

НАВАЛІХІНА А. Г.✉, АНТОНЮК М. З., ТЕРНОВСЬКА Т. К.

Національний університет «Києво-Могилянська академія»,

Україна, 04655, м. Київ, вул. Сковороди, 2

✉ a.navalihina@gmail.com

## НЕАДИТИВНА ЕКСПРЕСІЯ РЕГУЛЯТОРІВ РОЗВИТКУ ОСТЕЙ У ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ІЗ ІНТРОГРЕСІЯМИ ВІД *AMBLYOPYRUM MUTICUM*

**Мета.** Неадитивна експресія гомеотичних генів вважається причиною появи небатьківських фенотипів у рослин гібридного походження. Раніше були ідентифіковані послідовності генів, ортологічних регуляторам розвитку остей, у рису та ячменю, *TaTOB1*, *TaDL*, *TaKNOX3* та *TaETT2* у геномі пшениці м'якої. Неадитивна експресія цих регуляторних генів може бути причиною появи рослин із остеподібними відростками серед безостих ліній пшениці м'якої із інтрогресіями від *Amblyopyrum muticum*. **Методи.** Експресію генів визначали методом зворотнотранскрипційної кількісної ПЛР із кінцевою детекцією. **Результати.** Інтрогресивні лінії *Triticum aestivum* / *A. muticum* мають знижений рівень експресії трьох регуляторних генів: *TaTOB1*, *TaKNOX3* та *TaETT2*. Ортологи генів *TaTOB1*, *TaKNOX3* є негативними регуляторами розвитку остей у рису та ячменю, тому зниження рівня їхньої експресії у ліній могло спричинити розвиток остей. Виявлена мінливість в експресії трьох генів не була специфічною для ліній із небатьківським фенотипом. **Висновки.** Через відсутність кореляції фенотипу із зниженим рівнем експресії досліджуваних генів виявлена мінливість не вважається безпосередньою причиною появи рослин із небатьківським фенотипом серед інтрогресивних ліній.

**Ключові слова:** амфідиплоїди, неадитивна експресія, генетика розвитку, ості.

Неадитивна експресія генів у рослин гібридного походження, що є складовою феномену, який має назву «геномний шок», є встановленим і багатим на приклади фактом [1–5]. Відмінну від батьків експресію вважають причиною виникнення нових градацій ознак, не властивих батькам, оскільки при цьому повністю змінюються регуляторні мережі, які диригують проявом ознак [6]. Якщо зміни в експресії торкаються гомеотичних генів, то вони стають

причиною появи нових фенотипів серед нащадків [7–9].

Гени *DL*, *TOB1* та *ETT2* є регуляторами розвитку остей у рису, а *HvKNOX3* – у ячменю [10–12]. Раніше виявлені пшеничні ортологи цих генів – *TaDL*, *TaTOB1*, *TaETT2* та *TaKNOX3* – є цілком імовірними кандидатами на роль регуляторів розвитку остей у пшениці м'якої [13, 14]. Роль неадитивної експресії *TaDL*, *TaTOB1*, *TaETT2* та *TaKNOX3* у появі небатьківських фенотипів – остистих рослин у ліній пшениці м'якої із інтрогресіями від *Aegilops sharonensis* та *Ae. umbellulata* – була встановлена нами у попередніх дослідженнях [24]. У цій роботі ми показуємо, що у ліній пшениці м'якої із інтрогресіями від *A. muticum*, серед яких є такі, що мають небатьківський фенотип щодо остистості, має місце неадитивна експресія чотирьох генів-регуляторів розвитку остей.

### Матеріали і методи

У роботі було використано такий рослинний матеріал: озиму м'яку пшеницю *Triticum aestivum* ( $2n=6x=42$ , AABBDD), сорт Аврора; геномно-заміщений амфідиплоїд Авротіка ( $2n=6x=42$ , AABBTT), який об'єднує тетраплоїдний компонент м'якої пшениці (AABB) та геном TT *Amblyopyrum muticum*; інтрогресивні лінії, отримані від схрещувань Авротіки та Аврори, що розщепилися із утворенням ліній, які мають різний фенотип: Тіса 30.2/7 (H25, H31, H32), Тіса 42.4/8 (H20, H29) та Тіса 14.4/1 (H9, H30, H7, H28) [15, 16]. Батьківські генотипи Аврора та Авротіка є безостими, рослини ліній H25, H31, H32, H20, H29 мають остеподібні відростки, рослини H9, H30, H7, H28 безості.

Тотальну РНК виділяли із квіткових лусок досліджуваних рослин із використанням методу, описаного в [17]. Реакцію зворотної транскрипції проводили за методом полі-А праймування із використанням RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, США) згідно з інструкціями виробника. Праймери для

подальшої ПЛР розробляли із використанням інструмента Primer-BLAST до послідовностей генів *TaDL* (AB470269.1), *TaETT2* (AY376129.1), *TaKNOX3* (AB182943.1), та *TaTOB1* (Traes\_2BL\_8BEA9CE1B.1) [13, 18]. Праймери для ампліфікації референтного гена (актин) було взято із [19]. Кількісну ПЛР із кінцевою детекцією проводили за методом, описаним у [20]. Продукти ампліфікації розділяли в 2 % агарозному гелі на SB буфері і виявляли через флуоресценцію етидій броміду [21]. Кількісну оцінку отриманого на електрофореграмі продукта виконували із використанням програми Gel Analyzer за калібрувальним графіком ( $r > 0.9$ ) для маркера OGeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США) [22]. Отримані значення в одиницях нг/бенд нормалізували до рівнів експресії референтного гена актину.

Статистичний аналіз даних виконували із використанням критеріїв Шапіро-Уїлка та Стюдента [23].

### Результати та обговорення

Серед ліній, що походять від Авротіки, ознака остистість колосу має дві градації: повна відсутність остей (лінії Н9, Н30, Н7, Н28) та наявність остеподібних відростків (лінії Н25, Н31, Н32, Н20, Н29). Перша із градацій є фенотипом Авротіки, тоді як друга є ознакою, не властивою для амфідиплоїда Авротіки. Оскільки неадитивна експресія регуляторних генів вважається причиною появи нових фенотипів у рослин гібридного походження [4, 9], то очікували знайти серед чотирьох досліджуваних генів такі, у яких відмінний від середньобатьківського рівень експресії буде пов'язаний із наявністю остеподібних відростків в інтрогресивних лініях.

Ген *TaTOB1*, який є ортологом супресора розвитку остей *TOB1* у рису, раніше був ідентифікований нами у геномі пшениці м'якої [13]. Експресію цього гена було знайдено у квіткових лусках пшениці м'якої сорту Аврора, а також двох геномно-заміщених амфідиплоїдів – Аврозису та Авролати [24]. У цій роботі експресію гена *TaTOB1* було детектовано у квіткових лусках геномно-заміщеного амфідиплоїду Авротіка та досліджуваних інтрогресивних лініях – похідних Авротіки, – які мають остеподібні відростки, або ж є безостими (рис. 1, 2). За розділення продуктів ПЛР із кДНК Авротіки та ліній на електрофореграмі наявні два компонен-

ти, які є продуктами ампліфікації двох різних транскриптів гена *TaTOB1*, один із яких містить послідовність інтрону (як вже було показано раніше для Аврори та двох амфідиплоїдів) [24]. Серед інтрогресивних ліній Авротіки спостерігається мінливість за наявністю двох транскриптів – на електрофореграмі може бути наявний продукт ампліфікації лише легкого транскрипта, як у рослин лінії Н25 (рис. 1), або лише продукт ампліфікації більшого за розміром транскрипта, як в однієї із рослин лінії Н28 (рис. 2), можуть бути наявні також обидва продукти із однаковою або різною інтенсивністю флуоресценції смужок. Оскільки мінливість у рівнях експресії спостерігається для двох транскриптів незалежно один від одного, то подальший аналіз проводили для кожного із них окремо.

За наявністю продукту ампліфікації важкого транскрипту гена *TaTOB1* спостерігали якісну мінливість. Він був відсутній у шести рослин із безостих ліній та у чотирьох рослин лінії Н25 із остеподібними відростками (рис. 1, 2). В інтрогресивних лініях обох фенотипних класів, у яких важкий компонент був наявний, кількість ампліфікованої ДНК в ньому була на рівні достовірно нижчому ( $t = 7,00$ ) від батьківського (табл.). Щодо легшого компонента, то достовірної різниці між рівнями його експресії у батьків та інтрогресивних ліній, що мають остеподібні відростки ( $t = 3,00$ ), виявлено не було (табл.). Раніше ми зазначали, що ген *TaTOB1* виконує роль інгібітора розвитку остей у пшениці м'якої, і відсутність його експресії в інтрогресивних лініях Аврозису та Авролати пов'язана із появою у них остей [24]. У цій роботі ми встановили, що в інтрогресивних лініях – похідних Авротіки – легкий транскрипт гена *TaTOB1* має рівень експресії, що не відрізняється від такого у батьків, а важкий транскрипт експресується на нижчому рівні, відмінному від середньобатьківського. Інтрогресивні лінії Авротіки демонструють знижений рівень експресії важкого транскрипта гена *TaTOB1* або ж повну відсутність експресії незалежно від фенотипу за ознакою остистість. Знижений рівень експресії, незалежно від фенотипу ліній, не дає можливості напряму пов'язати детектовану мінливість із появою нової градації ознаки, хоча це може бути одним із кроків у комплексі змін регуляторної мережі, що уможливили розвиток остеподібних відростків. Крім того, оскільки не відомо, який із транскриптів гена дає функціональний продукт, ми не можемо робити однозначних

висновків щодо ролі виявленої мінливості в експресії важчого транскрипта гена *TaTOB1* за відсутності мінливості в експресії легшого транскрипта. Тому для встановлення ролі зниження рівня експресії гена *TaTOB1* у появі небатьківського фенотипу серед інтрогресивних ліній – похідних Авротіки – необхідно мати додаткову інформацію про функціонування цього гена і його місце у генній мережі, що регулює розвиток остей.

Експресію гена *TaDL*, що є ортологом позитивного регулятора розвитку остей у рису, було детектовано у квіткових лусках Авротіки та безостих інтрогресивних ліній. За рівнем експресії гена *TaDL* між батьками та безостими рослинами різниці не спостерігали ( $t = 1,88$ ). У ліній із остеподібними відростками мінливість в експресії гена *TaDL* набувала якісного характеру – у всіх рослин, які належали до ліній H25, H31, H20 та H29, експресії гена *TaDL* не було детектовано, тоді як у трьох із чотирьох досліджених рослин лінії H34 її рівень був на рівні із батьками (рис. 1). Загалом ми можемо стверджувати, що наявність експресії *TaDL* в інтрогресивних ліній – похідних Авротіки – пов'язана із батьківським фенотипом, а її відсутність – із фенотипом, відмінним від батьків. Оскільки ген *DL* є промотором розвитку остей у рису [10], ми можемо припустити, що у пшениці м'якої він виконує ідентичні функції, тоді відсутність його експресії у рослин, які мають остеподібні відростки, не може розглядатися як безпосередня причина появи небатьківського фенотипу серед інтрогресивних ліній Авротіки. Втім, цілком імовірно, що в регуляції розвитку остей, крім

досліджуваних, задіяні й інші регуляторні гени, які разом із *TaDL* утворюють генну мережу. Отже, відсутність експресії *TaDL* може бути лише одним із симптомів цілого комплексу змін у цій мережі, які і призвели до появи небатьківського фенотипу в інтрогресивних ліній Авротіки.

Експресію двох генів *TaKNOX3* та *TaETT2* було виявлено у лусках Авротіки та всіх похідних інтрогресивних ліній. Для обох генів між безостими інтрогресивними лініями і лініями із остеподібними відростками не було знайдено різниці в рівнях експресії, тому ці дві групи було об'єднано в одну. Порівняння рівнів експресії генів *TaKNOX3* та *TaETT2*, таким чином, проводили між батьками (Аврора та Авротіка) і об'єднаною групою інтрогресивних ліній. Було виявлено, що гени *TaKNOX3* та *TaETT2* експресуються в інтрогресивних ліній Авротіки на рівні достовірно нижчому, ніж у батьків (табл.). Раніше нами було з'ясовано, що відсутність експресії *TaKNOX3* в інтрогресивних ліній Аврозису та Авролати може бути пов'язана із появою у них небатьківського фенотипу – наявності остей [24]. Аналогічний зв'язок між зниженим рівнем експресії *TaKNOX3* у ліній Авротіки і появою рослин із небатьківським фенотипом ми знаходимо в цьому дослідженні. Оскільки нижчий рівень експресії *TaKNOX3* властивий як для ліній Авротіки із небатьківським фенотипом, так і для безостих ліній, то наш висновок щодо ролі цієї різниці є не таким однозначним.

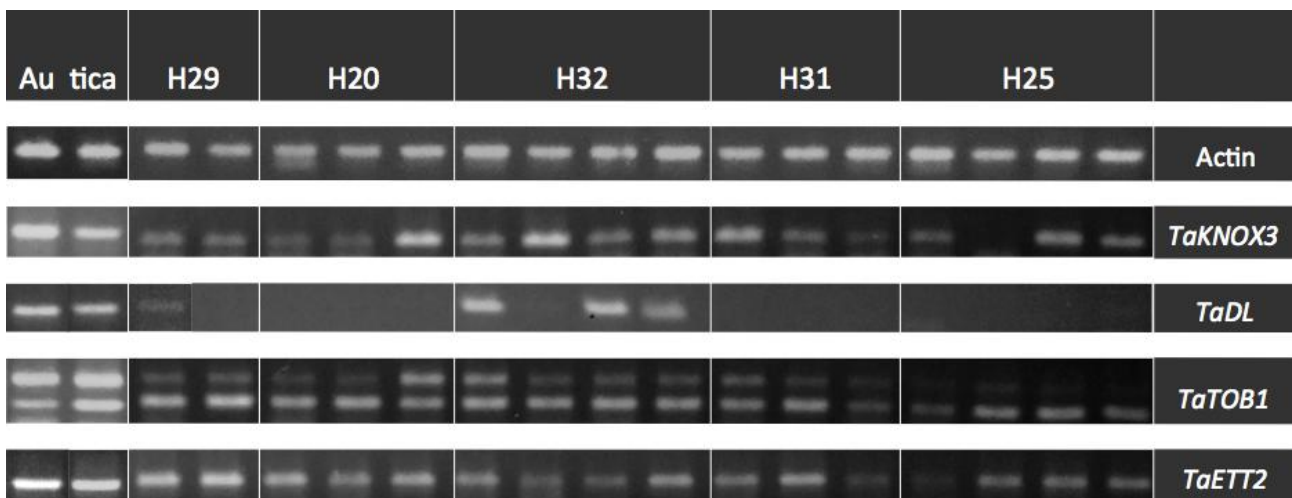


Рис. 1. Експресія генів-регуляторів розвитку остей в інтрогресивних ліній, похідних Авротіки, які мають остеподібні відростки.

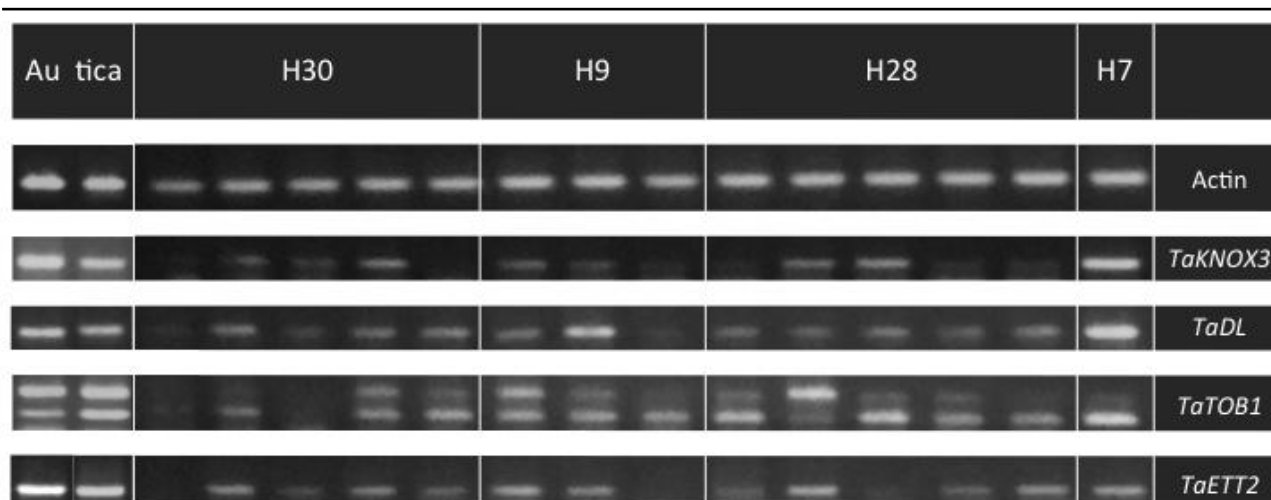


Рис. 2. Експресія генів-регуляторів розвитку остей у безостих інтрогресивних лініях – похідних Авротіки.

Таблиця. Експресія генів-регуляторів розвитку остей у пшениці м'якої сорту Аврора, амфідиплоїда Авротіка та похідних інтрогресивних ліній

Ген	Середні значення кількості ДНК після ПЛР (нг/бенд), нормалізовані до відповідних значень для референтного гена $\pm$ стандартне відхилення			t / t <sub>0.01</sub>	
	Аврора, Авротіка	Лінії			
		З остеподібними відростками	Безості		
<i>TaTOB1</i>	L	40,0 $\pm$ 26,0	54,7 $\pm$ 34,0	27,3 $\pm$ 21,0	3,00 / 3,38
	H	82,4 $\pm$ 22,5	17,2 $\pm$ 13,8	21,2 $\pm$ 24,5	<b>7,00 / 3,50</b>
<i>TaKNOX3</i>	46,5 $\pm$ 14,0	26,2 $\pm$ 20,0			<b>3,12 / 2,74</b>
<i>TaETT2</i>	65,3 $\pm$ 20,0	24,7 $\pm$ 20,0			<b>4,73 / 2,73</b>
<i>TaDL</i>	43,4 $\pm$ 10,4	якісна мінливість	27,4 $\pm$ 25,6		1,88 / 2,92

### Висновки

Інтрогресивні лінії – похідні амфідиплоїда Авротіка, – серед яких є лінії із остеподібними відростками, що є градацією ознаки, не притаманною батьківським генотипам Аврорі та Авротіці, мають знижений рівень експресії трьох регуляторів розвитку остей – *TaTOB1*, *TaKNOX3* та *TaETT2*. Ортологи генів *TaTOB1* і *TaKNOX3* у рису та ячменю є негативними регуляторами розвитку остей, тому зниження їхньої експресії могло стати причиною появи остеподібних від-

ростків у лінії пшениці, що мають інтрогресії від *A. muticum*.

Фенотипи ліній за ознакою остистість не виявляють однозначної кореляції із рівнем експресії трьох перевірених генів, для яких було знайдено відмінності від батьківського рівня. Втім, виявлена мінливість в експресії цих генів вказує на зміни, що відбулися в транскриптомі ліній та призвели до появи у них остеподібних відростків.

### References

- Pumphrey M., Bai J., Laudencia-Chinguanco D., Anderson O., Gill B.S. Nonadditive expression of homoeologous genes is established upon polyploidization in hexaploid wheat. *Genetics*. 2009. Vol. 181. P. 1147–1157.
- He P., Friebe B.R., Gill B.S., Zhou J-M. Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat. *Plant Mol Biol*. 2003. Vol. 52. P. 401–414.
- Liu B., Xu C., Zhao N., Qi B., Kimatu J. N., Pang J. et al. Rapid genomic changes in polyploid wheat and related species: implications for genome evolution and genetic improvement. *J Genet Genomics*. 2009. Vol. 36. P. 519–528.
- Chen Z.J., Ni Z. Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *Bioessays*. 2006. Vol. 28. P. 240–252.
- Kashkush K., Feldman M., Levy A. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics*. 2002. Vol. 160. P. 1651–1659.

6. Feldman M., Levy A. Genome evolution due to allopolyploidization in wheat. *Genetics*. 2012. Vol. 192. P. 763–774.
7. Jackson S., Chen Z. J. Genomic and expression plasticity of polyploidy. *Curr Opin Plant Biol*. 2010. Vol. 13. P. 153–159.
8. Song Q., Chen Z.J. Epigenetic and developmental regulation in plant polyploids. *Curr Opin Plant Biol*. 2015. Vol. 24. P. 101–109.
9. Chen Z.J. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annu Rev Plant Biol*. 2007. Vol. 58. P. 377–406.
10. Toriba T., Hirano H-Y. The *DROOPING LEAF* and *OsETTIN2* genes promote awn development in rice. *Plant J*. 2014. Vol. 77. P. 616–626.
11. Tanaka W., Toriba T., Ohmori Y., Yoshida A., Kawai A., Mayama-Tsuchida T. et al. The YABBY Gene *TONGARI-BOUSHI1* Is Involved in Lateral Organ Development and Maintenance of Meristem Organization in the Rice Spikelet. *Plant Cell*. 2012. Vol. 24. P. 80–95.
12. Müller K.J., Romano N., Gerstner O., Garcia-Maroto F., Pozzi C., Salamini F. et al. The barley Hooded mutation caused by a duplication in a homeobox gene intron. *Nature*. 1995. Vol. 374. P. 727–730.
13. Navalikhina A., Antonyuk M., Pasichnyk T., Ternovska T. Identification of *Oryza sativa* awn development regulatory genes orthologs in Triticinae accessions. *Cytol Genet*. 2019. Vol. 53 (in press).
14. Ishikawa M, Ohmori Y, Tanaka W, Hirabayashi C, Murai K, Ogihara Y, et al. The spatial expression patterns of *DROOPING LEAF* orthologs suggest a conserved function in grasses. *Genes Genet Syst*. 2009. Vol. 84. P. 137–146.
15. Iefimenko T.S., Antonyuk M.Z., Martynenko V.S., Navalihina A.G., Ternovska T.K. Introgression of *Aegilops mutica* Genes into Common Wheat Genome. *Cytology and Genetics*. 2018. Vol. 52. P. 21–30.
16. Navalikhina A., Antonyuk M., Ternovska T. CDDP Markers MYB and MYC Spectra Variability in Introgressive Wheat Lines. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2017. Vol. 20. P. 73–78. [in Ukrainian] / Наваліхіна А., Антонюк М., Терновська Т. Мініливість спектрів маркерів MYC ТА MYB у інтрогресивних ліній пшениці. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2017. Т. 20. С. 73–78.
17. Peng J., Xia Z., Chen L., Shi M., Pu J., Guo J. et al. Rapid and Efficient Isolation of High-Quality Small RNAs from Recalcitrant Plant Species Rich in Polyphenols and Polysaccharides. *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9. P. 12–14.
18. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012. Vol. 13. P. 134.
19. Debernardi J.M., Lin H., Chuck G., Faris J.D., Dubcovsky J. microRNA172 plays a crucial role in wheat spike morphogenesis and grain threshability. *Development*. 2017. Vol. 144. P. 1966–1975.
20. Nolan T., Hands R.E., Bustin S.A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*. 2006. Vol. 1. P. 1559–1582.
21. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory press. New York. 1989. P. 931–957.
22. Lazar I. Gel Analyzer. URL: [www.gelanalyzer.com](http://www.gelanalyzer.com).
23. Shapiro S.S., Martin B.W. An Analysis of Variance Test for Normality. *Biometrika*. 1965. Vol. 52. P. 591–611.
24. Navalikhina A., Antonyuk M., Iefimenko T., Ternovska T. Formation of awns in wheat lines with introgressions from *Aegilops* spp. caused by non-additive expression of novel regulatory genes. Unpublished.

**NAVALIKHINA A. G., ANTONYUK M. Z., TERNOVSKA T. K.**

*National University of “Kyiv-Mohyla Academy”,*

*Ukraine, 04655, Kyiv, Skovorody str., 2, e-mail: a.navalihina@gmail.com*

#### **NON-ADDITIVE EXPRESSION OF AWN DEVELOPMENT REGULATORY GENES IN THE BREAD WHEAT LINES WITH INTROGRESSIONS FROM *AMBLYOPYRUM MUTICUM***

**Aim.** Nonadditive expression of homeotic genes is considered to cause the development of nonparental phenotypes in the plants of hybrid origin. Previously, orthologs of rice and barley awn development regulators *TaTOB1*, *TaDL*, *TaKNOX3*, and *TaETT2* were identified in the bread wheat genome sequence. Nonadditive expression of these regulators can be the reason for the emergence of non-parental terminally awned phenotypes among the bread wheat lines with introgressions from *Amblyopyrum muticum*. **Methods.** Gene expression was identified with end-point detection RT-qPCR. **Results.** Introgressive lines have expression of *TaTOB1*, *TaKNOX3*, and *TaETT2* at the lower level compared to parents. As orthologs of *TaTOB1* and *TaKNOX3* are negative regulators of awn development in rice and barley, their reduced expression could have caused the appearance of terminally awned plants among introgressive lines. Nevertheless, the reduced expression of the genes wasn't specific to the lines with non-parental phenotype. **Conclusions.** Due to the lack of correlation between reduced expression of the genes studied and non-parental phenotype of the introgressive lines, the role of nonadditive expression of *TaTOB1*, *TaKNOX3*, and *TaETT2* in the development of this phenotype is not clear.

**Keywords:** amphidiploids, non-additive expression, developmental genetics, awns.