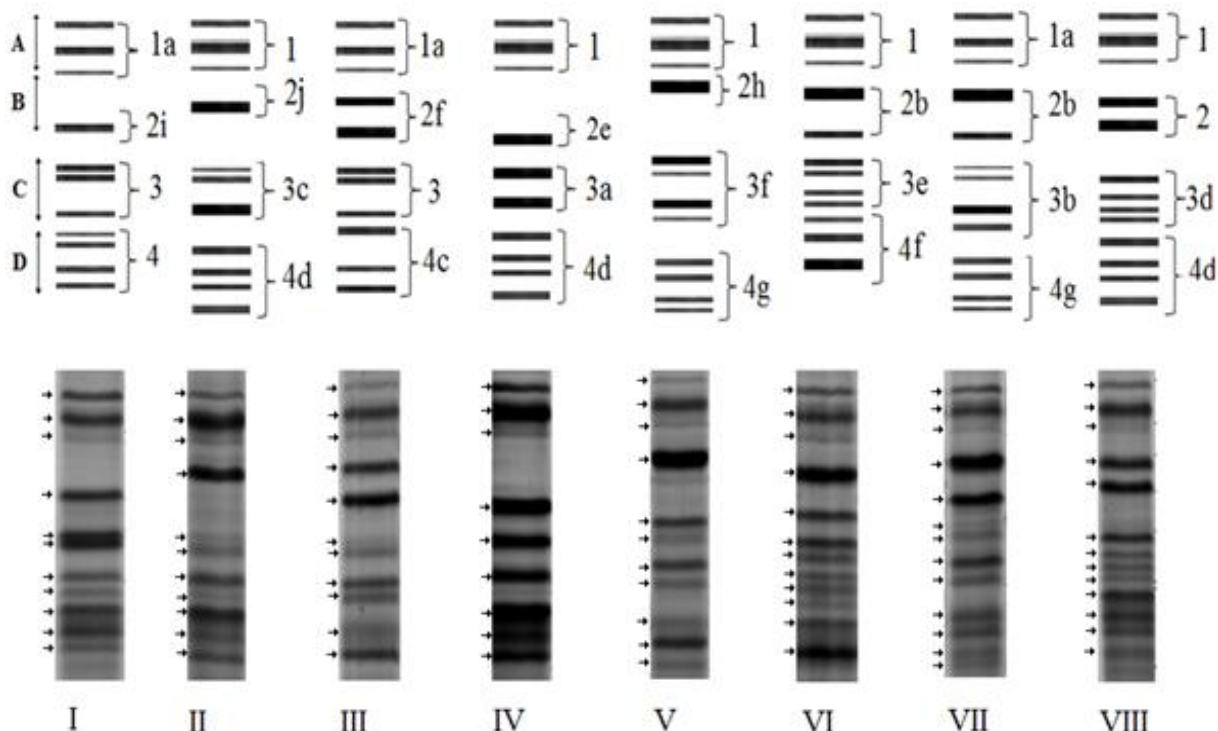


Рис. 2. Схеми варіантів запасних білків гречки (зверху) та відповідні їм електрофоретичні спектри (знизу): I – Башкирська червоностебла; II – Білоруська гомостильна; III – Влада; IV – Зеленоквіткова-10; VI – Зеленоквіткова-16; VII – Зеленоквіткова-12; VIII – Зеленоквіткова-90.

Таблиця 1. Розподіл частот алелів різних груп сортів гречки

Зона спектра	Варіанти спектра	Група I		Група II		Група III	
		Кількість насінин	Частота варіантів у сортів із червоним забарвленням віночка, %	Кількість насінин	Частота варіантів у сортів із зеленим забарвленням віночка, %	Кількість насінин	Частота варіантів у сортів із білим забарвленням віночка, %
A	<i>1</i>	38	76	35	70	29	58
	<i>1a</i>	12	24	15	30	21	42
	Всього	50	100	50	100	50	100
B	<i>2</i>	14	28	7*	14	17*	35
	<i>2a</i>	3*	6	8	16	10*	20
	<i>2b</i>	5	10	12	24	5	10
	<i>2c</i>	7	14	2	4	1	2
	<i>2d</i>	3	6	6	12	1	2
	<i>2e</i>	0	0	0	0	1	2
	<i>2f</i>	3	6	3	6	2	4
	<i>2g</i>	5	10	5	10	5	10
	<i>2h</i>	0*	0	5 ^{*/**}	10	0**	0
	<i>2i</i>	3	6	1	2	0	0
	<i>2j</i>	7*	14	0 ^{*/**}	0	7**	14
Всього	50	100	49	100	49	100	
C	<i>3</i>	25	51	18	37	19	39
	<i>3a</i>	4	8	3	6	4	8
	<i>3b</i>	5	10	11	22	9	18
	<i>3c</i>	10	20	5	10	6	12
	<i>3d</i>	1	2	0	0	1	2
	<i>3e</i>	4*	8	11*	22	10	20
	<i>3f</i>	0	0	1	2	0	0
	Всього	49	100	49	100	49	100
D	<i>4</i>	18*	36	15*	31	4	8
	<i>4a</i>	11	22	11	22	19	38
	<i>4b</i>	3	6	2	4	1	2
	<i>4c</i>	5	10	1*	2	9*	18
	<i>4d</i>	10	20	10	20	10	20
	<i>4e</i>	2	4	1	2	1	2
	<i>4f</i>	1*	2	8 ^{*/**}	16	1**	2
	Всього	50	100	49	100	50	100

Примітки: * – різниця достовірна при $P \leq 0,05$ у варіанті 2 між групами сортів II і III ($p=0,019$, $\chi^2=5,52$); різниця достовірна при $P \leq 0,05$ у варіанті 2a між групами сортів I і III ($p=0,033$, $\chi^2=4,5$); ** – різниця достовірна при $P \leq 0,05$ у варіанті 2j між групами сортів I, II та II, III ($p=0,012$); різниця достовірна при $P \leq 0,05$ у варіанті 2h між групами сортів I, II та II, III ($p=0,027$); * – різниця достовірна при $P \leq 0,05$ у варіанті 3e між групами сортів I, II ($p=0,049$, $\chi^2=3,86$); різниця достовірна при $P \leq 0,05$ у варіанті 4 між групами сортів II і III ($p=0,018$, $\chi^2=5,57$); різниця достовірна при $P \leq 0,05$ у варіанті 4 між групами сортів I і III ($p=0,004$, $\chi^2=8,13$); різниця достовірна при $P \leq 0,05$ у варіанті 4c між групами сортів II і III ($p=0,016$, $\chi^2=7,11$); ** – різниця достовірна при $P \leq 0,05$ у варіанті 4f між групами сортів I і II та II і III ($p=0,016$, $\chi^2=8,13$); табличне значення $\chi^2=3,84$ при $f=1$, $P=0,05$.

Частота варіанта 2g була однаково рівна у всіх групах генотипів і становила 10%. Варіант 2f зустрічався у I і II групах сортів з частотою 6% і у III групі – 4%. Найнижчі частоти в зоні електрофоретичного спектра В серед генотипів гречки були у варіантів 2f, 2i, 2e – 1–3%. Найвища частота у зоні В серед зеленоквіткових генотипів була у варіантів 2 (28 і 35%) у груп сортів з червоним та білим забарвленням віночка квітки відповідно і 2b (24%) – у групі сортів із зеленим кольором віночка квітки.

У зоні С електрофоретичного спектра гречки ідентифіковано сім варіантів. Найвищу частота зустрічання (37–51%) по усіх групах сортів гречки у зоні С має варіант 3. Частота варіанта 3a була також близькою у всіх групах сортів, у яких вона склала 6–8%. Спостерігалися істотні відмінності ($P < 0,05$) між частотами варіанта електрофоретичного спектра 3e у червоноквіткової (8%) та зеленоквіткової (22%) груп сортів, а у білоквіткових сортів вона становила відповідно 20%.

У ділянці електрофоретичного спектра D виявлено 8 компонентів, з яких найвищі частоти мав варіант 4 (31 і 36%) – у червоноквіткових і зеленоквіткових сортів гречки відповідно. У той же час, у білоквіткових сортах цей варіант ідентифіковано лише у 8% генотипів. Відмінності між частотами цього варіанту у групах сортів достовірна ($P < 0,05$) у червоноквіткових і білоквіткових генотипів, а також у зеленоквіткових та білоквіткових групах генотипів. Частота варіанта 4a була високою (22–38%) у всіх групах сортів, але статистично достовірної різниці між ними за цим варіантом не виявлено. Варіант 4c зустрічається у білоквіткових сортах з частотою

18%, тоді як у зеленоквіткових і червоноквіткових генотипах – з частотою 2 і 10% відповідно. Відмінність частот варіанта 4c у між групами сортів статистично істотна у зеленоквіткових та білоквіткових генотипів ($P < 0,05$) і становить 2 і 18% відповідно. Варіант 4f найвищу зустрічальність має у зеленоквіткової групи сортів (16%), тоді як інших групах його частота всього 2%, і ця різниця є статистично істотною ($P < 0,05$). Варіант 4d зустрічається серед усіх сортів з однаковою частотою – 20%. З невисокою частотою зустрічаються варіанти 4g, 4b, 4e. Їх частота в усіх групах сортів була 2–10%. Варіант 4g не зустрічався у червоноквіткової групі сортів, проте така відмінність від інших груп сортів не є статистично істотною.

Висновки

Різна частота зустрічальності компонентів електрофоретичного спектра у відмінних за забарвленням квітки морфотипів гречки вказує на ймовірну різну селекційну цінність генів, що контролюють синтез цих компонентів, або їх зв'язок з генами, тісно зчеплених з ними. Це дає можливість цілеспрямовано проводити відбір генотипів залежно від морфотипу, до якого належать ці сорти. Наприклад через рецесивне успадкування та неповну пенетрантність ознаки зеленого забарвлення віночка квітки білкові маркери можуть бути використані для селекції генотипів за даною ознакою. Тому подальші дослідження запасних білків є перспективними для залучення до селекційного процесу, а певні варіанти запасних білків можуть бути використані як маркери для ідентифікації окремих морфотипів гречки.

References

1. Kreft I., Germ M. Organically grown buckwheat as a healthy food and a source of natural antioxidants. *Agronomski Glasnik*. 2008. Vol. 4. P. 397–406.
2. Ahmed A., Khalid N., Ahmad A., Abbasi N., Latif M., Randhawa M. Phytochemicals and biofunctional properties of buckwheat: A review. *The Journal of Agricultural Science*. 2014. Vol. 152 (3). P. 349–369. doi: 10.1017/S0021859613000166.
3. Chungoo N., Dohtdong L., Chettry U. Genome Plasticity in Buckwheat. In: Rajpal V., Rao S., Raina S. (eds) *Gene Pool Diversity and Crop Improvement. Sustainable Development and Biodiversity*. 2016. Vol. 10. Springer. Cham. doi: 10.1007/978-3-319-27096-8_7.
4. Radovic S., Maksimovic V. Lysine rich 18 kDa storage polypeptide front buckwheat seed. *Fagopyrum*. 2002. Vol. 19. P. 59–61.
5. Chungoo N., Dohtdong L., Chettry U. Diversity in Seed Storage Proteins and Their Genes in Buckwheat. In: Zhou M., Kreft I., Woo S., Chungoo N., Wieslander G. *Molecular Breeding and Nutritional Aspects of Buckwheat*. Elsevier. Chapter 31. 2016. P. 387–396. doi: 10.1016/B978-0-12-803692-1.00031-6.
6. Radovic S., Maksimovic V., Varikonji-Gasic E. Characterization of buckwheat seed storage proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996. Vol. 44 (4). P. 972–974. doi: 10.1021/jf950655x.
7. Radovic R., Maksimovic R., Brkljacic M., Varkonji Gasic I., Savic P. 2S Albumin from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999. Vol. 47 (4). P. 1467–1470. doi: 10.1021/jf980778s.

8. Samardžić J., Milisavljević M., Brkljačić J., Konstantinović M., Maksimović V., Characterization and evolutionary relationship of methionine-rich legumin-like protein from buckwheat, *Plant Physiology and Biochemistry*. 2004. Vol. 42 (2). P. 157–163. doi: 10.1016/j.plaphy.2003.11.001.
9. Lazareva T., Fesenko I. Electrophoresis Spectra of Total Seed Proteins of Artificial Amphidiploid *Fagopyrum giganteum* Krotov and its Parental Species *F. tataricum* Gaertn and *F. symosum* Meisn. *Advances in Buckwheat Research: Proceedings of the 9th International Symposium on Buckwheat* (August 18–22. Czech Republic). Prague, 2004. P. 299–301.
10. Sozinov A.A. Polymorphism of proteins and its significance in genetics and breeding. M.: Nauka, 1985. P. 152. [in Russian] / Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука, 1985. С. 152.
11. Konarev A.V., Konarev V.G., Gubareva N.K., Peneva T.I. Seed proteins as markers in resolving the problems of genetic plant resources, selection and seed production. *Cytology and genetics*. 2000. Vol. 34, № 2. P. 91–104. [in Russian] / Конарев А.В., Конарев В.Г., Губарева Н.К., Пенева Т.И. Белки семян как маркеры в решении проблем генетических ресурсов растений, селекции и семеноводства. *Цитология и генетика*. 2000. 34, № 2. С. 91–104.
12. Radovic S., Miljus-Djukic J., Samardiz J., Banovic B., Nikolic D., Milisavjevic M., Timotijevic G. Buckwheat as a Model Plant in Molecular Biology. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology 6 (Special Issue)*. 2012. P. 11–16.
13. Rogl S., Javornik B. Seed protein variation for identification of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cultivars. *Euphytica*. 1996. Vol. 87. P. 111–117. doi: 10.1007/BF00021883.
14. Mukasa Y., Suzuki T., Honda Y. A methodology for heterosis breeding of common buckwheat involving the use of the self-compatibility gene derived from *Fagopyrum homotropicum*. *Euphytica*. 2010. Vol. 172. P. 207–214. doi: 10.1007/s10681-009-0047-9.
15. Zeller F.J., Weishaeupl H., Hsam Sai L.K. Identification and Genetics of Buckwheat (*Fagopyrum*) Seed Storage Proteins. *Proceedings of the 9th International Symposium on Buckwheat*. Czech Republic. Prague, 2004. P. 195–201.
16. Li J., Chen Q. Variation in Seed Protein Subunits among Species of the Genus *Fagopyrum* Mill. *Proceedings of the 10th International Symposium on Buckwheat*. Yangling, Shaanxi, People's Republic of China, Northwest University Press 2007. P. 372–382.
17. Yang Yu-Xia, Wu Wei, Zheng You-Liang, Cai Qian-Rong Genetic Diversity of Storage Proteins in Cultivated Buckwheat. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2008. Vol. 11. P. 1662–1668. doi: 10.3923/pjbs.2008.1662.1668.
18. Trygub O.V., Liashenko V.V. Sources of economic and breeding-valuable traits for buckwheat breeding (*Fagopyrum esculentum* Moench.). *News of Poltava State Agrarian Academy*. 2017. № 1–2. P. 48–55. [in Ukrainian] / Тригуб О.В., Ляшенко В.В. Джерела господарських та селекційно-цінних ознак для селекції гречки звичайної (*Fagopyrum esculentum* Moench.). *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. 2017. № 1–2. С.48–55.
19. Suzuki T., Mukasa Y., Morishita T., Takigawa S., Noda T. Traits of shattering resistant buckwheat 'W/SK86GF'. *Breeding Science*. 2012. Vol. 62. P. 360–364. doi: 10.1270/jsbbs.62.360.
20. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. Vol. 227 (5259). P. 680–685. doi: 10.1038/227680a0.

ZAIKA Y.V.¹, KOZUB N.A.^{2,3}, SOZINOV I.A.², BIDNYK G.Ya.^{2,3}, KARAZHBEY P.P.¹

¹ NSC "Institute of Agriculture of NAAS",

Ukraine, 08163, Chabany, Kyiv-Svyatoshynsky district, Machynobudivnykiv str., 2b, e-mail: za-ika@ukr.net

² Institute of Plant Protection of NAAS,

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 33

³ Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine,

Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskoho str., 2a

POLYMORPHISM OF STORAGE PROTEINS OF COMMON BUCKWHEAT (*FAGOPYRUM ESCULENTUM* MOENCH.) IN GROUPS OF VARIETIES WITH DIFFERENT FLOWER COLOR

Aim. To establish the presence of polymorphism and differences in variants of the protein spectrum of buckwheat seed storage proteins in groups of varieties with different colors of the flower corolla. **Methods.** Electrophoresis using the Laemmli method in 17.5% of the separating PAAG gels, visualization and identification of the spectrum variants. **Results.** The common variants of the electrophoretic spectrum for all groups of buckwheat varieties and the heterogeneity of each of the studied groups of genotypes are revealed. By frequency of variants of electrophoretic spectrum between groups of varieties were detected statistically significant differences and reliable predominance of individual variants in green-flower morphotypes of buckwheat were established. **Conclusions.** Differences in frequency of occurrence of variants of electrophoretic spectrum in different morphotypes of buckwheat indicate the probable processes of preservation of individual adaptive alleles of genes of seed storage proteins, which occurred in populations when varieties under the pressure of breeding process.

Keywords: edible buckwheat, spare proteins, globulins, albumins, polymorphism.