

КОЗУБ Н.О.^{1,2✉}, СОЗІНОВ І.О.¹, БІДНИК Г.Я.^{1,2}, ДЕМ'ЯНОВА Н.О.^{1,2}, СОЗІНОВА О.І.¹,
КАРЕЛОВ А.В.^{1,2}, ПИЛИПЕНКО Л.А.¹, БЛЮМ Я.Б.², СОЗІНОВ О.О.^{2©}

¹ Інститут захисту рослин НААН,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 33, e-mail: natalkozub@gmail.com;

² ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України»,

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

✉ natalkozub@gmail.com, (097) 212-40-89, (044) 257-22-58

СТВОРЕННЯ І ДОСЛІДЖЕННЯ МАТЕРІАЛУ *TRITICUM AESTIVUM* L. З ІНТРОГРЕСІЯМИ ВІД *AEGILOPS BIUNCIALIS* VIS.

Мета. Метою цієї роботи було створення і дослідження матеріалу *Triticum aestivum* L. з інтрогресіями від *Aegilops biuncialis* Vis.. **Методи.** Визначали ознаки продуктивності ліній F₄ від схрещення пшениці м'якої озимої з кримськими зразками *Ae. biuncialis*. Для ідентифікації алелів локусів *Gli-1* і *Glu-1*, у тому числі інтрогресованих, проводили електрофорез запасних білків зерна в кислих умовах та SDS-електрофорез. **Результати.** Лінії F₄ від міжвидової гібридизації *T. aestivum* з *Ae. biuncialis* характеризувалися значним розмахом за ознаками продуктивності. Деякі лінії мали булавоподібний колос та опущення листкової пластинки. За використання запасних білків як генетичних маркерів ідентифіковано присутність хромосоми 1U серед потомства проаналізованих рослин, у частини ліній виявлено присутність транслокації плеча 1UL. Ліній з інтрогресіями хромосоми 1M не виявлено. **Висновки.** Створено лінії пшениці *T. aestivum* з інтрогресіями від *Ae. biuncialis* без стадії отримання амфідиплоїдів. Відібрано лінії з інтрогресіями хромосоми 1U, у тому числі з ліній з транслокацією плеча 1UL.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., *Aegilops biuncialis* Vis., інтрогресія.

Види роду *Aegilops* L. вважаються важливим ресурсом генів стійкості до хвороб і шкідників, а також генів стійкості до абіотичних факторів та харчової цінності зерна для культурної пшениці *Triticum aestivum* L. (BBAADD, 2n=42) [1, 2].

Тетраплоїдний вид *Ae. biuncialis* Vis. (UUM^{bM}) є одним із найбільш поширених видів роду *Aegilops* L. і характеризується високою екологічною адаптивністю. Він може бути джерелом генів стійкості до абіотичних факторів [3, 4] та генів, що визначають якість зерна [5, 6] для

збагачення генофонду *T. aestivum*. Угорські вчені першими створили лінії пшениці з доданими хромосомами *Ae. biuncialis* та лінії з транслокаціями від цього виду через амфіплоїди між пшеницею і *Ae. biuncialis* [7–9]. З використанням ліній *T. aestivum* із доданими хромосомами показано вплив хромосом *Ae. biuncialis* на вміст білка в зерні, вміст основних компонентів харчової клітковини зерна – полісахаридів клітинних стінок (арабіноксилану і β-глюкану) та співвідношення глютенінів і гліадинів у загальному білку [5]. Наявність транслокації 3M^b.4BS від *Ae. biuncialis* значно підвищувала вміст мікроелементів Zn і Mn у зерні пшениці [6]. Китайськими вченими створено часткові амфіплоїди пшениці і *Ae. biuncialis* і лінії з доданими хромосомами та у певних інтрогресивних ліній показано імунність до борошнистої роси та жовтої іржі (лінія 15-3-2) [9] та позитивний вплив доданої хромосоми 1U [10] на показники хлібопекарної якості та вміст білку (лінія 12-5-2) [11].

Вид *Ae. biuncialis* характеризується значною різноманітністю як за реакцією на абіотичні та біотичні фактори [11], так і різноманітністю, що детектується за допомогою молекулярно-генетичних маркерів [12, 13]. Зокрема, велике число алелів ідентифіковано за локусами запасних білків *Gli-U1*, *Gli-M^b1*, *Glu-U1*, *Glu-M^b1* для кримських популяцій *Ae. biuncialis*, що складають дуже незначну північну частину ареалу виду [14, 15]. Для використання потенціалу виду важливим є включення різних генотипів *Ae. biuncialis* у міжвидову гібридизацію з пшеницею. Метою нашої роботи було створення і дослідження матеріалу *T. aestivum* з інтрогресіями від *Ae. biuncialis* із кримських популяцій.

© КОЗУБ Н.О., СОЗІНОВ І.О., БІДНИК Г.Я., ДЕМ'ЯНОВА Н.О., СОЗІНОВА О.І.,
КАРЕЛОВ А.В., ПИЛИПЕНКО Л.А., БЛЮМ Я.Б., СОЗІНОВ О.О.

Матеріали і методи

Для схрещень було використано сорти і лінії пшениці озимої Безоста 1, Одеська червоноколоса, лінії Б-16, MIL-1D4 (створено д.б.н. М.М. Копусем на базі сорту Безоста 1), 7086 AR (лінію створено д.б.н. О.І. Рибалкою (Селекційно-генетичний інститут, м. Одеса). Як батьківський компонент використано зразки *Ae. biuncialis* з популяції Карадагу. Гібридизацію проводили twirl-методом. Гібриди F_1 бекросували пшеницею. Наступні покоління вирощували поруч із посівами пшениці без ізоляції, що давало можливість перехресного запилення. Проводили структурний аналіз окремих рослин, починаючи з F_4 , – враховували число колосів із рослини, визначали масу зерна з рослини без одного колоса, розраховували масу зерна з колоса.

Електрофорез гліадинів проводили в кислому середовищі в 10% поліакриламідному гелі за методикою [14]; електрофорез високомолекулярних (НМВ) субодиниць глютенінів – за методикою Laemmli в 10% розділяючому гелі [15]. Аналізували по 5 окремих зерен із рослини F_4 .

Результати та обговорення

Для схрещення з пшеницею було залучено зразки *Ae. biuncialis* з Карадагу, оскільки їх цвітіння збігалось з цвітінням більшості використаних сортів та ліній пшениці м'якої озимої. Гібриди F_1 (BADUM^b, $2n=35$) бекросували пшеницею або залишали для самозапилення та спонтанного перезапилення. Гібриди F_1 мали опушену листову пластинку, як і зразки *Ae. biuncialis*. На рис. 1 показано колоси міжвидових гібридів

F_1 (А) та наступного покоління F_2 від самозапилення і спонтанного перезапилення (С) і F_1B_1 від бекросування пшеницею (В).

Міжвидові гібриди ранніх поколінь характеризувалися дуже низькою озерненістю (1–2 зерна на колос), очевидно, через хромосомну нестабільність. Наступні покоління були результатом самозапилення та, через стерильність гібридів із великою ймовірністю відбувалося перехресне запилення, оскільки колоси не ізоловали. Одержано 73 лінії, умовно позначені F_4 . F_4 лише відображає кількість поколінь після схрещення і є умовним позначенням через бекросування та перехресне запилення під час створення ліній.

На рис. 2 показано колоси деяких ліній F_4 від міжвидової гібридизації. Частина ліній характеризувалися булавоподібним колосом з ущільненим розміщенням колосків у верхній частині колоса (наприклад, МВГ12 111, МВГ12 154), цієї ознаки не було у вихідних сортів і ліній пшениці. Ці ж лінії мали опушення листової пластинки.

Вибірка ліній від міжвидової гібридизації характеризувалися значним розмахом за ознаками продуктивності (табл.), при цьому середнє значення продуктивного кушення було високим.

Розподіл ознаки маса зерна з рослини, на відміну від продуктивного кушення і маси зерна з колоса, не відповідав нормальному і був зсунутий у бік меншого значення (табл.). Спостерігалася варіація в масі зерна з рослини серед сестринських ліній F_4 (потомства рослини F_3), наприклад, 3,04–10,6 г серед сім'ї МВГ12; 1,53–2,18 г – серед сім'ї МВГ8.

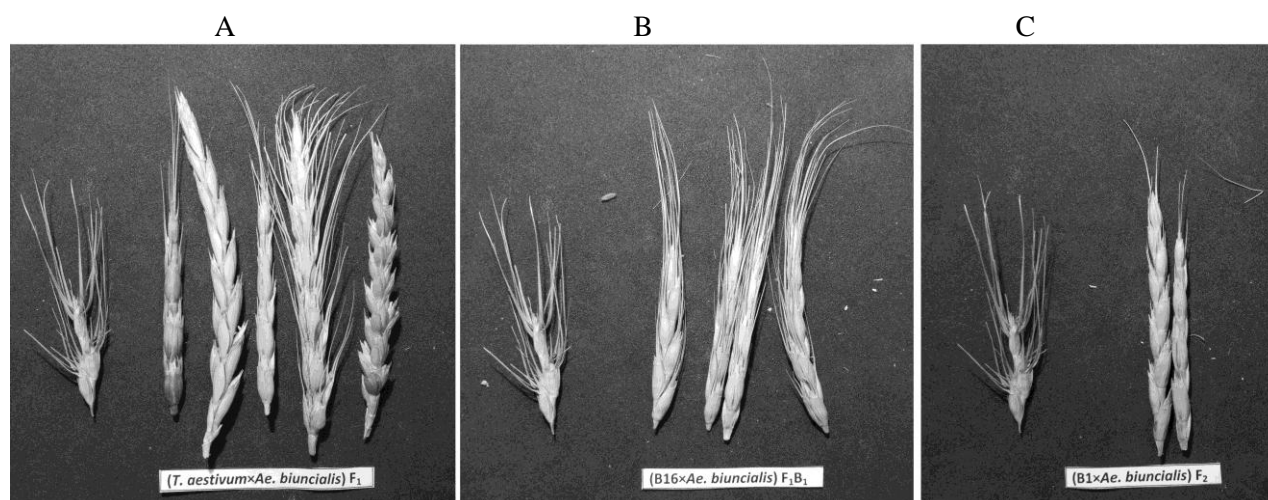


Рис. 1 Колоси міжвидових гібридів F_1 (А), F_1B_1 (В), F_2 (С). Зліва – колос *Ae. biuncialis*; справа – колоси міжвидових гібридів; B1 – Безоста 1.



Рис. 2. Колоси деяких ліній F₄ від міжвидового схрещування пшениці з *Ae. biuncialis*. Зліва – колос *Ae. biuncialis*; справа – колоси міжвидових гібридів.

Із використанням запасних білків (гліадинів і високомолекулярних субодиниць глютенінів) як генетичних маркерів хромосом 1U гомеологічної групи було проаналізовано рослини F₄ на наявність інтрогресій відповідних хромосом. За допомогою локусів *Gli-U1* і *Glu-U1* як генетичних маркерів ідентифіковано присутність хромосоми 1U серед потомства 14 із 21 проаналізованої рослини F₄ (рис. 3). Серед зернівок із цих рослин траплялися зернівки з експресією генів локусу *Glu-U1* та без продуктів експресії локусу *Gli-U1*, що свідчить про формування транслокацій плеча 1UL. Водночас ліній з інтрогресіями хромосоми 1M не виявлено. Кращі за фенотипом лінії та лінії з ідентифікованими маркерами хромосоми 1U було висіяно для подальших відборів. Отже, створено лінії з інтрогресіями від *Ae. biuncialis* без етапу отримання

амфідиплоїдів.

Створені лінії з інтрогресіями хромосоми 1U можуть бути цінним джерелом нових алелів запасних білків для поліпшення хлібопекарної якості. Позитивний ефект на силу тіста показано для інтрогресованих високомолекулярних субодиниць глютенінів хромосоми 1U китайського зразка *Ae. biuncialis* у хромосомно-доданої лінії 12-5-2 [11]. Однак під час перенесення хромосоми 1U від певних зразків споріднених видів *Ae. geniculata* (M^gM^gU^gU^g, 2n=28), *Ae. umbellulata* (UU, 2n=14) виявлено негативний ефект алелів високомолекулярних субодиниць глютенінів на силу тіста [16, 17]. Це може вказувати на існування різноманітності за ефектом на хлібопекарну якість алелів локусів запасних білків хромосоми 1U, зокрема *Glu-U1*.

Таблиця. Статистичні показники для ознак продуктивності ліній (рослин) F₄ від міжвидового схрещування пшениці з *Ae. biuncialis*

Ознака	Кількість проаналізованих рослин	Середнє	Стандартна похибка	Медіана	Мінімум	Максимум
Число колосів	43	12,00	0,36	11,00	2,00	29,00
Маса зерна з рослини, г	73	11,66	0,28	5,97	1,50	45,86
Маса зерна з колоса, г	43	1,352	0,361	1,175	0,131	3,211

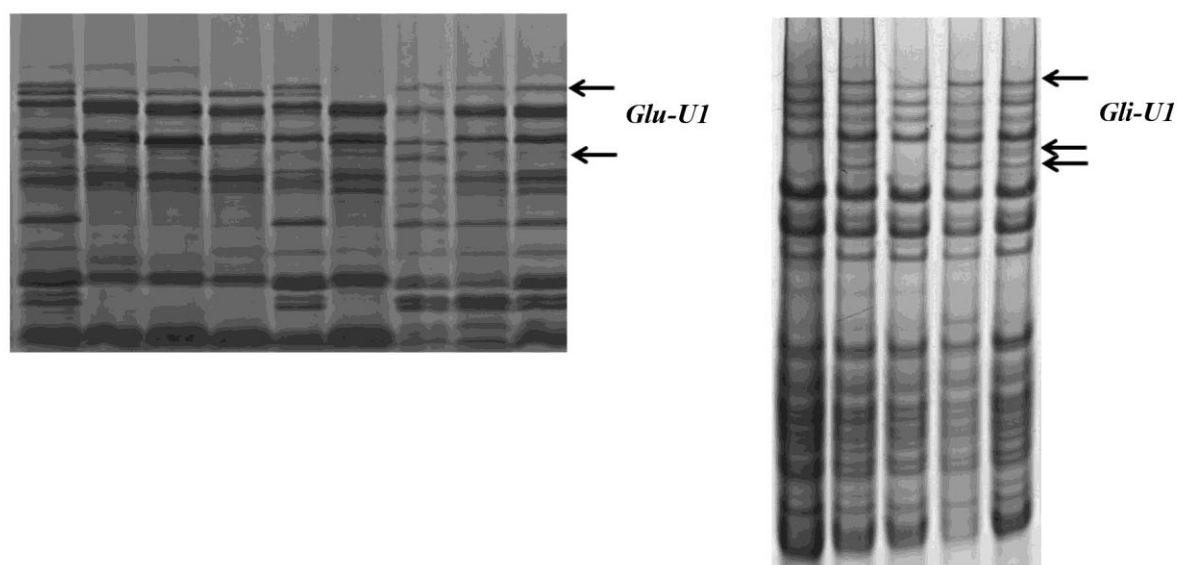


Рис. 3. Електрофореграми окремих зернівок із ліній F₄ від міжвидового схрещування пшениці з *Ae. biuncialis*. Зліва – SDS-електрофорез; справа – електрофорез у кислих умовах. Стрілками показано присутність компонентів, кодованих генами хромосоми 1U *Ae. biuncialis*.

Висновки

Створено лінії пшениці м'якої озимої з інтрогресіями від *Ae. biuncialis* без стадії отримання амфідиплоїдів. Із використанням запас-

них білків як генетичних маркерів відібрано лінії з інтрогресіями хромосоми 1U, у тому числі лінії з транслокацією плеча 1UL.

Література

- Schneider A., Molnár I., Molnár-Láng M. Utilisation of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica*. 2008. Vol. 163. P. 1–19. doi: 10.1007/s10681-007-9624-y.
- Kilian B., Mammen K., Millet E., Sharma R., Graner A., Salamini F., Hammer K., Özkan H. *Aegilops*. *Wild crops relatives: genomic and breeding resources*. Ed. C. Kole. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 2011. P. 1–76. doi: 10.1007/978-3-642-14228-4.
- Molnár I., Gaspar L., Savari E., Dulai S., Hoffman B., Molnár-Láng M., Galiba G. Physiological and morphological responses to water stress in *Aegilops biuncialis* and *Triticum aestivum* genotypes with differing tolerance to drought. *Functional Plant Biology*. 2004. Vol. 31. P. 1149–1159. doi: 10.1071/FP03143.
- Dulai S., Molnár I., Szopkó D., Darkó É., Vojtkó A., Sass-Gyarmati A., Molnár-Láng M. Wheat-*Aegilops biuncialis* amphiploids have efficient photosynthesis and biomass production during osmotic stress. *J. Plant Physiol*. 2014. Vol. 171. P. 509–517. doi: 10.1016/j.jplph.2013.11.015.
- Rakszegi M., Molnár I., Lovegrove A., Darkó É., Farkas A., Láng L., Bedő Z., Doležel J., Molnár-Láng M., Shewry P. Addition of *Aegilops* U and M chromosomes affects protein and dietary fiber content of wholemeal wheat flour. *Frontiers in Plant Science*. 2017. Vol. 8. Article 1529. doi: 10.3389/fpls.2017.01529.

6. Farkas A., Molnár I., Dulai S., Rapi S., Oldal V., Cseh A., Kruppa K., Molnár-Láng M. Increased micronutrient content (Zn, Mn) in the 3Mb(4B) wheat – *Aegilops biuncialis* substitution and 3Mb.4BS translocation identified by GISH and FISH. *Genome*. 2014. Vol. 57. P. 61–67. doi: 10.1139/gen-2013-0204.
7. Molnár-Láng M., Linc G., Nagy E.D., Schneider A., Molnár I. Molecular cytogenetic analysis of wheat-alien hybrids and derivatives. *Acta Agronomica Hungarica*. 2002. Vol. 50, № 3. P. 303–311. doi: 10.1556/AAgr.50.2002.3.8.
8. Schneider A., Linc G., Molnár I., Molnár-Láng M. Molecular cytogenetic characterization of *Aegilops biuncialis* and its use for the identification of 5 derived wheat – *Aegilops biuncialis* disomic addition lines. *Genome*. 2005. Vol. 48. P. 1070–1082. doi: 10.1139/g05-062.
9. Molnár I., Benavente E., Molnár-Láng M. Detection of intergenomic chromosome rearrangements in irradiated *Triticum aestivum* – *Aegilops biuncialis* amphiploids by multicolour genomic *in situ* hybridization. *Genome*. 2009. Vol. 52. P. 156–165. doi: 10.1139/g08-114.
10. Tan F., Zhou J., Yang Z., Zhang Y., Pan L., Ren Z. Characterization of a new synthetic wheat – *Aegilops biuncialis* partial amphiploid. *Afr. J. Biotech.* 2009. Vol. 8, № 14. P. 3215–3218. doi: 10.5897/AJB09.359.
11. Zhou J.P., Yao C.H., Yang E.N., Yin M.Q., Liu C., Ren Z.L. Characterization of a new wheat-*Aegilops biuncialis* addition line conferring quality-associated HMW glutenin subunits. *Genetics and Molecular Research*. 2014. Vol. 13, № 1. P. 660–669. doi: 10.4238/2014.January.28.11.
12. Okuno K., Ebana K., Noov B., Yoshida H. Genetic diversity and Central Asian and north Caucasian *Aegilops* species as revealed by RAPD markers. *Genet. Res. Crop Evol.* 1998. Vol. 45. P. 389–394. doi: 10.1023/A:1008660001263.
13. Monte J.V., De Nova P.J.G., Soler C. AFLP-based analysis to study genetic variability and relationships in the Spanish species of the genus *Aegilops*. *Hereditas*. 2001. Vol. 135. P. 233–238. doi: 10.1111/j.1601-5223.2001.00233.x.
14. Kozub N.A., Sozinov I.A., Xynias I.N., Sozinov A.A. Allelic Variation at High-Molecular-Weight Glutenin Subunit Loci in *Aegilops biuncialis* Vis. *Russian Journal of Genetics*. 2011. Vol. 47, № 9. P. 1078–1083. doi: 10.1134/S1022795411090092.
15. Kozub N.A., Sozinov I.A., Sozinov A.A. Identification of alleles at the gliadin loci *Gli-U1* and *Gli-M^b1* in *Aegilops biuncialis* Vis. *Russian Journal of Genetics*. 2012. Vol. 48, № 4. P. 390–395. doi: 10.1134/S1022795412030052.
16. Kozub N.A., Sozinov I.A., Sobko T.A., Kolyuchii V.T., Kuptsov S.V., Sozinov A.A. Variation at storage protein loci in winter common wheat cultivars of the Central Forest-Steppe of Ukraine. *Cytology and Genetics*. 2009. Vol. 43, № 1. P. 55–62. doi: 10.3103/S0095452717020050.
17. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. Vol. 227, N 5259. P. 680–685. doi:10.1038/227680a0.
18. Garg M., Tanaka H., Tsujimoto H., Exploration of *Triticeae* seed storage proteins for improvement of wheat end-product quality. *Breeding Sci.* 2009. Vol. 59. P. 519–528. doi: 10.1270/jsbbs.59.519.
19. Garg M., Tsujimoto H., Gupta R.K., Kumar A., Kaur N., R. Kumar, Chunduri V., Sharma N.K., Chawla M., Sharma S., Munday J.K. Chromosome specific substitution lines of *Aegilops geniculata* alter parameters of bread making quality of wheat. *PLoS ONE*. 2016. Vol. 11 (10). e0162350. doi: 10.1371/journal.pone.0162350.

KOZUB N.A.^{1,2}, SOZINOV I.A.¹, BIDNYK H.Ya.^{1,2}, DEMIANOVA N.A.^{1,2}, SOZINOVA O.I.¹, KARELOV A.V.^{1,2}, PYLYPENKO L.A.¹, BLUME Ya.B.², SOZINOV A.A.²

¹ Institute of Plant Protection, NAAS of Ukraine,

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 33, e-mail: natalkozub@gmail.com

² Institute of Food Biotechnology and Genomics, NAS of Ukraine,

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

DEVELOPMENT AND STUDYING OF *TRITICUM AESTIVUM* L. MATERIAL WITH INTROGRESSIONS FROM *AEGILOPS BIUNCIALIS* VIS.

Aim. The aim of the study was to develop and study *T. aestivum* material with introgressions from *Ae. biuncialis*.

Methods. Quantitative traits of F₄ lines from crossing wheat with Crimean accessions of *Ae. biuncialis* were studied. SDS and APAG electrophoreses of storage proteins were used to identify alleles at the *Glu-1* and *Gli-1* loci, including introgressed ones. **Results.** F₄ lines from crosses of wheat with *Ae. biuncialis* showed a wide range of yield traits. Some lines had a clavate spike and a hairy leaf blade. Using storage proteins as genetic markers the presence of chromosome 1U was identified among the progeny of plants analyzed; some of them had translocation of arm 1UL. Lines with introgressions of chromosome 1M were not revealed. **Conclusions.** *T. aestivum* lines with introgressions from *Ae. biuncialis* were developed without amphidiploid production. Lines with chromosome 1U were selected, including lines with translocations of arm 1UL.

Keywords: *Triticum aestivum* L., *Aegilops biuncialis* Vis., introgression.