

КОЗУБ Н.О.<sup>1,2</sup>, СОЗИНОВ І.О.<sup>1</sup>, БІДНИК Г.Я.<sup>1,2</sup>, ДЕМ'ЯНОВА Н.О.<sup>1,2</sup>, КСИНІАС І.<sup>3</sup>,  
БЛЮМ Я.Б.<sup>2</sup>, СОЗИНОВ О.О.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Інститут захисту рослин НААН,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 33, e-mail: sia1@i.com.ua

<sup>2</sup> ДУ "Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України",

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

<sup>3</sup> Department of Agricultural Technology, School of Agricultural Technology and Food Technology and Nutrition, Technological and Educational Institution of Western Macedonia, 53100, Florina, Hellas

## ПОЛІМОРФІЗМ ВИСОКОМОЛЕКУЛЯРНИХ СУБОДИНИЦЬ ГЛЮТЕНІНІВ *AEGILOPS BIUNCIALIS* VIS.

Тетраплоїдний вид *Aegilops biuncialis* Vis. є одним з широкопоширених видів егілопсів. Його ареал включає Південно-східну Європу та прилеглий азіатський регіон (Егейські острови, Болгарію, Туреччину, Кіпр), західну дугу Родючого Півмісяця, східну частину Прикавказзя та Закавказзя, південну частину Криму. Цей вид також зустрічається в інших середземноморських країнах Європи і Північної Африки, є адвентивним у Північно-Західній Європі [1–3]. Геномна формула *Ae. biuncialis* – UUM<sup>b</sup>M<sup>b</sup> (2n = 28), геном U походить від виду *Ae. umbellulata*, модифікований геном M<sup>b</sup> – споріднений з геномом M *Ae. comosa* [3]. Можливе місце виникнення *Ae. biuncialis* — Західна Туреччина та Греція, де контактують обидва предкові диплоїдні види [3]. При дослідженні геному U було показано поліфілетичне походження *Ae. biuncialis* [4].

Дикі види можуть бути джерелом нових генів для розширення генофонду культурних пшениць, зокрема, нових алелів високомолекулярних (ВМ) субодиноць глютенінів [5, 6]. ВМ субодиноць глютенінів складають біля 12% загальної білка зернівки (1–1,7 % сухої маси борошна) проте мінливість за їх вмістом та алельним складом визначає 45–70 % мінливості за хлібопекарними властивостями сортів пшениці м'якої [7]. Локуси ВМ субодиноць глютенінів *Glu-1* знаходяться на довгих плечах хромосом 1 гомеологічної групи. Вони містять два тісно зчеплені гени, що кодують субодиноць х-типу та у-типу, з яких остання має більшу рухливість при електрофорезі в присутності додецилсульфату натрію (SDS) [8]. Ці гени називають *Glu-1-1* і *Glu-1-2*. Локуси *Glu-1* характеризуються множинним поліморфізмом у пшениці та її родичів [8]. Предкові диплоїдні види *Ae. biuncialis* – *Ae. umbellulata* і *Ae. comosa* достатньо поліморфні за цими локусами: Rodriguez-Quijano et al. ідентифікували 8 алелів за локусом *Glu-U1 Ae. umbellulata*, 11 – за локу-

сом *Glu-M1 Ae. comosa* [9]. У наших попередніх дослідженнях [10] при аналізі зразків, зібраних в Криму, також виявлено високий рівень поліморфізму за локусами ВМ субодиноць глютенінів *Ae. biuncialis*: ідентифіковано 8 алелів за *Glu-U1*, 10 за *Glu-M<sup>b</sup>1*.

Завданням нашого дослідження було доповнення каталогу ВМ субодиноць глютенінів *Ae. biuncialis*, що кодуються алелями локусів *Glu-U1* та *Glu-M<sup>b</sup>1*, та аналіз їх різноманітності на прикладі зразків Криму.

### Матеріали і методи

Матеріалом дослідження слугували вибірки з кримських популяцій *Ae. biuncialis* з різних регіонів Криму: східної частини прибережжя Криму (Кара-Даг, Ечки-Даг), власне південної частини (Мис Март'ян), західної частини (Берегове, Піщане Бахчисарайський р-н) та південно-західної (Севастополь, заповідник Херсонес Таврійський), всього 795 зразків. Також аналізували одиничні зразки з популяцій Аю-Дагу, один зразок невідомого походження (O2) та грецький зразок GRC-021/94 (Karrathos). З окремого колоса *Ae. biuncialis* для аналізу брали одну зернівку. Електрофорез високомолекулярних субодиноць глютенінів проводили за методикою Laemmli в 10 % розділяючому гелі [11]. Для кожної зернівки *Ae. biuncialis* визначали генотип за локусами ВМ субодиноць глютенінів *Glu-U1*, *Glu-M<sup>b</sup>1*. Для позначення алелів цих локусів використовували складений нами каталог [10]. Для порівняння та ідентифікації ВМ субодиноць глютенінів на електрофоретичні гелі наносили білки зразків *Ae. biuncialis* з відомими генотипами за локусами *Glu-U1* та *Glu-M<sup>b</sup>1* (зразки-стандарт ВМ субодиноць глютенінів) [12]. Для оцінки популяційно-генетичних параметрів використовували програму POPGENE v. 1.31 [13].

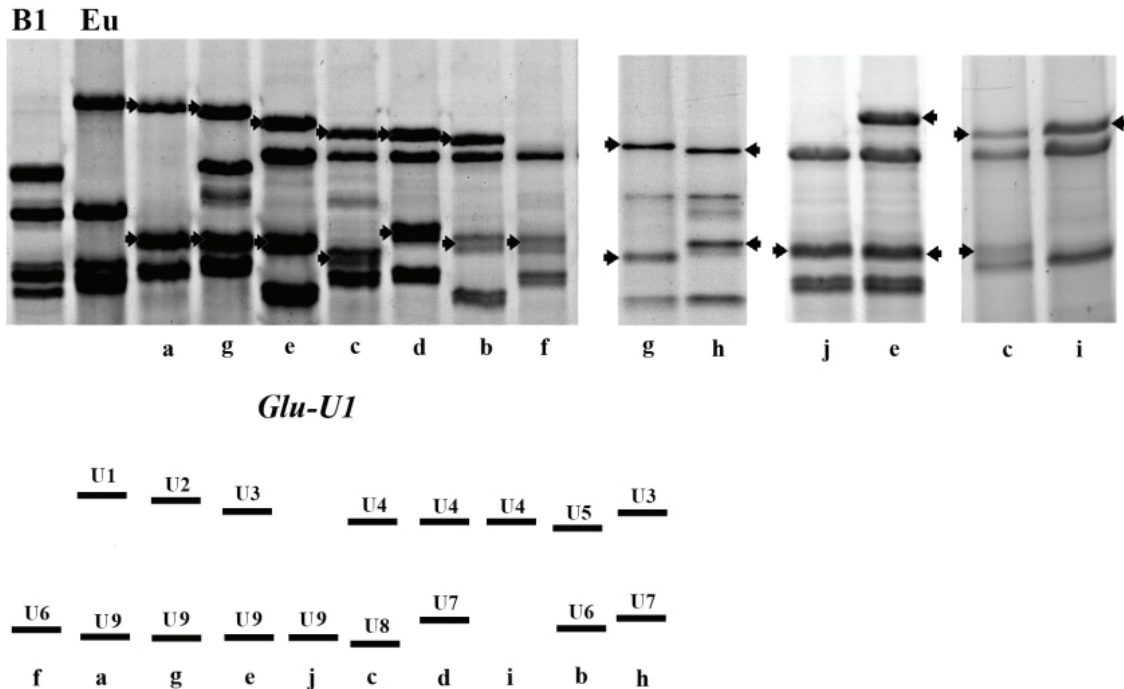
### Результати та обговорення

Електрофоретичний аналіз ВМ субодиниць глютенінів зразків *Ae. biuncialis* з популяцій Криму дозволив виявити два нові алелі за локусом *Glu-U1* (*i, j*) та дев'ять нових алелів за локусом *Glu-M<sup>b</sup>1* (*j-r*) (рис. 1, 2) додатково до раніше опублікованого каталогу [10]. Отже, загалом, серед проаналізованих зразків *Ae. biuncialis*, включаючи один раніше проаналізований грецький зразок GRC-021/94, нами ідентифіковано 10 алелів за локусом *Glu-U1* (*a-j*) та 18 алелів за локусом *Glu-M<sup>b</sup>1* (*a-r*). Більшість алелів контролюють синтез двох субодиниць (*x* і *y*). Алелі *Glu-U1i* та *Glu-M<sup>b</sup>1i* експресують лише *x*-субодиницю, алелі *Glu-U1f, Glu-U1j, Glu-M<sup>b</sup>1e, Glu-M<sup>b</sup>1f, Glu-M<sup>b</sup>1n* – лише *y*-субодиницю.

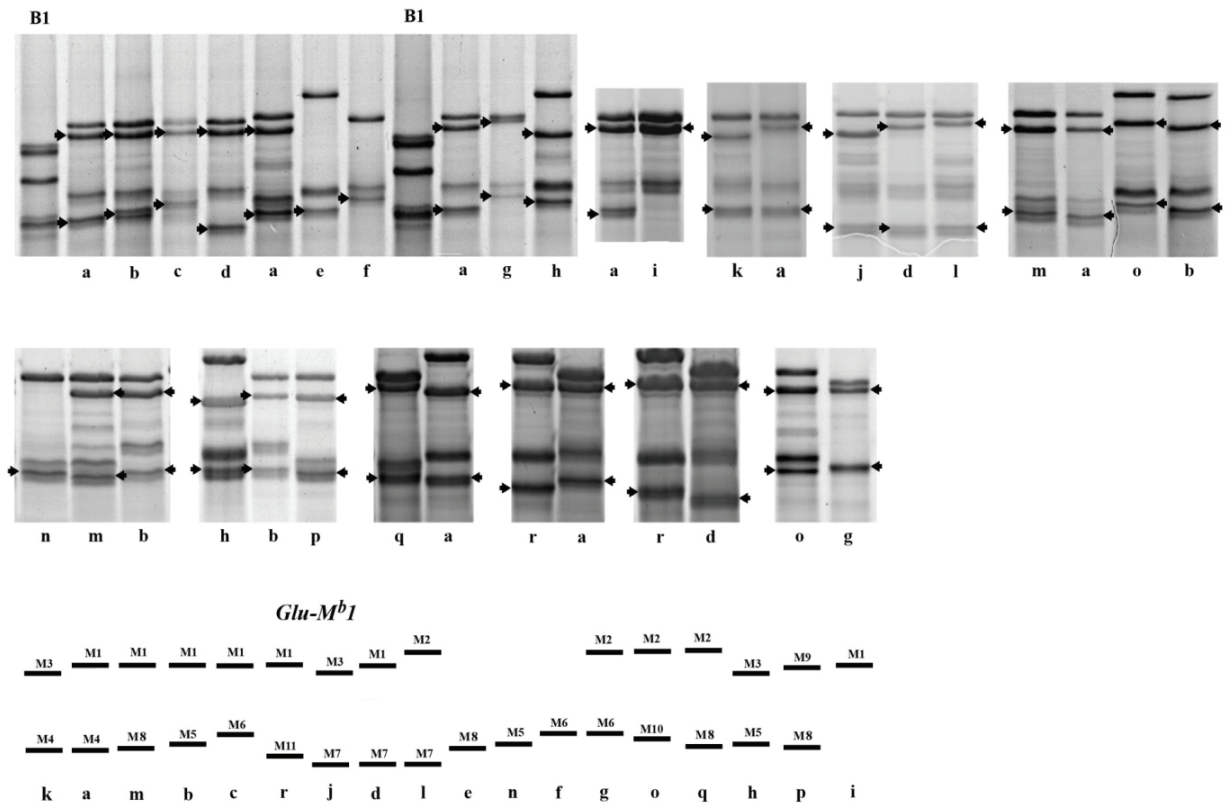
За локусом *Glu-U1*, алель *h* ідентифіковано лише у грецького зразка, алель *g* був спільним для грецького зразка та кримських зразків, решту алелів ідентифіковано у кримських зразків. Алелі *a, e, g, j* кодують *y*-субодиницю з однаковою рухомістю (*U9*), трохи більшою, ніж рухомість *y*-субодиниці, кодованої алелями *b, f* (*U6*) (рис.1). Алель *h* контролює *y*-компонент, аналогічний *y*-компанента, кодованому алелем *d* (*U7*), а рухомість кодованої ним *x*-субодиниці відповідає *x*-субодиниці, кодованій алелем *e* (*U3*). Та-

ким чином, поєднання субодиниць *U3+U7* не виявлено у зразків Криму, але подібні субодиниці зустрічаються в інших комбінаціях у кримських зразків (*U3+U9, U4+U7*). *X*-субодиниця *U4* є спільною для генотипів з алелями *c, d, i* за локусом *Glu-U1*. Отже, для локусу *Glu-U1* за рухомістю на SDS-електрофореграмах ідентифіковано 5 різних *x*-субодиниць (*U1–U5*), а також відсутність *x*-субодиниці, та 4 різні *y*-субодиниці (*U6–U9*) і відсутність експресії *y*-субодиниці. Ці субодиниці зустрічались у 10 поєднаннях (з 30 можливих). Поєднань двох унікальних субодиниць не виявлено.

За локусом *Glu-M<sup>b</sup>1* у грецького зразка виявлено алель *j*, який також зустрічається серед зразків Криму (рідкісний алель). Алель *h* (кодує субодиниці *M3+M5*), який раніше було ідентифіковано у зразка невідомого походження *O2*, не зустрічався у кримських зразків. Однак подібні субодиниці в інших поєднаннях також виявлено у кримських зразків: *y*-субодиницю *M3* кодують два рідкісні алелі (*k, j*), а *y*-субодиниця *M5* присутня у генотипів з відносно поширеними алелями *b, n* (рис. 2). Серед *x*-субодиниць, кодованих локусом *Glu-M<sup>b</sup>1*, найбільш часто зустрічається субодиниця *M1*. Її кодують 7 алелів: *a–d, i, m*. Субодиниці *M2* (найменша рухомість серед від-



**Рис. 1.** SDS-Електрофореграми ВМ субодиниць глютенінів зразків *Ae. biuncialis* з різними алелями за локусом *Glu-U1* (*a-j*); компоненти, кодовані алелями, відмічені стрілками. В1 і Eu – сорти *T. aestivum* Безоста 1 і Еурагміл, відповідно. Знизу: схема алелів *a-j* за локусом *Glu-U1*. *U1–U9* – позначення субодиниць, однаковими цифрами позначені субодиниці з однаковою рухомістю



**Рис. 2.** SDS-Електрофореграми ВМ субодиноць глютенінів зразків *Ae. biuncialis* з різними алелями за локусом *Glu-M<sup>b</sup>1* (a–r), компоненти, кодовані алелями, відмічені стрілками. В1 – сорт *T. aestivum* Безоста 1. Знизу: схема алелів a–r за локусом *Glu-M<sup>b</sup>1*. М1–М11 – позначення субодиноць, однаковими цифрами позначені субодиноць з однаковою рухомістю

повідних х-субодиноць) і М3 (найбільша рухомість) кодуються 3 і 4 алелями, відповідно. Серед у-субодиноць, контрольованих *Glu-M<sup>b</sup>1*, найменшу рухомість має М6 (алелі c, f, g), а найбільшу – М7 (алелі d, j, l). У-субодиноця М8 кодується 4 алелями (e, m, q, p), у-субодиноць М5, М6, М7 експресуються трьома алелями кожна. Отже, для локусу *Glu-M<sup>b</sup>1*, за рухомістю на SDS-електрофореграмах ідентифіковано 4 різні х-субодиноць (М1–М3, М9), а також відсутність х-субодиноць, та 7 різних у-субодиноць (М4–М8, М11, М12) і відсутність експресії у-субодиноць. Ці субодиноць зустрічались у 18 поєднаннях (з 40 можливих). Як і у випадку локусу *Glu-U1*, не виявлено поєднань двох унікальних субодиноць для продуктів експресії локусу *Glu-M<sup>b</sup>1*.

Серед загальної вибірки зразків з кримських популяцій *Ae. biuncialis* з найбільшою частотою зустрічаються алелі b (54 %), c (21,1 %) за локусом *Glu-U1* та a (48,8 %), m (17,5 %), b (11,9 %) за *Glu-M<sup>b</sup>1* (табл. 1). Ефективне число алелів складає 3,15 і 3,61 для локусів *Glu-U1* і *Glu-M<sup>b</sup>1*, відповідно. Показник генної різноманітності за *He* є високим для цих локусів – 0,683 і 0,723.

Було проаналізовано частоти окремих ВМ субодиноць глютенінів у кримській популяції *Ae. biuncialis*. Переважаючими субодиноцями є х-субодиноць U5 (54 %) та U4 (28 %), у-субодиноць U6 (56 %), U8 (21 %), U9 (16 %), контрольовані локусом *Glu-U1*, х-субодиноць M1 (90 %), у-субодиноць M4 (49 %), M8 (20 %), M5 (14 %) (табл. 2). Слід відмітити надзвичайно високу частоту х-субодиноць M1, яка зустрічається у 7 поєднаннях з різними у-субодиноцями.

Дослідження ВМ субодиноць глютенінів у пшениці і її родичів показало їх висококонсервативну структуру: вони містять N-кінцевий домен (86–89 амінокислотних залишків у субодиноць х-типу і 104 залишки у субодиноць у-типу), С-кінцевий домен (42 залишки) і центральний домен (630–830 залишків). Центральний домен складається з багатих на глютамін, пролін і гліцин повторів нонапептидів та гексапептидів у обох типів субодиноць та додаткових трипептидних мотивів у х-субодиноць. Саме довжина центрального домена (кількість повторів) визначає різницю в молекулярних масах ВМ субодиноць глютенінів [7, 14]. Основними механізмами ди-



Таблиця 1

**Частоти алелів локусів ВМ субодиноць глютенінів у вибірці з кримських популяцій *Ae. biuncialis* (N = 795)**

Локус, алель, субодиноць		Частота	Локус, алель субодиноць		Частота	Локус, алель субодиноць		Частота
Glu-U1			Glu-M1			Glu-M1		
a	U1+U9	0,050	a	M1+M4	0,488	j	M3+M7	0,002
b	U5+U6	0,540	b	M1+M5	0,119	k	M3+M4	0,001
c	U4+U8	0,211	c	M1+M6	0,038	l	M2+M7	0,001
d	U4+U7	0,066	d	M1+M7	0,075	m	M1+M8	0,175
e	U3+U9	0,087	e	M8	0,016	n	M5	0,017
f	U6	0,016	f	M6	0,001	o	M2+M10	0,015
g	U2+U9	0,026	g	M2+M6	0,043	p	M9+M8	0,002
i	U4	0,003	i	M1	0,002	q	M2+M8	0,003
						r	M1+M11	0,001

вергенції генів, що обумовлюють високий рівень поліморфізму ВМ субодиноць глютенінів у пшениці та її родичів, вважаються помилки реплікації через проковзування в районі повторів (slip-strand mispairing), нерівний кросинговер та «незаконна» рекомбінація, які викликають дуплікації та делеції в послідовностях генів, переважно пов'язані зі зміною числа повторюваних одиниць [14, 15]. Отже, делеції і дуплікації генів пояснюють поліморфізм ВМ субодиноць глютенінів в межах х-типу та у-типу *Ae. biuncialis*. Різноманітність алелів локусів *Glu-1*, що містять по два тісно зчеплені гени, визначається також поєднанням двох генів, що кодують х- і у- субодиноць. Існування багатьох поєднань відносно невеликої кількості різних за молекулярною масою субодиноць х- і у- типу *Ae. biuncialis* нагадує «рекомбінантне» походження. Через незначну частоту перехресного запилення (біля 5 %) у даного виду та тісне зчеплення між генами х- і у-субодиноць є малоймовірним, що різні поєднання субодиноць х- і у-типу могли виникнути шляхом внутрішньо-локусної рекомбінації, а, скоріше, експресія певних ВМ субодиноць глютенінів з однаковою молекулярною масою різними алелями є результатом паралельних змін у кількості повторів центрального домена предкового гена. Слід відмітити, що високий поліморфізм ВМ субодиноць глютенінів, кодovаних алелями локусів *Glu-U1* і *Glu-M1*, відмічений і для іншого тетраплоїдного виду з геномною формулою UUMM – *Ae. geniculata*, причому також спостерігається така ж «квазірекомбінантна» система, коли алелі кодують численні комбінації відносно невеликої кількості різних х- і у-субодиноць [16].

Таблиця 2

**Частоти зустрічання окремих ВМ субодиноць глютенінів у вибірці з кримських популяцій *Ae. biuncialis* (N = 795)**

х-субодиноць	Частота	у-субодиноць	Частота
Glu-U1			
U1	0,050	U6	0,556
U2	0,026	U7	0,066
U3	0,087	U8	0,211
U4	0,281	U9	0,163
U5	0,540	null	0,003
null	0,016		
Glu-M <sup>b</sup> 1			
M1	0,897	M4	0,489
M2	0,063	M5	0,136
M3	0,003	M6	0,082
M9	0,002	M7	0,078
null	0,034	M8	0,197
		M10	0,015
		M11	0,001
		null	0,002

**Висновки**

Результати дослідження вибірки з кримських популяцій показують існування високого рівня поліморфізму ВМ субодиноць глютенінів *Ae. biuncialis* як за молекулярною масою х- і у-субодиноць, так і за поєднаннями різних субодиноць х- і у-типу. Ідентифіковано 10 алелів за локусом Glu-U1 і 18 за локусом Glu-M1. Визначено переважаючі алелі та окремі субодиноць за кожним локусом у вибірці з кримських популяцій. Високий рівень поліморфізму дозволяє використовувати ці маркерні локуси для дослідження генетичної структури та моніторингу популяцій, а також для вивчення розповсюдження виду.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Богуславский Р.Л., Голик О.В. Род *Aegilops* L. как генетический ресурс селекции. – Харьков, 2004. – 236 с.
2. Van Slageren M.W. Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. et Spach.) Eig (*Poaceae*) // Wageningen Agricultural University Papers. – Wageningen, The Netherlands, 1994. – N 94-7. – 512 p.
3. Kimber G., Feldman M. Wild wheat. An introduction. Special Report 353 –Columbia : College of Agriculture University of Missouri, 1987 – 146 p.
4. Chee P.W., Talbert L.E., Lavin M. Molecular analysis of evolutionary patterns in U genome wild wheats // Genome. – 1995. – 38 (2). – P. 290–297.
5. Schneider A., Molnar I., Molnar-Lang M. Utilisation of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat // Euphytica. – 2008. – 163. – P. 1–19.
6. Pilch J. Improving grain quality in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by introgressing alien HMW glutenin genes from tetraploid *Triticum* and diploid *Aegilops* species // Plant Breeding and Seed Science. – 2007. – 56. – P. 3–30.
7. Shewry P.R., Halford N.G., Belton P.S., Tatham A.S. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. – 2002. – 357. – P. 133–142.
8. Payne P.I. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality // Ann. Rev. Plant Physiol. – 1987. – 38. – P. 141–153.
9. Rodriguez-Quijano M., Nieto-Taladriz M.T., Carrillo J.M. Polymorphism of high molecular weight glutenin subunits in three species of *Aegilops* // Genet. Resources Crop Evol. – 2001. – 48. – P. 599–607.
10. Козуб Н.А., Созинов І.А., Ксиніас І.Н., Созинов А.А. Разнообразие аллелей локусов высокомолекулярных субъединиц глютеинов *Aegilops biuncialis* Vis. // Генетика. – 2011. – 47, № 9. – С. 1216–1222.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – 227, N 5259. – P. 680–685.
12. Козуб Н.О., Созинов І.О., Бідник Г.Я., Дем'янова Н.О., Созинов О.О. Реєстрація зразків-стандартів алелів локусів високомолекулярних субъединиць глютеинів *Aegilops biuncialis* Vis // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – К.: Логос, 2013. – 13. – С. 65–69.
13. Yeh F.C., Boyle T.J.B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits // Belgian J. of Botany. – 1997. – 129. – P. 157.
14. Zhang Y., Li X., Wang A., An X., Zhang Q., Pei Y., Gao L., Ma W., Appels R., Yan Y. Novel x-type high-molecular-weight glutenin genes from *Aegilops tauschii* and their implications on the wheat origin and evolution mechanism of *Gli-D1-1* proteins // Genetics. – 2008. – 178. – P. 23–33.
15. Jiang Q.-T., Ma J., Wei Y.M., Liu Y.-X., Lan X.-J., Dai S.-F., Lu Z.-X., Zhao S., Zhao Q.-Z., Zheng Y.-L. Novel variants of HMW glutenin subunits from *Aegilops* section *Sitopsis* species in relation to evolution and wheat breeding [Електронний ресурс] // BMC Plant Biology. – 2012. – 12. – 73 (P. 1–13). – Режим доступу: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/12/73>.
16. Medouri A., Bellil I., Khelifi D. Genetic diversity of high and low molecular weight glutenin subunits in Algerian *Aegilops geniculata* // Not. Bot. Horti. Agrobot. – 2014. – 42 (2). – P. 453–459.

KOZUB N.A.<sup>1,2</sup>, SOZINOV I.A.<sup>1</sup>, BIDNYK H.YA.<sup>1,2</sup>, DEMIANOVA N.A.<sup>1,2</sup>, XYNIAS I.<sup>3</sup>, BLUME YA.B.<sup>2</sup>, SOZINOV A.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Plant Protection, NAAS,

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 33, e-mail: [sial@i.com.ua](mailto:sial@i.com.ua)

<sup>2</sup> State Institution “Institute of Food Biotechnology and Genomics, NAS of Ukraine”,

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

<sup>3</sup> Department of Agricultural Technology, School of Agricultural Technology and Food Technology and Nutrition, Technological and Educational Institution of Western Macedonia,

53100, Florina, Hellas

## POLYMORPHISM OF HIGH-MOLECULAR-WEIGHT GLUTENIN SUBUNITS IN *AEGILOPS BIUNCIALIS* VIS.

**Aims.** Polymorphism of high-molecular-weight glutenin subunits (HMW-GS) encoded by the *Glu-U1*, *Glu-M<sup>b</sup>1* loci was analyzed in *Aegilops biuncialis* mainly from Crimean populations. **Methods.** SDS electrophoresis of total seed protein was used to identify alleles at the *Glu-U1* and *Glu-M<sup>b</sup>1* loci. **Results.** Among the samples studied, 10 alleles at *Glu-U1* and 18 at *Glu-M<sup>b</sup>1* were identified. Among them 2 alleles expressed only x-type subunit and 5 expressed only y-type subunit. Nei's gene diversity was 0.683 і 0.723, respectively, for these loci. Predominant alleles and subunits of each type were determined. **Conclusions.** A high level of polymorphism of HMW-GS in *Ae. biuncialis* permits using these loci for investigation of the genetic structure of populations, their monitoring and studying dispersal of the species.

**Keywords:** *Aegilops biuncialis*, diversity, high-molecular-weight glutenin subunits, alleles.