

■ ОРИГИНАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 631.523:581.13

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНІВ, ОРТОЛОГІЧНИХ РЕГУЛЯТОРАМ РОЗВИТКУ ОСТЕЙ *ORYZA SATIVA*, У ПРЕДСТАВНИКІВ TRITICINAЕ

А.Г. НАВАЛІХІНА, М.З. АНТОНЮК, Т.В. ПАСІЧНИК, Т.К. ТЕРНОВСЬКА

Національний університет «Києво-Могилянська академія», вул. Сквороди, 2, Київ

E-mail: a.navalihina@gmail.com, antonyuk.m@ukma.edu.ua, t.pasichnyk@ukma.edu.ua, ternovska@ukma.edu.ua

Інформація про генетичний контроль розвитку оствей на колосі пшеници м'якої на сьогодні обмежена ідентифікацією трьох генів – інгібіторів розвитку оствей – *Hd*, *B1* та *B2*, а генів-промоторів остистості досі не знайдено. На іншому злаку, *Oryza sativa*, встановлено наявність десятка генів, що беруть участь у морфогенезі оствей. У статті наведено результати аналізу сиквенсу пшеничного геному для пошуку генів, ортологічних відомим регуляторам розвитку оствей у рису – *TOB1*, *ETT2* i *DL*. За допомогою біоінформатичних методів у геномі пшеници м'якої ідентифіковані гени *TaTOB1*, *TaETT2* i *TaDL*, встановлено їхню хромосому локалізацію у геномі пшеници, це, відповідно, хромосоми 2-ої, 3-ої та 4-ої груп всіх трьох субгеномів. Описано поліморфізми гомеоалелів вказаних генів за довжинами екзонів і інtronів у субгеномах *A*, *B* та *D* пшеници м'якої. Поліморфізм включає варіювання за довжиною екзонів та інtronів у всіх трьох генах, варіювання за кількістю екзонів та інtronів для гена *TaETT2* та інверсію гомеоалеля *TaDL-B* у порівнянні з двома іншими та гомеоалелів *TaETT2-B* та *TaETT2-D* у порівнянні з *TaETT2-A*. Із використанням ПЛР з праймерами, створеними за послідовністю гена *TaTOB1*, гомеоалелі цього гена ідентифіковано в геномах *A^a*, *A^b*, *B*, *G*, *D*, *S^{sh}*, *M*, *U*, *T* у диплоїдних, тетраплоїдних та гексаплоїдних видів пшеницевих. Показано маркерний потенціал двох пар праймерів до гена *TaTOB1* щодо вивчення геномної структури інтрогресивних ліній пшеници стосовно цього гена.

Ключові слова: пшениця м'яка, остві, гени морфогенезу оствей, види егілонсів, аналіз сиквенсу генома пшеници

Вступ. Наявність оствей, стрільчастих видовжень на зовнішній квітковій лусці злакових рослин,

є морфологічною ознакою, яка серед кількох інших використовується для диференціації різновидів пшеници м'якої (*Triticum aestivum L.*): серед 14-ти різновидів шість мають безостий колос, вісім – остистий [1]. У пшениці твердої (*T. durum Desf.*) природного поліморфізму за остистістю немає, всі дев'ять її різновидів мають остистий колос. Сучасні сорти пшениці твердої без добре розвинених оствей, мають у родоводі пшеницю м'яку, від якої і отримали гени-інгібітори розвитку оствей. Генетичний контроль остистості у пшениці вивчається давно [2] і не в останнє чергу через явний маркерний потенціал цієї ознаки, перш за все при роботі з інтрогресивними генотипами пшеници [3, 4]. Досі наявність оствей у пшениці м'якої пов'язують з відсутністю у генотипі хоча б двох з трьох відомих домінантних інгібіторів остистості – *Hd* (4AS), *B1* (5AL) та *B2* (6BL) [5–7]. Ості є структурами детермінованими, вважаються видозміненими листками, отже в контролі їхнього розвитку серед інших мають брати участь гомеотичні гени. Утворюються ості за рахунок поділу клітин у площині, перпендикулярній до напрямку апікально-базальної осі [8]. Поліморфізм за ознакою виявляється від повної їхньої відсутності до розвитку повноцінних оствей. Немає сумніву, що в контролі цієї ознаки беруть участь чимало генів, серед яких обов'язково мають бути промотори поділів клітин, активність яких призводить до утворення стрільчастих подовжень. У рису посівного, відомо близько десяти локусів кількісних ознак, залучених до формування остві [9]. Серед ідентифікованих

© А.Г. НАВАЛІХІНА, М.З. АНТОНЮК, Т.В. ПАСІЧНИК, Т.К. ТЕРНОВСЬКА, 2019

генів більшість кодують транскрипційні фактори і тому мають плейотропну дію: ген *An-1* кодує транскрипційний фактор із родини bHLH, гени *DL* та *TOB1* – транскрипційні фактори із родини YABBY, а ген *OsETT2* – транскрипційний фактор із родини ARF [9–11]. Інші гени рису, що впливають на морфогенез остеїв, – *SHL2*, *SHO1*, *SHO2* та *WAF1* – кодують ферменти шляху біосинтезу малих інтерферуючих РНК транс-дії, отже також мають регуляторну функцію [12–15]. Імовірно, що всі відомі гени рису складають мережу, яка регулює розвиток ості, проте про молекулярні механізми дії та взаємодії їхніх продуктів в межах такої мережі відомостей поки немає. Встановлено лише, що між *DL* та *OsETT2* існує взаємодія за типом активації (оскільки мутанти *dl* не експресують *OsETT2*), а малі РНК транс-дії, синтезовані за участю згаданих генів *SHL2*, *SHO1*, *SHO2* та *WAF1*, пригнічують експресію *OsETT2* [9, 15]. Щодо пшениць, гени-промотори розвитку остеїв не входять до сучасного каталогу генів [5]. Справді, з геном *Hd* пов’язують розвиток остеоподібних відростків [6], показано, що у диплоїдних та тетраплоїдних пшениць остистість може домінувати над безостістю [16], ген – промотор остистості локалізований на хромосомі 6B пшениці твердої [17] та хромосомах 6U та 6S^{sh} *Aegilops umbellulata* L. *Ae. sharonensis* Eig., відповідно [3, 4].

Відомо, що молекулярні механізми регуляції процесів онтогенезу гомологічних органів, зокрема листків, у споріднених груп рослин є консервативними [18, 19]. Оскільки ості є гомеотичною трансформацією листків [10], цілком природно припустити, що і розвиток остей у пшеницевих та у рису регулюється подібними мережами, тобто пшеницеві мають гени, ортологічні генам, які регулюють розвиток остей у рису. Тому інформацію про ідентифіковані для рису гени, що беруть участь в розвитку остей, можна використати для пошуку *in silico* у сиквенсах геномів пшениці м'якої послідовностей, гомеологічних послідовностям генів рису, ідентифікованих як такі, що беруть участь у розвитку остей. У статті наведено результати дослідження, метою якого був пошук у геномі пшениці *in silico* генів пшеници м'якої *TaDL*, *TaTOB1* та *TaETT2*, ортологіч-

них відповідним регуляторам розвитку остеїв у рису. Для гена *TaTOB1* отриману інформацію було верифіковано через порівняльне вивчення спектрів ампліфікації ДНК генотипів пшеницевих, різних за геномним складом, отриманих з праймерами, розробленими за нуклеотидними послідовностями, знайденими у геному сиквенсі пшениці м'якої.

Матеріали та методи. Біоінформатичний пошук ортологічних послідовностей у геномі пшениці м'якої здійснювали через використання інструменту BLAST у базах даних GenBank та Plant Transcription Factor Database [20, 21]. Пошук здійснювали із використанням послідовностей генів рису *DL* (AB106553), *TOB1* (AK070205) та *OsETT2* (AB071291). Відповідні кодуючі послідовності для двох ортологів *TaDL* (AB470269) та *TaETT2* (AY376129) було знайдено у GenBank, а *TaTOB1* (Traes_2BL_8BEA9CE1B) – у Plant Transcription Factor Database.

Для встановлення хромосомної локалізації генів кодуючі послідовності знайдених пшеничних генів піддавали пошуку у сиквенсі геному пшениці м'якої на ресурсі проекту «Секвенування геному *Aegilops tauschii*» [22]. Аналіз екзонно-інtronної структури послідовностей генів здійснювали через зіставлення нуклеотидних позицій сиквенсу геному, до яких вірівнювалися відомі кодуючі послідовності. Довжину екзонів визначали через розміри вірівняних фрагментів кДНК, а довжину інtronів – як різницю між позицією нуклеотиду, що є стартом наступного екзона, і позицією нуклеотиду, який є кінцем попереднього екзона у сиквенсі геному.

Спираючись на знайдену у сиквенсі структуру гена, праймери до гена *TaTOB1* створювали з використанням сервісу Primer-BLAST [23] таким чином, аби кожен праймер із пари був розташований в різних екзонах і ампліфіковані ділянки включали один або декілька інtronів. Чотири створених пари праймерів було названо за назвою гена та порядковими номерами ТаTOB1-1, ТаTOB1-2, ТаTOB1-3 і ТаTOB1-4. Послідовності праймерів надаються за запитом.

Для ідентифікації наявності гена *TaTOB1* у геномі пшеницевих методом ПЛР для виділення ДНК було використано такий рослинний

матеріал: генотипи пшениці м'якої ($2n = 6x = 42$, A^uA^uBBDD) сортів 'Tipa', 'Ніконія', 'Одеська 267', 'Ювілейна' (остисті), 'Аврора', 'Либідь' (безості); генотипи пшениці твердої ($2n = 4x = 28$, A^uA^uBB) сортів 'Черномор', 'Леукорум' (остисті), 'Кандіканс', 'Рубрум' (остеподібні відростки); види *Aegilops* ($2n = 2x = 14$) – *Ae. mutica* (ТТ, безостий), *Ae. sharonensis* (S^{Sh}S^{Sh} з остеподібними відростками), *Ae. comosa* (ММ, остистий), *Ae. umbellulata* (UU, остистий), а також гексаплойдний синтетичний вид *T. migushovae* ($2n = 6x = 42$, A^bA^bGGDD, остиста) [24]. Геному ДНК виділяли із пасток рослин методом із використанням ЦТАБ [25]. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за методом touchdown із використанням температур гібридизації праймерів від 60 °C зі спаданням на 0,5 °C кожен цикл до 55 °C протягом 10 циклів [26]. Склад реакційної суміші: ДНК 50 нг, дНТФ (Thermo Scientific, USA) 0,2 mM кожного, MgCl₂ 1,5 mM, праймери 250 нМ кожного, Таq ДНК полімераза (Solis Biodyne, Estonia) 1 U. Продукти ампліфікації розділяли у 1,5%-ному агарозному гелі на SB буфері та у 6%-ному денатуруючому ПААГ із 6M сечовини [25].

Результати та обговорення. Біоінформатична ідентифікація пшеницевих генів, ортологічних регуляторам розвитку остей *TOB1*, *DL* та *OsETT2* у рису. Для трьох відомих генів-регуляторів розвитку остей рису *TOB1*, *DL* та *OsETT2* у сиквенсі геному пшениці м'якої було знайдено ортологи *TaTOB1*, *TaDL* та *TaETT2*, для кожного з яких на трьох субгеномах було локалізовано гомеоалелі.

Ген *TaTOB1* було знайдено на 2 хромосомі у всіх трьох субгеномах пшениці м'якої. В структурі гену наявні 6 екзонів і 5 інtronів, деякі є поліморфними за довжиною у гомеоалелів (таблиця). Поліморфізм довжин було знайдено для екзонів 1, 2 та 5, і всіх інtronів. Різниця у довжині екзонів не перевищувала 5 п.о., а для інtronів відмінності були більш масштабними – перший та третій інtronи гена *TaTOB1-B* є більшими на 20 п.о., ніж у двох гомеологів, а останній, п'ятий, інtron *TaTOB1-D* є коротшим на 25 п.о., ніж у гомеологів.

Ген *TaDL* пшениці м'якої був локалізований у трьох субгеномах на 4 хромосомі і має в своїй структурі 6 екзонів та 5 інtronів (таблиця).

Послідовність гена, розташованого в субгеномі B, є інвертованою відносно генів, розташованих в інших субгеномах. Однонуклеотидні поліморфізми довжин між гомеоалелями було знайдено у екзоні 6, а також у інtronах 1 та 4. Інtron 2 у гені *TaDL-B* є більшим на 38 п.о., ніж у інших гомеоалелів.

Між гомеоалелями гена *TaETT2*, локалізованого на 3 хромосомі, виявили відмінності в кількості інtronів та екзонів (таблиця). Зокрема, гомеоалель *TaETT2-A* мав два екзони та два інtronи на початку послідовності, яких не було знайдено у гомеоалелів субгеномів B та D. Відповідно, *TaETT2-A* складався із 11 екзонів та 10 інtronів, а два інші гомеоалелі – із 9 екзонів та 8 інtronів. Такий поліморфізм може бути пов'язаний із тим, що функціональним є лише гомеоалель *TaETT2-A*, а інші два є псевдогенами із делетованими частинами. На користь цього припущення свідчить також інвертованість послідовностей *TaETT2-B* і *TaETT2-D* щодо напрямку *TaETT2-A* і наявність у восьмому інtronі *TaETT2-D* вставки розміром 3,3 тисяч п.о. (таблиця). Відомо, що вставки такого розміру зазвичай зумовлені інсерціями ретроелементів, і часто призводять до зміни функціональної активності гена [27].

Ідентифікація наявності гена *TaTOB1* у геномі пшеницевих методом ПЛР. Для ампліфікації фрагментів гена *TaTOB1* із геномної ДНК пшеницевих було створено чотири пари праймерів. У кожноЯ із пар лівий і правий праймери були локалізовані в сусідніх екзонах, таким чином в ПЛР ампліфікувався весь інtron і частина кодуючої послідовності (рис. 1). Для пари праймерів ТаTOB1-1 лівий та правий праймери знаходилися в екзонах 1 та 2, між ними інtron 1. Для другої пари лівий і правий праймери знаходилися в екзонах 2 і 4 і були розмежовані двома інtronами і третім екзоном. Для пари праймерів ТаTOB1-3 лівий та правий праймери знаходилися в екзонах 4 та 5, між ними інtron 4. Для пари праймерів ТаTOB1-4 лівий та правий праймери знаходилися в екзонах 5 та 6, між ними інtron 5.

Очікувані на підставі аналізу геномного сиквенсу пшениці м'якої довжини ампліконів складали із першою парою 467 п.о., 496 п.о. та 467 п.о., із другою – 1221 п.о., 1237 п.о. та 1224 п.о., із третьою – 226 п.о., 234 п.о. та 247 п.о., із чет-

Структура генів *TaTOB1*, *TaDL* та *TaETT2*

Елемент структури	№ елемента	Гомеоалелі		
		2A	2B	2D
<i>TaTOB1</i>				
Екзон, п.о.	1	-139	-139	-142
	2	-181	-186	-181
	3	-190	-190	-190
	4	-75	-75	-75
	5	-81	-81	-88
	6	-103	-102	-102
Інtron, п.о.	1	-92	-112	-89
	2	-95	-90	-100
	3	-704	-720	-702
	4	-113	-119	-119
	5	-127	-125	-89
		4A	4B	4D
<i>TaDL</i>				
Екзон, п.о.	1	79	-79	79
	2	148	-148	148
	3	95	-95	95
	4	77	-77	77
	5	86	-86	86
	6	73	-72	73
Інtron, п.о.	1	582	-581	582
	2	721	-759	721
	3	1801	-1801	1801
	4	120	-119	120
	5	97	-97	97
		3A	3B	3D
<i>TaETT2</i>				
Екзон, п.о.	1	84	відсутній	відсутній
	2	60	відсутній	відсутній
	3	194	-194	-194
	4	86	-86	-86
	5	92	-92	-92
	6	171	-171	-173
	7	124	-124	-124
	8	76	-76	-76
	9	162	-162	-162
	10	870	-858	-873
	11	409	-395	-409
Інtron, п.о.	1	330	відсутній	відсутній
	2	104	відсутній	відсутній
	3	85	85	86
	4	313	339	313
	5	76	76	75
	6	860	860	857
	7	66	65	67
	8	1503	1455	4789
	9	79	80	79
	10	68	68	68

■ Ідентифікація генів, ортологічних регуляторам розвитку осілей *Oryza sativa* ■

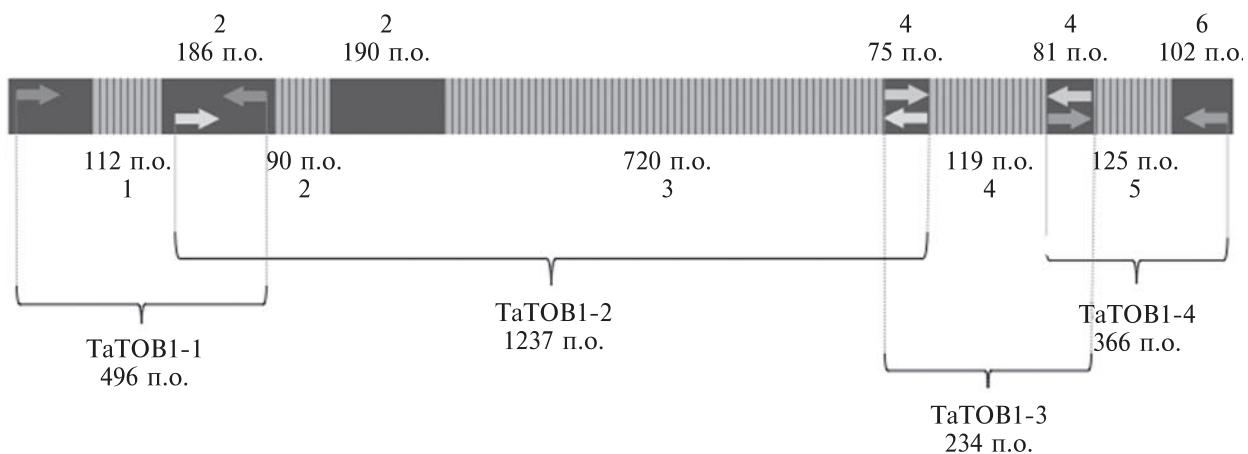


Рис. 1. Структура гомеоалеля *TaTOB1-B* та локалізація праймерів, що використовувалися у роботі. Темним кольором позначені екзоны (номер елемента і довжина над фігурою), світлим – інtronи (номер елемента і довжина під фігурою)

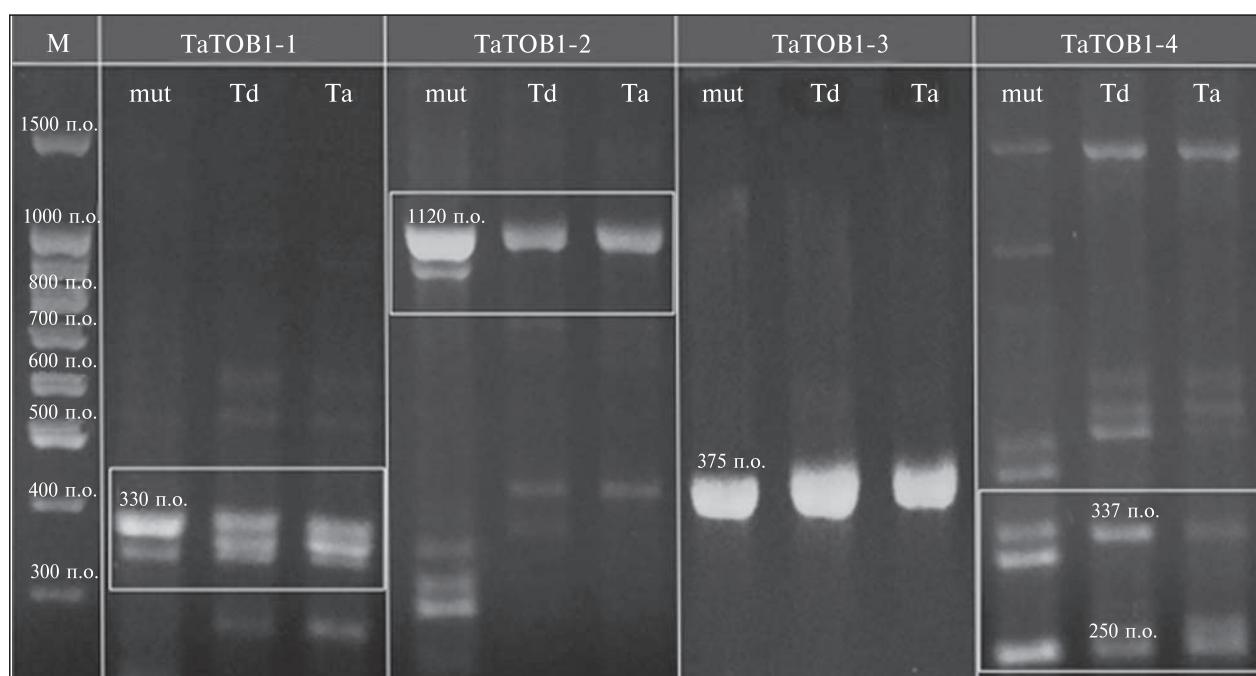


Рис. 2. Результати розділення продуктів ампліфікації *TaTOB1* із чотирма парами праймерів в агарозному гелі. Та – *T. aestivum* сорт ‘Аврора’, Td – *T. durum* сорт ‘Черномор’, mut – *Ae. mutica*, M – маркер мас M-27 SibEnzyme 100 п.о. + 1.5 тисяч п.о. + 3 тисяч п.о. DNA Ladder

вертою – 369 п.о., 366 п.о. та 337 п.о. для гомеоалелів на субгеномах А (*TaTOB1-A*), В (*TaTOB1-B*) та D (*TaTOB1-D*), відповідно. Розділення продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних нами генотипів у агарозному гелі дало наступну інформацію. При розділенні амплі-

конів в агарозному гелі їхня кількість і розмір для *T. aestivum* і *T. durum* не відрізнялися (рис. 2). При розділенні продуктів ампліфікації геномної ДНК цих видів із першою парою праймерів TaTOB1-1, було отримано три компоненти із розрахованими масами 335 п.о.,

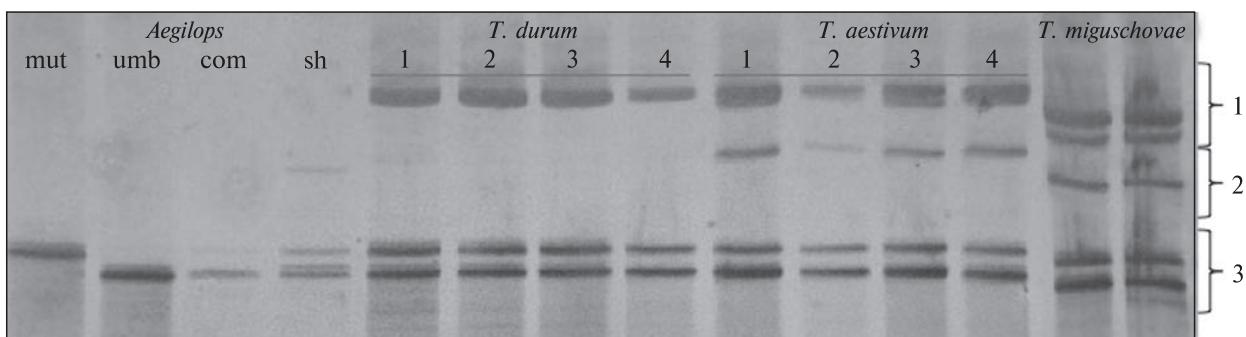


Рис. 3. Результати розділення продуктів ампліфікації із TaTOB1-1 в ПААГ. Субгеномна належність ампліконів: 1 – A^u, A^b; 2 – B, G, T, U, M, S^{sh}; 3 – D. Сорти *T. aestivum*: 1 – ‘Аврора’, 2 – ‘Либідь’, 3 – ‘Тіпа’, 4 – ‘Ювілейна’. Генотипи *T. durum*: 1 – ‘Рубрум’, 2 – ‘Кандіканс’, 3 – ‘Леукурум’, 4 – ‘Черномор’. Види *Aegilops*: mut – *mutica*, umb – *umbellulata*, com – *comosa*, sh – *sharonensis*

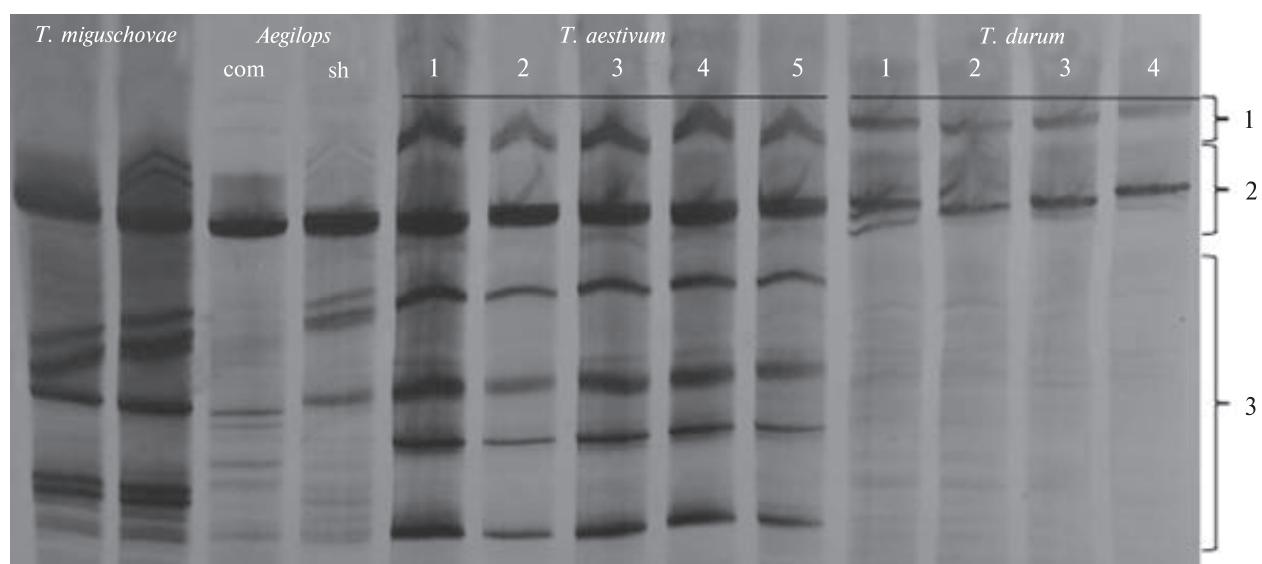


Рис. 4. Результати розділення продуктів ампліфікації із TaTOB1-3 в ПААГ. Субгеномна належність ампліконів: 1 – A^u; 2 – B, G, M, S^{sh}; 3 – D (для пшениці Мігушової A^b, D). Сорти *T. aestivum*: 1 – ‘Аврора’, 2 – ‘Либідь’, 3 – ‘Тіпа’, 4 – ‘Ювілейна’, 5 – ‘Ніконія’. Генотипи *T. durum*: 1 – ‘Рубрум’, 2 – ‘Кандіканс’, 3 – ‘Леукурум’, 4 – ‘Черномор’. Види *Aegilops*: com – *comosa*, sh – *sharonensis*

314 п.о. та 307 п.о. Електрофоретичні спектри пшениць м'якої і твердої, отримані при розділенні продуктів з другою парою праймерів TaTOB1-2, налічували по одному компоненту із розрахованою масою 1120 п.о., з третьою TaTOB1-3 – по одному компоненту із розрахованою масою 375 п.о. Розділення продуктів ампліфікації із четвертою парою праймерів до гена *TaTOB1* дало по два компоненти у спектрах пшениць розміром 337 та 251 п.о. У диплоїдного виду *Ae. mutica* спектри, отримані

після розділення продуктів ампліфікації із першою та четвертою парами праймерів до гена *TaTOB1* відрізнялися від спектрів твердої і м'якої пшениць (рис. 2). При ампліфікації із першою парою праймерів замість трьох компонентів було отримано два розміром 335 п.о. та 307 п.о. При ампліфікації із четвертою парою спектр егілопса крім двох ампліконів, властивих спектрам пшеничної ДНК, мав ще один компонент, який, можливо, є результатом неспецифичної ампліфікації. Роз-



Рис. 5. Результати розділення продуктів ампліфікації із *TaTOB1-4* в ПААГ. Субгеномна належність ампліконів: 1 – A^u , A^b ; 2 – B, G, M, S^{sh} ; 3 – D. Сорти *T. aestivum*: 1 – ‘Тіпа’, 2 – ‘Ніконія’, 3 – ‘Одеська 267’, 4 – ‘Ювілейна’, 5, 7 – ‘Либідь’, 6 – ‘Аврора’. Генотипи *T. durum*: 1 – ‘Черномор’, 2 – ‘Леукурум’, 3 – ‘Кандіканський’, 4 – ‘Рубрум’. Види *Aegilops*: mut – *mutica*, umb – *umbellulata*, com – *comosa*, sh – *sharonensis*

ділення в агарозному гелі не дає змоги розділити фрагменти, що очікували отримати при ампліфікації гомеоалелів гена *TaTOB1* пшениці м’якої, через досить незначну різницю в їхньому розмірі. Тому для розділення цих фрагментів та їхньої субгеномної ідентифікації продукти ПЛР надалі розділяли у 6%-ному поліакриламідному гелі (ПААГ).

Виявлення субгеномної належності продуктів ампліфікації, розділених у ПААГ. Із метою субгеномної ідентифікації ампліконів розділяли у ПААГ продукти ампліфікації, отримані у ПЛР зі створеними до послідовності *TaTOB1* праймерами із ДНК диплоїдних пшеницевих роду *Aegilops*, генотипів тетраплоїдної пшениці *T. durum* (A^uA^uBB), сортів гексаплоїдної пшениці м’якої (A^uA^uBBDD), та гексаплоїдного синтетичного виду *Triticum miguschovae* (A^bA^bGGDD). Спектри диплоїдних, тетраплоїдних та гексаплоїдних видів порівнювали і робили висновок щодо субгеномного походження компонентів. *Ae. sharonensis* (S^{sh}) належить до тієї самої секції *Sitopsis*, до складу якої входить *Ae. speltoides* (S), гіпотетичний прабатько пшеничних субгеномів B та G [28]. Тому в разі наявності однакового амплікона у спектрах ДНК *Ae. sharonensis*, *T. aestivum*, *T. durum* та *T. miguschovae* його вважали продуктом субгеному B видів *T. aestivum* та *T. durum* і субгеному G виду

T. miguschovae. Компоненти, спільні для спектрів ДНК твердої та м’якої пшениць, відносили до продуктів субгеному A^u, спільні для ДНК пшениць Мігушової та м’якої – до продуктів субгеному D.

При розділенні продуктів ПЛР із парою праймерів *TaTOB1-1* в 6%-ному ПААГ спектри диплоїдних егілопсів мають по одному компоненту, який для ДНК егілопса Шарона є подвійним, спектри сортів пшениці твердої мають три компоненти, спектри сортів пшениці м’якої – чотири, а спектр пшениці Мігушової – п’ять компонентів (рис. 3). Відповідно до описаного вище підходу для визначення гомеологічної належності гена, що дає продукт ампліфікації, найлегший подвійний компонент, наявний у спектрах пшениць твердої, м’якої та Мігушової, що співпадав за масою із подвійним компонентом спектру *Ae. sharonensis*, віднесли до продуктів ампліфікації гомеоалелів субгеномів B та G. В цій частині спектру розташовані також продукти ампліфікації з ДНК трьох інших вивчених видів егілопсу. Більший за розміром компонент, спільний для пшениць м’якої та Мігушової, віднесли до продукту ампліфікації гомеоалеля субгеному D. Найважчий компонент, властивий пшеницям твердій і м’якій, а також пшениці Мігушової, віднесли до продуктів амплі-

фікації гомеоалелів субгеномів A^a і A^b. Отже, продукти ампліфікації гомеоалелів гена *TaTOB1* є поліморфними при використанні праймерів до 5'- частини гена, і цю пару праймерів можна застосовувати при вивченні структури геномів інтрогресивних ліній пшениці стосовно гена *TaTOB1*.

При застосуванні другої пари праймерів (рис. 1) розмір продуктів ампліфікації виявився завеликим, і тому умови розділення у ПААГ підібрати не вдалося. При розділенні продуктів ПЛР із праймерами ТаTOB1-3 в 6%-ному ПААГ виявили по одному компоненту у спектрах егілопсів, по два – у сортів пшениці твердої, по шість – у спектрах сортів пшениці м'якої і п'ять – у спектрі пшениці Мігушової (рис. 4). Спільний для всіх спектрів компонент було ідентифіковано як продукт ампліфікації гомеоалелів субгеномів В і G. Легший компонент, наявний у спектрах пшениці м'якої і твердої, імовірно, утворюється при ампліфікації гомеоалеля з субгеному A^u, спільногого для цих двох видів. Чотири важкі компоненти у спектрах сортів пшениці м'якої та генотипу пшениці Мігушової є результатом ампліфікації гомеоалелів субгеному D, хоча за рухливістю компоненти для двох видів пшениці розрізняються. Щодо гомеоалеля ТаTOB1-A для пшениці Мігушової, яка має субгеном A^b на відміну від субгеному A^u пшениць м'якої та твердої, можливо він не утворює продукту ампліфікації з парою праймерів ТаTOB1-3 через зміни у нуклеотидних послідовностях 4 та (чи) 5-го екзонів гомеоалеля ТаTOB1-A^b у порівнянні з гомеоалелем ТаTOB1-B, на підставі якого розроблялась ця пара праймерів. Тим більш, що за даними геномного сиквенсу пшениці м'якої для екзона 5 зареєстрований поліморфізм за довжиною навіть в межах гомеоалелів у цього виду. Тим не менш, цю пару праймерів також можна застосовувати при вивченні структури інтрогресивних ліній пшениці стосовно гена ТаTOB1.

У спектрах, отриманих при розділенні продуктів ПЛР з ДНК вивчених генотипів із праймерами TaTOB1-4, було виявлено таку кількість компонентів: один у егілопса *Ae. comosa*, два у егілопсів *Ae. mutica*, *Ae. umbellulata*, два або три у *Ae. sharonensis*, чотири – у сортів пшениць м'якої, твердої, і чотири у пшеници

Мігушової (рис. 5). Отримана картина складна для інтерпретації. Умовно спільні (на спектрі ампліконів з ДНК *Ae. sharonensis* рухливість найлегшого компоненту вища, ніж в інших спектрах) для всіх спектрів два компоненти було віднесено до продуктів ампліфікації гомеоалелів субгеномів В і G. Два компоненти, що знаходяться між продуктами ампліфікації *TaTOB1-B* і *TaTOB1-G* у спектрах пшениць м'якої, твердої та у пшениці Мігушової, віднесли до ампліконів гомеоалелів субгеномів A^a, A^b та D. Проте це лише попереднє припущення, яке на даному матеріалі не має доказів. Один з праймерів пари ТаТоВ1-4 розташований у 5-му екзоні, про мінливість якого вже було висунуте припущення при розгляді продуктів ампліфікації з парою паймерів ТаТоВ1-3. Отже маркерний потенціал продуктів ампліфікації з парою праймерів ТаТоВ1-4 для вивчення інтрогресивних ліній щодо алелів гена *TaTOB1* є обмеженим.

Порівняння спектрів ампліфікації ДНК остистих і безостих зразків пшениці м'якої та твердої, отриманих з застосуванням трьох пар праймерів, які ми могли проаналізувати при розділенні компонентів у ПААГ (рис. 3–5), не виявило жодних відмінностей у спектрах зразків, альтернативних за ознакою остистість. На перший погляд це справляє враження відсутності впливу вивченого гена на розвиток остей. Звичайно, можна припустити, що існують зміни у послідовності нуклеотидів, які перетворюють функціональний ген – промотор розвитку остей на нефункціональний алель, локалізований саме в тій частині гена *TaTOB1*, яка ампліфікувалась парою праймерів *TaTOB1-2* і продукти ампліфікації якої ми не могли проаналізувати через розділення у ПААГ. Проте більш правильним нам здається таке пояснення відсутності поліморфних продуктів у спектрах ампліфікації ДНК досліджуваних генотипів, поліморфних за ознакою остистість колосу, з застосуванням внутрішньогенних праймерів до гена *TaTOB1*. По-перше, ключовий поліморфізм міг полягати не у зміні довжини продуктів ампліфікації, а у зміні послідовності, яка не призводить до варіювання довжин ампліконів, як наприклад однонуклеотидні поліморфізми заміщення, через що ми могли його не ідентифікувати. По-

друге, поліморфізм міг торкатися регуляторних ділянок, розташованих вище або нижче від кодуючої частини гена, які не було досліджено. Такий поліморфізм може призводити до зміни експресії гена без зміни його кодуючої частини. Тому, наступним етапом слід вважати дослідження функціонування цього гена у пшеницевих через визначення рівня його експресії у генотипів, що відрізняються за ознакою наявності остей.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин в якості об'єктів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють ніякого конфлікту інтересів не існує.

Фінансування. Дослідження частково фінансувалося за рахунок коштів гранту Міжнародного Благодійного Фонду Відродження Києво-Могилянської Академії: «Молекулярні механізми розвитку морфологічних ознак колоса у пшеницевих».

IDENTIFICATION OF *ORYZA SATIVA* AWN DEVELOPMENT REGULATORY GENES ORTHOLOGS IN TRITICINAЕ ACCESSIONS

*A. Navalikhina, M. Antonyuk,
T. Pasichnyk, T. Ternovska*

Національний університет «Києво-Могилянська академія», вул. Сковороди, 2, Київ

E-mail: a.navalikhina@gmail.com, antonyuk.m@ukma.edu.ua, t.pasichnyk@ukma.edu.ua, ternovska@ukma.edu.ua

Information on the genetic control of the awn development in the bread wheat is currently limited to the identification of three genes – *Hd*, *B1*, and *B2* awnedness suppressors, and no promoters have yet been identified. Another Gramineae species, *Oryza sativa*, has more than ten genes involved in the awn morphogenesis. This article presents the results of the wheat genome sequence analysis for the search of genes, orthologous to the known awn development regulators in rice – *TOB1*, *ETT2* and *DL*. With bioinformatic methods, three genes *TaTOB1*, *TaETT2*, and *TaDL* are identified in bread wheat genome, their location is defined on the chromosomes of 2nd, 3rd and 4th homoeologous groups respectively. The polymorphisms between homoeoalleles of the genes located on A, B, and D subgenomes are described. Identified polymorphisms include variation in the length of the exons and intrones in all three genes, variation in the number of exons and intrones for the *TaETT2* gene homoeoalleles, inversion of *TaDL-B* homoeoallele relative to the *TaDL-A* and *TaDL-D*, and inversion of *TaETT2-B* and *TaETT2-D*

relative to the *TaETT2-A*. With the PCR method using primers designed to the sequence of the *TaTOB1*, the homoeoalleles of this gene were identified in the genomes A^u, A^b, B, G, D, S^{sh}, M, U, T of diploid, tetraploid, and hexaploid wheat species. The marker potential of two pairs of primers for the *TaTOB1* gene is shown to study the genome structure of the introgressive wheat lines in relation to this gene.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Dorofeev, V.F., Filatenko, A.A., Migushova, E.P., Udachin, R.A., and Iakubtsiner, M.M., Cultural Flora of USSR. Edited by D.D. Brezhnev. Leningrad: Kolos, 1979, pp. 100–127, 239–269.
2. Goud, J.V., Sadananda, A.R., Two new awn promoter genes in bread wheat, *Genetics*, 1978, vol. 43, pp. 12–16.
3. Antonyuk, M.Z., Prokopyk, D.O., Martynenko, V.S., and Ternovska, T.K., Identification of the genes promoting awnedness in the *Triticum aestivum/Aegilops umbellulata* inprogressive line, *Cytol. Genet.*, 2012, vol. 46, no. 3, pp. 136–43. doi: 10.3103/s009545-2712030024.
4. Ternovska, T.K., Antonyuk, M.Z., and Martynenko, V.S., Genes promoters of awnedness in Triticinae genomes, *Factory Eksper. Evol. Organ. Zb. Nauk. Prats*, Kyiv, Logos, 2013, vol. 12, pp. 164–8.
5. McIntosh, R.A., Yamazaki, Y., Dubcovsky, J., Rogers, J., Morris, C., Appels, R., and Xia, X.C., Catalogue of gene symbols for wheat. 2013.
6. Sourdille, P., Cadalen, T., Gay, G., Gil, B.S., and Bernard, M., Molecular and physical mapping of genes affecting awning in wheat, *Plant Breed.*, 2002, vol. 121, pp. 320–24. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2002.728336.x>
7. Yoshioka, M., Iehisa, J.C.M., Ohno, R., Kimura, T., Enoki, H., Nishimura, S., Nasuda, Sh., and Takumi, Sh., Three dominant awnless genes in common wheat: Fine mapping, interaction and contribution to diversity in awn shape and length. *PLoS One*, 2017, vol. 12, pp. 1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0176148.
8. Prokopyk, D.O., Ternovska, T.K., Homeotic genes and their role in development of morphological traits in wheat, *Cytol. Genet.*, 2011, vol. 45, no. 1, pp. 41–54. doi: 10.3103/s0095452711010099.
9. Toriba, T., Hirano, H.Y., The *DROOPING LEAF* and *OsETTIN2* genes promote awn development in rice, *Plant J.*, 2014, vol. 77, pp. 616–26. doi: 10.1111/tpj.12411.
10. Luo, J., Liu, H., Zhou, T., Gu, B., Huang, X., Shangguan, Y., Zhu, J., Li, Y., Zhao, Y., Wang, Y., Zhao, Q., Wang, A., Wang, Z., Sang, T., Wang, Z., and Han, B., *An-1* encodes a basic helix-loop-helix protein that regulates awn development, grain size,

- and grain number in rice, *Plant Cell*, 2013, vol. 25, pp. 3360–76. doi: 10.1105/tpc.113.113589.
11. Tanaka, W., Toriba, T., Ohmori, Y., Yoshida, A., Kawai, A., Mayama-Tsuchida, T., Ichikawa, H., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., and Hirano, H.-Y., 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, pp. 80–95. doi: 10.1105/tpc.111.094797.
12. Satoh, N., Itoh, J.I., and Nagato, Y., The *SHOOTLESS2* and *SHOOTLESS1* genes are involved in both initiation and maintenance of the shoot apical meristem through regulating the number of indeterminate cells, *Genetics*, 2003, vol. 164, no. 1, pp. 335–46. PMCID: PMC1462562.
13. Itoh, J.I., Kitano, H., Matsuoka, M., and Nagato, Y., Shoot organization genes regulate shoot apical meristem organization and the pattern of leaf primordium initiation in rice, *Plant Cell*, 2000, vol. 12, pp. 2161–74. doi: https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2161.
14. Abe, M., Yoshikawa, T., Nosaka, M., Sakakibara, H., Sato, Y., Nagato, Y., and Itoh, J., *WAVY LEAF1*, an ortholog of Arabidopsis *HEN1*, regulates shoot development by maintaining microRNA and trans-acting small interfering RNA accumulation in rice, *Plant Physiol*, 2010, vol. 154, pp. 1335–46. doi: 10.1104/pp.110.160234.
15. Song, X., Wang, D., Ma, L., Chen, Z., Li, P., Cui, X., Liu, C., Cao, S., Chu, C., Tao, Y., and Cao, X., Rice RNA-dependent RNA polymerase 6 acts in small RNA biogenesis and spikelet development, *Plant J.*, 2012, vol. 71, pp. 378–89. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.05001.x.
16. Goncharov, N.P., Comparative-genetic analysis – a base for wheat taxonomy revision, *Czech. J. Genet. Plant Breed.*, 2005, vol. 41(special issue), pp. 52–55.
17. Prokopyk, D.O., Ternovska, T.K., SSR-marking of genes taking part in control of awnedness in durum wheat (*Triticum durum* Desf.), *Visnyk Ukr. Tovar. Genet. Selec.*, 2010, vol. 8, no. 1, pp. 31–40.
18. Du, F., Guan, C., and Jiao, Y., Molecular Mechanisms of Leaf Morphogenesis, *Mol. Plant*, 2018, vol. 11, pp. 1117–34. doi: 10.1016/j.mol.2018.06.006.
19. Prunet, N., Meyerowitz, E.M., Genetics and plant development, *Comptes Rendus Biologies*, 2016, vol. 339, pp. 240–6. doi.org/10.1016/j.crvi.2016.05.003.
20. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., and Lipman D.J. Basic local alignment search tool, *J Mol Biol*, 1990, vol. 215, pp. 403–410. doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
21. Jin, J., Tian, F., Yang, D.-C., Meng, Y.Q., Kong, L., Luo, J., and Gao, G., PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants, *Nucleic Acids Res.*, 2017, vol. 45, D1040–D1045. doi: 10.1093/nar/gkw982.
22. Dvorak J., Luo M.-C., Gu Y.Q., et al Sequencing the *Aegilops tauschii* Genome. <http://aegilops.wheat.ucdavis.edu>
23. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T.L., Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC Bioinformatics*, 2012, vol. 13, no. 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
24. Zhirov, E.G., Synthesis of a new hexaploid wheat, *Tr. po Prikl. Bot. Genet. i Sel.* 1980, vol. 68, pp. 14–6.
25. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor laboratory press, New York, 1989.
26. Korbie, D.J., Mattick, J.S., Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification, *Nat. Protoc.*, 2008, vol. 3, pp. 1452–56. doi: 10.1038/nprot.2008.133.
27. Kidwell, M.G., Lisch, D., Transposable elements as sources of variation in animals and plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, pp. 7704–11. pubmed/9223252.
28. Petersen, G., Seberg, O., Yde, M., and Berthelsen, K., Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*), *Mol Phylogenet Evol*, 2006, vol. 39, pp. 70–82. doi:10.1016/j.ympev.2006.01.023.

Надійшла в редакцію 08.01.19
Після доопрацювання 22.02.19
Прийнята до друку 18.07.19