

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

ДОСЛІДЖЕННЯ МАТЕРІАЛУ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ВІД ГІБРИДИЗАЦІЇ З *AEGILOPS BIUNCIALIS* VIS. ЗА ДОПОМОГОЮ МАРКЕРІВ ХРОМОСОМИ 1U

Мета. Дослідження матеріалу пшениці м'якої, одержаного від гібридизації з *Aegilops biuncialis* Vis., за допомогою локусів запасних білків як маркерів хромосоми 1U. **Методи.** Для ідентифікації алелів локусів *Gli-1* і *Glu-1* проводили електрофорез запасних білків зерна в кислих умовах та SDS-електрофорез. Маркерами хромосоми 1U *Ae. biuncialis* слугували: локус високомолекулярних субодиниць глютенінів *Glu-U1*, що розміщений на довгому плечі (1UL), і гліадин-кодуєчий локус *Gli-U1*, що знаходиться на короткому плечі (1US). **Результати.** У F₆₋₇ помічено елімінацію матеріалу хромосоми 1U з частотою близько 0,222. Це свідчить про те, що в процесі розмноження йде відбір проти незбалансованих генотипів, який можна спостерігати за допомогою маркерів хромосоми 1U. У гібридів пшениці від міжвидової гібридизації з *Ae. biuncialis* F₄–F₆ виявлено високу частоту формування генотипів із втратою плеча 1US за наявності 1UL. **Висновки.** Оскільки локус *Glu-U1*, що знаходиться на плечі 1UL, кодує високомолекулярні субодиниці глютенінів, які безпосередньо визначають хлібопекарну якість, створений матеріал пшениці є джерелом нового алеля цього локусу, інтрогресованого від *Ae. biuncialis*, для збагачення генофонду пшениці м'якої.

Ключові слова: *Triticum aestivum*, *Aegilops biuncialis*, запасні білки, інтрогресія.

Дикі і культурні родичі є джерелом нових корисних генів для збагачення генофонду пшениці м'якої *Triticum aestivum* L. (AABBDD, 2n=42) [1–5]. Залежно від геномного складу вирізняють первинний, вторинний і третинний генофонд пшениці [1, 2]. Первинний генофонд складають види з повністю гомологічними геномами: тетраплоїдна пшениця *T. turgidum* L.

(2n = 4x = 28, AABB) і диплоїдний *Aegilops tauschii* Coss. (2n=2x=14, DD). До вторинного генофонду відносять види, що мають геноми, споріднені з геномами А, В, і D: носії геному А – диплоїдні види *T. monococcum* L. і *T. urartu* Tumanian ex Gaudily, тетраплоїдна пшениця *T. timopheevii* Zhuk. (2n = 4x = 28, AAGG), гексаплоїд *T. zhukovskyi*, поліплоїдні види роду *Aegilops* з геномом D і *Ae. speltoides* Tausch (2n = 2x = 14, SS) з геномом S, спорідненим до геному В. Види, які не мають хоча б одного геному, гомологічного до А, В, і D, відносять до третинного генофонду [1, 2]. Це решта видів триби Triticeae, у тому числі багато видів роду *Aegilops*. До третинного генофонду пшениці відноситься і тетраплоїдний вид *Ae. biuncialis* Vis. (UUM^bM^b). Цей вид розглядають як потенційно корисний для перенесення генів стійкості до абіотичних факторів [6, 7], хвороб та генів, що визначають харчову цінність зерна [8, 9]. Так, створено матеріал пшениці з інтрогресіями від *Ae. biuncialis*, які істотно впливали на такі показники як: 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 [8]; вміст мі-кроелементів Zn і Mn у зерні пшениці [9]; стійкість до борошнистої роси та жовтої іржі [10]; вміст білка та показники хлібопекарної якості [11].

Відомо, що хлібопекарна якість борошна пшениці на 80 % визначається алельним складом локусів запасних білків, у першу чергу – локусів високомолекулярних субодиниць глютенінів [12]. Високомолекулярні субодиниці глютенінів у пшениці і споріднених видів кодується локусами, розміщеними на довгих плечах хромосом першої гомеологічної групи і харак-

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

теризуються високим поліморфізмом; на коротких плечах цих же хромосом розміщені локуси, що кодують гліадини і низькомолекулярні субодиниці глютенінів [13]. Тому ці господарчоважливі локуси запасних білків є зручними маркерами для пошуку інтрогресій хромосом першої гомеологічної групи. Метою нашої роботи було дослідження матеріалу від схрещень пшениці м'якої з *Ae. biuncialis* за маркерами хромосоми 1U – локусами *Glu-U1* і *Gli-U1*.

Матеріали і методи

Досліджували матеріал пшениці м'якої озимої F₄-F₇ від схрещення з *Ae. biuncialis* [14]. Для схрещень було використано сорти і лінії пшениці озимої Безоста 1, Одеська червоноколоса, лінії Б-16. Як батьківський компонент використано зразки з популяції Кара-Дага. Гібриди F₁ бекросували пшеницею. Наступні покоління вирощували поруч із посівами пшениці без ізоляції, що давало можливість перехресного запилення. Починаючи з F₄, проводили відбір рослин за масою зерна з рослини.

Гліадини аналізували електрофорезом у кислому середовищі в 10 % поліакриламідному гелі за методикою [15]. Електрофорез загального білка, у тому числі високомолекулярних (НМВ) субодиниць глютенінів, проводили за методикою Laemmli в 10 % розділяючому гелі за присутності додецилсульфату натрію (SDS-електрофорез) [16]. Аналізували по 5 окремих зерен з рослин F₄-F₇.

Результати та обговорення

У запропонованій роботі нами використано маркери хромосоми 1U *Ae. biuncialis*: локус високомолекулярних субодиниць глютенінів *Glu-U1*, що розміщений на довгому плечі (1UL), і гліадин-кодуючий локус *Gli-U1*, що знаходиться на короткому плечі (1US). Порівняння спектрів гліадинів після електрофорезу в кислих умовах та спектрів загального білка зерна на SDS-електрофореграмах у ліній від схрещення пшениці з *Ae. biuncialis* дозволило виявити присутність гліадинів, кодованих локусом *Gli-U1*, на SDS-електрофореграмі під зоною високомолекулярних субодиниць глютенінів (рис.).

Із використанням запасних білків (гліадинів і високомолекулярних субодиниць глютенінів), кодованих локусами *Gli-U1* і *Glu-U1*, як генетичних маркерів було ідентифіковано присутність хромосоми 1U серед потомства 14 з 21 проаналізованих рослин F₄. Серед зернівок із

цих рослин траплялися генотипи з експресією генів локусу *Glu-U1* та без продуктів експресії локусу *Gli-U1* (рис.). Було ідентифіковано п'ять ліній F₄ з маркером плеча 1UL у потомстві. Зерно з ліній F₄ з ідентифікованою хромосомою 1U або плечем 1UL було висіяно для подальших відборів.

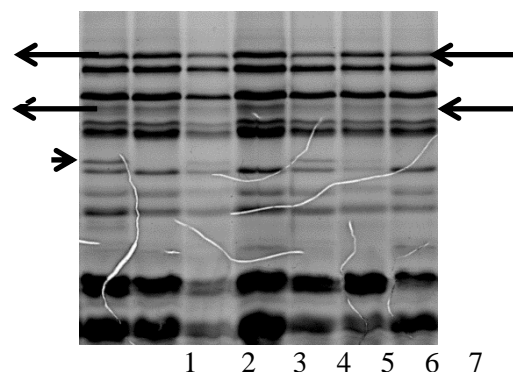


Рис. SDS-Електрофореграма загального білка окремих зернівок із рослин пшениці від міжвидової гібридизації з *Ae. biuncialis*: 1, 3, 5, 6) з цілою хромосомою 1U; 2, 4, 7) лише з плечем 1UL. Довгими стрілками показано високомолекулярні субодиниці глютенінів, кодовані генами локусу *Glu-U1* *Ae. biuncialis*; короткою стрілкою позначено гліадин, контрольований локусом *Gli-U1* *Ae. biuncialis*.

Щодо успадкування хромосоми 1U сім'ї міжвидових гібридів можна охарактеризувати таким чином, починаючи з F₄:

- 1) наявність хромосоми 1U (маркери – продукти експресії локусів *Gli-U1* і *Glu-U1*) у всіх проаналізованих зернах (таких виявилось три рослини F₄);
- 2) гетерогенність за наявністю хромосоми 1U (серед проаналізованих зерен є носії 1U та зерна без 1U) (три рослини F₄);
- 3) відсутність хромосоми 1U;
- 4) наявність маркера довгого плеча хромосоми 1U – 1UL (маркер – продукти експресії локусу *Glu-U1* та відсутність продуктів експресії *Gli-U1*) (одна рослина F₄);
- 5) гетерогенність за наявністю довгого плеча хромосоми 1U (серед проаналізованих зерен є носії 1UL та зерна без 1UL) (дві рослини F₄);
- 6) гетерогенність за наявністю хромосоми 1U, плеча 1UL та зерна без інтрогресії 1U (дві рослини F₄).

Серед рослин F₅ – потомства 11 окремих рослин F₄ від міжвидової гібридизації з *Ae. biuncialis*, відібраних за наявністю маркерів хромосоми 1U, – спостерігався розподіл за при-

сутністю хромосоми 1U, наведений у таблиці, і, відповідно, різні варіанти успадкування хромосоми 1U. Потомство однієї рослини F₄ (MVG 7-1 – гетерогенна за транслокацією 1UL) втратило плече 1UL, тоді як у потомстві іншої гетерогенної за транслокацією 1UL рослини F₄ (MVG 34-151) близько 40% потомків також виявилися гетерогенними за наявністю цього плеча. Серед потомства рослини MVG 32-16 з плечем 1UL 25 % втратили його, а у ще 25 % воно виявилось у гетерогенному стані, що свідчить про нестабільність його передачі. Серед носіїв хромосоми 1U дві лінії стабільно передавали її потомству (MVG 11-72 і MVG 11-9), тоді як у потомстві третьої лінії (MVG 7-23) спостерігалось розщеплення на 5 класів щодо наявності 1U, у тому числі з'являлися класи з наявністю лише плеча 1UL. Поява генотипів лише з плечем 1UL також спостерігалася у потомстві всіх рослин, гетерогенних за наявністю 1U. Таким чином, поява зернівок із маркером лише плеча 1UL спостерігалася *de novo* у рослин F₅ – потомства чотирьох рослин F₄.

Отже, серед рослин F₄, відібраних за наявністю маркерів хромосоми 1U, та їх потомків F₅ втрата плеча 1US за наявності 1UL спостерігалася у 9 з 11 випадків (82 %).

Було відібрано кращі за продуктивністю (масою зерна з рослини) рослини F₅ з наявністю матеріалу хромосоми 1U (ціла хромосома або плече) та пересіяно до одержання рослин F₇. Аналіз динаміки передачі матеріалу хромосоми 1U в F₅-F₇ показав, що мала місце істотна елімінація матеріалу хромосоми 1U в F₆ з частотою

0,222 ($\chi^2 = 44,8$, $P < 0,001$) та в F₇ з частотою 0,227 ($P = 0,024$ за one-tailed Fisher Exact Probability Test). Очевидно, в процесі розмноження йде відбір проти незбалансованих генотипів, який ми можемо спостерігати за допомогою маркерів хромосоми 1U.

Відомо, що у рослин уніваленти в мейозі мають схильність до поперечного розщеплення по центромері (centric misdivision) з формуванням телоцентриків [17–19]. У результаті цього процесу далі можуть формуватися також ізохромосоми або, за наявності двох різних унівалентів, центричні транслокації [19]. З використанням подвійних моносоміків різноманітні центричні транслокації у пшениці одержано, зокрема, за участі хромосом жита [20], *Thinopyrum elongatum* [21], *Dasypyrum villosum* [22]. Очевидно, незбалансований набір хромосом пшениці і *Ae. biuncialis* у нашому матеріалі від міжвидової гібридизації також призводить до формування телоцентриків або центричних транслокацій. Ці явища ми можемо спостерігати з використанням запасних білків як генетичних маркерів хромосоми 1U: регулярну появу генотипів із відсутністю маркерів короткого плеча 1US за наявності 1UL. Слід зазначити, що на цьому матеріалі ми практично не виявляли формування генотипів лише з коротким плечем хромосоми 1U. Це може бути пов'язано з втраченою телоцентриків із плечем 1US під час формування гамет, їх зниженою передачею або ж низькою життєздатністю таких генотипів.

Таблиця. Розподіл рослин F₅ – потомства окремих рослин F₄ – пшениці від міжвидової гібридизації з *Ae. biuncialis* за наявністю хромосоми 1U

Рослина F ₄	1U	het*1U	без 1U	1UL	het1UL	het 1UL, 1U
MVG 7-1 (het 1UL)			10			
MVG 7-23 (1U)	1	2	1		1**	3**
MVG 11-72 (1U)	9					
MVG 11-9 (1U)	9					
MVG 12-155 (het 1U, 1UL)		3	6		1	1
MVG 12-154 (het 1U)	1	4	6		1**	
MVG 12-111 (het 1U)			9		1**	1**
MVG 23-198 (het 1U, 1UL)		1	9		1	1
MVG 32-16 (1UL)			3	6	3	
MVG 32-59 (het 1U)	2	1	1			2**
MVG 34-151 (het 1UL)			7		5	
MVG 36-53 (het 1U)		2	7			4**

Примітки: * het - гетерогенні за присутністю; ** поява генотипів з 1UL *de novo*.

Висновки

У ліній пшениці від гібридації з *Ae. biuncialis* помічено елімінацію матеріалу хромосоми 1U з частотою близько 0,222 в F₆–F₇. Очевидно, в процесі розмноження йде відбір проти незбалансованих генотипів, який ми можемо спостерігати за допомогою маркерів хромосоми 1U. Виявлено високу частоту формування генотипів із втратою плеча 1US за наяв-

ності 1UL у гібридів пшениці від міжвидової гібридації з *Ae. biuncialis*. Оскільки локус *Glu-1U1*, що знаходиться на плечі 1UL, кодує високомолекулярні субодиниці глютенінів, які безпосередньо визначають хлібопекарну якість, створений матеріал пшениці є джерелом нових алелів цих білків, інтрогресованих від *Ae. biuncialis*, для збагачення генофонду пшениці м'якої.

References

1. Qi L., Friebe B., Zhang P., Gill B.S. Homoeologous recombination, chromosome engineering and crop improvement. *Chromosome Res.* 2007. Vol. 15. P. 3–19. DOI: 10.1007/s10577-006-1108-8
2. Chaudhary H.K., Kaila V., Rather S.A., Badiyal A., Hussain W., Jamwal N.S., Mahato A. Wheat. *Alien Gene Transfer in Crop Plants. Volume 2 Achievements and Impacts.* Springer Science+Business Media, LLC 2014. P. 1–26. doi: 10.1007/978-1-4614-9572-7_1.
3. 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.
4. 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.
5. Ceoloni C., Kuzmanović L., Ruggeri R., Rossini F., Forte P., Cuccurullo A., Alessandra A. Harnessing genetic diversity of wild gene pools to enhance wheat crop production and sustainability: challenges and opportunities. *Diversity.* 2017. Vol. 9. A. 55. doi: 10.3390/d9040055.
6. 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.
7. Dulai S., Molnár I., Szpórkó 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.
8. Rakszegi M., I. Molnár, Lovgrove 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.
9. 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.
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. Payne P.I. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1987. Vol. 38. P. 141–153.
13. McIntosh R.A. Catalogue of Gene Symbols. Gene Catalogue 2013. URL: <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/2013/GeneSymbol.pdf> (last accessed: 11.02.2019).
14. Kozub N.O., Sozinov I.O., Bidnyk H.Ya., Demianova N.O., Sozinova O.I., Karelov A.V., Pylypenko L.A., Blume Ya.B., Sozinov O.O. Development and studying of *Triticum aestivum* L. material with introgressions from *Aegilops biuncialis* Vis. *Factors of Experimental Evolution of Organisms.* Київ, 2018. Vol. 23. P. 297–301. [in Ukrainian] / 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. Створення і дослідження матеріалу *Triticum aestivum* L. з інтрогресіями від *Aegilops biuncialis* Vis. *Фактори експериментальної еволюції організмів:* зб. наук. пр. НАН України. ІМБіГ, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова. редкол.: В.А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. К.: Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова. 2018. Т. 23. С. 297–301.
15. 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.
16. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970. Vol. 227, No. 5259. P. 680–685. doi: 10.1038/227680a0.
17. Darlington C.D. Misdivision and the genetics of the centromere. *J. Genet.* 1939. Vol. 37. P. 341–364.
18. Sears E.R. Misdivision of univalents in common wheat. *Chromosoma.* 1952. Vol. 4. P. 535–550.
19. Lukaszewski A.J. Behavior of centromeres in univalents and centric misdivision in wheat. *Cytogenet. Genome Res.* 2010. Vol. 129. P. 97–109. doi: 10.1159/000314108.
20. Lukaszewski A.J. A set of new IRS translocations from wheat cv. Amigo in a uniform genetic background. *Euphytica.* 2017. Vol. 213. P. 214.

21. Liu C., Qi L., Liu W., Zhao W., Wilson J., Friebe B., Gill B.S. Development of a set of compensating *Triticum aestivum*–*Dasypyrum villosum* Robertsonian translocation lines. *Genome*. 2011. Vol. 54. P. 836–844. doi: 10.1139/G11-051.
22. Tanaka H., Nabeuchi Ch., Kurogaki M., Garg M., Saito M., Ishikawa G., Nakamura T., Tsujimoto H. A novel compensating wheat–*Thinopyrum elongatum* Robertsonian translocation line with a positive effect on flour quality. *Breeding Science*. 2017. Vol. 67. P. 509–517.

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

¹ Institute of Plant Protection, NAAS of Ukraine,

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

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

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

STUDYING COMMON WHEAT MATERIAL FROM CROSSES WITH *AEGILOPS BIUNCIALIS* VIS. USING MARKERS FOR CHROMOSOME 1U

Aim. The aim of the research was to study common wheat material developed from crosses with *Aegilops biuncialis* Vis. using storage protein loci as markers for chromosome 1U. **Methods.** SDS and APAG electrophoreses of seed storage proteins were employed to identify alleles at the *Glu-1* and *Gli-1* loci. The following markers of chromosome 1U of *Ae. biuncialis* were used: the *Glu-U1* locus encoding high-molecular-weight glutenin subunits located on the long arm (1UL) and the gliadin locus *Gli-U1* on the short arm (1US). **Results.** In F₆–F₇, elimination of chromosome 1U material with a frequency of about 0.222 proceeded. This indicates selection against unbalanced genotypes, which could be tracked using markers for chromosome 1U. In wheat F₄–F₆ hybrids from crosses with *Ae. biuncialis*, we revealed a high frequency of formation of genotypes possessing the 1UL arm and lacking 1US. **Conclusions.** Since the *Glu-U1* locus on the arm 1UL encodes high-molecular-weight subunits which directly determine bread-making quality, the developed wheat material is a source of a new allele of this locus introgressed from *Ae. biuncialis* for enriching the common wheat gene pool.

Keywords: *Triticum aestivum*, *Aegilops biuncialis*, storage proteins, introgression.