

ГЕНЕТИЧНЕ МАРКУВАННЯ ЗАБАРВЛЕННЯ КОЛОСКОВИХ ЛУСОК У *TRITICUM SPELTA* L. VAR. *CAERULEUM* ЗА ДОПОМОГОЮ ГЛІАДИНІВ

Н.О. КОЗУБ^{1, 2}, І.О. СОЗІНОВ¹, А.К. НІНІЄВА³, О.В. ТВЕРДОХЛІБ³,
Я.Б. БЛЮМ², Р.Л. БОГУСЛАВСЬКИЙ³

¹ Інститут захисту рослин НААН, Київ
E-mail: sia1@i.com.ua

² Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Київ

³ Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН, Харків

*Досліджено генетичний контроль темного забарвлення колоскових лусок у зразків *Triticum spelta* L. var. *caeruleum* з використанням гліадинів як генетичних маркерів. Матеріалом дослідження слугували рослини F_2 і BC_1 від схрещування зразків спельти з білоколосими сортами пшениці м'якої. Розщеплення за кольором колоса відповідало моногенному контролю ознаки. За допомогою електрофоретичного аналізу гліадинів зерен з гібридних рослин виявлено, що у зразків спельти різновиду *caeruleum* алель *Gli-A1j** зчеплений з алелем темного (чорного) кольору лусок за локусом *Rg-A1*.*

Ключові слова: *Triticum spelta*, колір колоскових лусок, гліадини, алелі, генетичні маркери.

Вступ. Морфологічна ознака «забарвлення колосу» є цікавою з різних точок зору. Вона легко визначається візуально, контролюється моногенно або невеликою кількістю генів [1]. Тому ця ознака зручна для генетичних досліджень, широко використовується при таксономічній класифікації пшениці, ідентифікації сортів і форм. Разом з тим забарвлення колоса має адаптивне значення. Вважається, що пігментація органів рослин, зокрема колоскових лусок, забезпечує захист від ультрафіолетового опромінення та інших абіотичних факторів. Так, частка сортів пшениці із забарвленими лусками є значною серед сортів у регіонах з високою інтенсивністю освітлення (наприклад, Альпи, Анди, Іберія, Балкани). Крім того, пігментація лусок часто зустрічається серед сортів з коротким вегетативним періодом (наприклад, сорти Сибіру), де можливою адаптивною рисою є підвищення ефективності абсорбції сонячної енергії для висихання зерна і, отже, скорочення періоду від наливу зерна до зрілості [2].

© Н.О. КОЗУБ, І.О. СОЗІНОВ, А.К. НІНІЄВА,
О.В. ТВЕРДОХЛІБ, Я.Б. БЛЮМ,
Р.Л. БОГУСЛАВСЬКИЙ, 2016

У пшениць та егілопсів гени, що визначають темне (чорне, червоне, сіро-димчасте) забарвлення колоскових лусок, знаходяться у дистальних районах коротких плеч хромосом першої гомеологічної групи [3, 4]. У пшениці м'якої *Triticum aestivum* L. та видів з подібними геномами – це локуси *Rg-A1*, *Rg-B1*, *Rg-D1* на хромосомах 1A, 1B, 1D. Для гена *Rg-A1*, розміщеного на короткому плечі хромосоми 1A, відомо чотири алелі (*a-d*) [4]. Алель *Rg-A1b*, раніше позначений *Rg3* [5], визначає червоне забарвлення лусок. Алелі *Rg-A1c* і *Rg-A1d*, раніше позначені *Bg(a)* і *Bg(b)* [6], контролюють чорне забарвлення лусок. *Rg-A1a* – алель, що визначає відсутність забарвлення. На хромосомі 1B червоний колір лусок контролює алель *Rg-B1b*, раніше позначений *Rg1* [7, 8], алель *Rg-B1a* не надає забарвлення. Червоний колір лусок також визначає алель *b* гена *Rg-D1*, локалізованого на хромосомі 1D. Цей алель, що походить від *Aegilops tauschii* Coss., раніше позначався *Rg2* [3]. Алель *Rg-D1c* (спершу позначений *Brg*) детермінує сіро-димчасте забарвлення колоса [9]. Аналогічно, *Rg-D1a* – алель, що визначає відсутність забарвлення.

Порівняльний аналіз експресії ключових структурних генів біосинтезу флавоноїдних пігментів у колоскових лусках ізогенних ліній, що відрізняються за алельним станом локусів *Rg-A1* і *Rg-D1*, показав, що гени *Rg-1* – це тканиноспецифічні регуляторні гени, що активують транскрипцію структурних генів біосинтезу флавоноїдних пігментів флорафенів та/або 3-дезоксидантоціанідинів у колоскових лусках [10]. Зокрема, алелі *Rg-A1c* і *Rg-D1b* збільшують рівень транскрипції гена хальконфлавонон ізомерази *Chi* в забарвлених лусках.

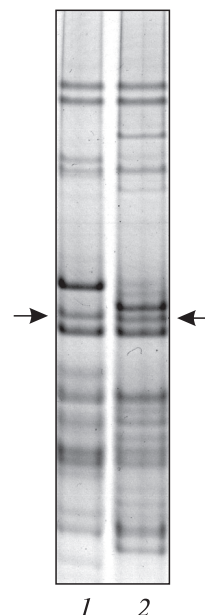
Локуси забарвлення колоскових лусок тісно зчеплені з відповідними гліадинкодуєчими

локусами хромосом першої гомеологічної групи – *Gli-1* [4]. Ці локуси містять гени, що кодують спирторозчинні запасні білки зерна – ω - і γ -гліадини, у свою чергу тісно зчеплені з локусами низькомолекулярних субодиниць глютенінів (*Glu-3*). Ген червоного кольору *Rg3* (алель *Rg-A1b*) зчеплений з локусом *Gli-A1*, частота рекомбінації – 1,1 % [10]; відстань 4 сМ виявлено між геном чорного забарвлення *Bg* (*Rg-A1c*) і локусом *Gli-A1* у *Triticum durum* Desf. [12]. В цій же роботі визначено відстань 0,8 сМ між алелем червоного кольору лусок *Rg-B1b* і *Gli-B1* у пшениці твердої. В роботі Поперелі та ін. [13] встановлено зчеплення ознаки червоного кольору лусок з блоком гліадинів GLD1B8. Пізніше виявлено пов'язаність червоного забарвлення з рядом інших гліадинових алелів [5]. У більшості випадків ці алелі кодують синтез двох характерних ω -гліадинів [14]. В подальшому гени, що кодують ці два компоненти, виділено в окремий локус – *Gli-B5*, який знаходиться між локусами *Gli-B1* і *Rg-B1* [15]. Відстань між геном червоного забарвлення *Rg1* (*Rg-B1b*) та *Gli-B1* становила 2 сМ, між *Gli-B5* і *Rg1* – 0,6 сМ [15], частота рекомбінації між геном червоного забарвлення *Rg2* (*Rg-D1b*) і локусом *Gli-D1* – 1,4 % [16].

Отже, забарвлення колоса у гексаплоїдній пшениці з геномами AABBDD, в тому числі *Triticum spelta* L., може визначатись наявністю 1–3 домінантних алелів забарвлення за гомеологічними локусами *Rg-1*, а гліадинкодуєчі локуси можуть слугувати генетичними маркерами для хромосомної локалізації генів кольору колоскової луски.

Метою дослідження даної роботи був пошук генетичного маркера темного забарвлення колоскових лусок у пшениці спельти різновиду *caeruleum* серед компонентів електрофоретичних спектрів гліадинів зернівок.

Матеріали і методи. Матеріалом для дослідження слугували зразки спельти, що характеризуються темним (чорним) забарвленням колоскових лусок – *T. spelta* var. *caeruleum* (UA0300074, Іспанія), *T. spelta* var. *caeruleum* (UA0300218, Італія) cv. Tridentina; сорти ярої м'якої пшениці з білим забарвленням колоскових лусок – Харківська 26 (UA0101499, Україна) та Sunnan (UA0100098, Швеція) з колекції Національного центру генетичних ресурсів рос-



Електрофореграма гліадинів зразків пшениці: 1 – *T. spelta* var. *caeruleum* cv. Tridentina; 2 – *T. aestivum* cv. Лютесценс 62. Стрілкою позначено γ -гліадин, кодований алелем *Gli-A1j** (зліва) і *Gli-A1j* (справа)

лин України НААН (НЦГРРУ); колоси з рослин F_2 від схрещування *T. spelta* (UA0300074) \times *T. aestivum* Харківська 26 (143/11), *T. aestivum* cv. Sunnan \times *T. spelta* cv. Tridentina (149/11), а також BC_1 *T. spelta* (UA0300074) \times *T. aestivum* Харківська 26² (145/11). У кожній рослині вказаних гібридів визначали забарвлення колоса без урахування його інтенсивності та встановлювали співвідношення класів розщеплення.

Для аналізу електрофоретичних спектрів гліадину відбирали відповідно 25, 33 та 12 колосів вказаних комбінацій схрещування. З кожного колоса аналізували по 3–6 окремих зернівок електрофорезом гліадинів [17]. Ідентифікували генотипи зернівок за локусами гліадинів *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* і на їх основі записували генотип рослин F_2 або BC_1 . Алелі гліадинкодуєчих локусів позначали на основі каталогу Метаковського [14] з доповненнями. *Gli-A1j** – алель у зразків спельт, що кодує γ -гліадин, подібний до γ -гліадину, кодованого алелем *Gli-A1j* *T. aestivum* (сорт стандарт – Лютесценс 62 [14]) (рисунок).

Відповідність співвідношення класів розщеплення за забарвленням колоскових лусок теоретичній моделі та пов'язаність забарвлен-

ня з певними гліадиновими локусами тестували за допомогою критерію χ^2 [18].

Результати досліджень та їх обговорення. Колоси рослин F_1 обох досліджених комбіна-

цій схрещування очікувано мали темне забарвлення, оскільки, як відомо, воно домінує [1]. Розщеплення за забарвленням колоса як у F_2 обох комбінацій, так і у потомстві бекроса

Таблиця 1. Розщеплення за забарвленням колоскових лусок у потомства від схрещування *T. spelta* × *T. aestivum*

Комбінація схрещування	Очікуване співвідношення темні : світлі	Кількість рослин із забарвленням колоскових лусок		χ^2	P
		темним	світлим		
F_2 <i>T. spelta</i> (UA0300074) × <i>T. aestivum</i> Харківська 26 (143/11)	3:1	84	24	0,44	0,5
BC_1 <i>T. spelta</i> (UA0300074) × <i>T. aestivum</i> Харківська 26 ² (145/11)	1:1	69	57	2,10	0,1
F_2 <i>T. aestivum</i> cv. Sunnan × <i>T. spelta</i> cv. Tridentina (149/11)	3:1	122	30	2,25	0,1

Таблиця 2. Зв'язок гліадинових маркерів із забарвленням колоскових лусок у гібридів спельти з м'якою пшеницею

Комбінація схрещування	Генотип	Кількість рослин із забарвленням колоскових лусок		df	χ^2	P
		світлим	темним			
Локус <i>Gli-A1</i>						
143/11	<i>ff</i>	11		2	25,0	< 0,01
	<i>fj*</i>		5			
	<i>j*,j*</i>		9			
145/11	<i>ff</i>	10		2	23,0	< 0,01
	<i>fj*</i>		10			
	<i>j*,j*</i>		3			
149/11	<i>j*,j*</i>		8	2	33,2	< 0,01
	<i>oj*</i>		10			
	<i>o.o</i>	15				
Локус <i>Gli-B1</i>						
143/11	<i>e.e</i>	3	8	2	2,2	> 0,25
	<i>e.k</i>	4	3			
	<i>k.k</i>	4	3			
145/11	<i>e.e</i>	2	8	2	4,0	> 0,1
	<i>e.k</i>	6	4			
	<i>k.k</i>	2	1			
149/11	<i>e.e</i>	1	2	2	0,2	> 0,75
	<i>e.k</i>	4	5			
	<i>k.k</i>	10	11			
Локус <i>Gli-D1</i>						
143/11	<i>ff</i>	4	6	1	0,1	> 0,75
	<i>i.-</i>	7	8			
145/11	<i>ff</i>	5	3	1	1,8	> 0,1
	<i>i.-</i>	5	10			
149/11	<i>b.-</i>	8	8	1	0,3	> 0,5
	<i>ff</i>	7	10			

T. spelta (UA0300074) × *T. aestivum* Харківська 26² відповідає моногенному контролю ознаки (табл. 1).

У межах кожної з груп рослин за забарвленням колосів спостерігалось розщеплення за іншими морфологічними ознаками: за наявністю остюків: остисті – безості; за комплексом ознак спельти (видовжений рихлий колос; жорсткі колоскові луски, які обумовлюють важкий виломот зерна): спельтоїди – тип м'якої пшениці; за щільністю колоса у межах останнього типу: середньої щільності – компактний – булавоподібний. Усі ці морфологічні варіанти представлені серед колосів, відібраних для аналізу електрофоретичних спектрів гліадину.

За результатами електрофорезу гліадинів обидва досліджувані зразки спельти різновиду *caeruleum* мають генотип за гліадинкодуєчими локусами *Gli-A1j**, *Gli-B1k*, *Gli-D1f* (рисунок). Генотипи сортів *T. aestivum*, включених у схрещування, наступні: *Gli-A1f*, *Gli-B1e*, *Gli-D1i* у сорту Харківська 26 та *Gli-A1o*, *Gli-B1e*, *Gli-D1b* у сорту Sunnap. Чисельність різних генотипів рослин за цими локусами в проаналізованих вибірках рослин F₂ та BC₁ представлено у табл. 2.

Виявлено, що темний колір колоскових лусок в обох зразків спельти різновиду *caeruleum* кодується геном, пов'язаним з присутністю алеля *Gli-A1j**. Темний колір (різної інтенсивності) мали колоси з рослин, гомозиготних або гетерозиготних за присутністю цього алеля. Не виявлено будь-якої залежності між присутністю цього алеля та іншими морфологічними ознаками колосу: наявністю остюків, спельтоїдністю, щільністю колоса.

Таким чином, можна стверджувати, що в обох зразків спельти різновиду *caeruleum* алель *Gli-A1j** зчеплений з алелем темного кольору лусок локусу *Rg-A1* та може слугувати маркером цієї ознаки.

Певні гліадинові компоненти, зчеплені з генами забарвлення колоса, описані у пшениць м'якої та твердої. Так, з червоним кольором колоса асоційовані блоки гліадинів *Gld1B8*, *Gld1B5*, *Gld1B9*, *Gld1B11*, *Gld1B12*, *Gld1B13*, *Gld1B15* [5, 12], *Gld1B17* [8], кодовані генами локусу *Gli-B1*, та блок *Gld1A11*, кодований генами локусу *Gli-A1*. За позначеннями Метаківського [14], з червоним кольором колоса пов'язані алелі *Gli-B1c*, *i*, *k*, *m*, *o*, *p*. Асоціацію

певних гліадинових компонентів, контрольованих *Gli-B1*, та червоного кольору колоса також показано для зразка спельти [19]. Як було уточнено, червоний колір колоса зустрічається у сортів з експресією двох характерних ω-гліадинів [15]. Такі компоненти, кодовані алелем *Gli-B5b*, мають спельти різновидів *duhamelianum* і *neglectum* з червоним (коричневим) кольором колоскових лусок [20]. Проаналізовані в даному дослідженні спельти належать до різновиду *caeruleum* (з латинської – блакитний). Колір колоскових лусок різновиду *caeruleum* описують як сірий [21], блакитний [22] або коричневий [23]. Крім того, прояв забарвлення колоса залежить від умов вирощування, зокрема інтенсивності світла [24]. Досліджені зразки спельт мають компоненти, кодовані алелем *Gli-B1k*, проте без ω-гліадинів, кодованих *Gli-B5b*, а темне забарвлення колоса визначається геном *Rg-A1*, зчепленим з алелем *Gli-A1j**. Слід зазначити, що у пшениці м'якої сорту Лютесценс 62 подібний алель *Gli-A1j* не пов'язаний з темним кольором колоса.

Висновки. У зразків спельти *T. spelta* var. *caeruleum* UA0300074 (Іспанія) і UA0300218, cv. Tridentina (Італія) алель *Gli-A1j** зчеплений з алелем темного (чорного) кольору лусок за локусом *Rg-A1*.

GENETIC MARKING OF GLUME COLOUR IN *TRITICUM SPELTA* L. VAR. *CAERULEUM* USING GLIADINS

N.A. Kozub, I.A. Sozinov, A.K. Niniyeva,
Ye.V. Tverdokhleb, Ya.B. Blume, R.L. Boguslavskii

Institute of Plant Protection of NAAS, Kyiv,
E-mail: sia1@i.com.ua

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

V.Ya. Yuriev Institute of Plant Growing
of NAAN, Kharkiv

Genetic control of dark color of glumes was studied in *Triticum spelta* L. var. *caeruleum* accessions using gliadins as genetic markers. F₂ and BC₁ plants from crosses between the spelt accessions and common wheat varieties with white glumes served as the material for the investigation. Analysis of segregation for glume colour fitted the monogenic control of the character. Using electrophoretic analysis of gliadin of seeds from the hybrid plants it was revealed that in the *T. spelta* var. *caeruleum* accessions the allele *Gli-A1j** is linked to the allele for dark (black) glumes at the *Rg-A1* locus.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ МАРКИРОВАНИЕ
ОКРАСКИ КОЛОСКОВЫХ ЧЕШУЙ
У *TRITICUM SPELTA* L. VAR. *CAERULEUM*
С ПОМОЩЬЮ ГЛИАДИНОВ

Н.А. Козуб, И.А. Созинов, А.К. Ниниева,
Е.В. Твердохлеб, Я.Б. Блум, Р.Л. Богуславский

Исследован генетический контроль темной окраски колосковых чешуй у образцов *Triticum spelta* L. var. *caeruleum* с использованием глиадинов как генетических маркеров. Материалом исследования служили растения F₂ и BC₁ от скрещивания образцов спельты с белоколосыми сортами мягкой пшеницы. Расщепление по цвету колоса соответствовало моногенному контролю признака. С помощью электрофоретического анализа глиадинов зерен с гибридных растений выявлено, что у образцов спельты разновидности *caeruleum* аллель *Gli-A1j** сцеплен с аллелем темного (черного) цвета колосковых чешуй по локусу *Rg-A1*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khlestkina, E.K., Genes determining coloration of different organs in wheat, *Vavilov J. Genet. Breed.*, 2012, vol. 16, no. 1, pp. 202–216.
2. Börner, A., Schäfer, M., Schmidt, F., Grau, M., and Vorwald, J., Associations between geographical origin and morphological characters in bread wheat (*Triticum aestivum* L.), *Plant Genet. Res.*, 2005, vol. 3, no. 3, pp. 360–372.
3. Khlestkina, E.K., Pshenichnikova, T.A., Röder, M.S., Salina, E.A., Arbuzova, V.S., and Börner, A., Comparative mapping of genes for glume colouration and pubescence in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.), *Theor. Appl. Genet.*, 2006, vol. 113, no. 5, pp. 801–807.
4. *Catalogue of Gene Symbols. Gene Catalogue*, 2013, <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/download.jspMacGene>.
5. Sobko, T.A., and Sozinov, A.A., Genetical control of morphological characters in the ear and interrelations of allele variability of the marker loci of chromosomes 1A and 1B of soft winter wheat, *Tsitol. Genet.*, 1993, vol. 27, no. 5, pp. 15–22.
6. Dubcovsky, J., Luo, M.-C., Zhong, G.Y., Bransteitter, R., Desai, A., Kiliann, A., Kleinhofs, A., and Dvorak, J., Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L., *Genetics*, 1996, vol. 143, no. 2, pp. 983–999.
7. Payne, P.I., Holt, L.M., Johnson, R., and Snape, J.W., Linkage mapping of four gene loci, *Glu-B1*, *Gli-B1*, *Rg1* and *Yr10* on chromosome 1B of bread wheat, *Genet. Agraria*, 1986, vol. 40, no. 2, pp. 231–242.

8. Koval, S.F., Metakovsky, E.V., Kudryavtsev, A.M., and Sozinov, A.A., Linkage of families of alleles of gliadin-coding loci and genes controlling hairiness and colour of spike in wheat, *Selskhoz. Biol.*, 1986, no. 2, pp. 31–36.
9. Koval, S.F., Genetic analysis of isogenic lines of spring wheat variety Novosibirskaya 67. 1. Location of the gene determining the brown colour of the glume in chromosome 1D, *Russ. J. Genet.*, 1994, vol. 30, no. 4, pp. 570–571.
10. Sobko, T.A., Sozinov, A.A., Mapping of loci that control morphological spike traits and reserve grain proteins in 1A chromosome of winter common wheat, *Tsitol. Genet.*, 1997, vol. 31, no. 4, pp. 18–26.
11. Khlestkina, E.K., Tereshchenko, O.Yu., Arbuzova, V.S., Börner, A., Pershina, L.A., and Salina, E.A., A new range of wheat precise genetic stocks application: insights into gene function, *European Cereals Genetics Cooperative Newsletter*, Proc. 15th Int. EWAC Conf., 7–11 Nov. 2011, Novi Sad, Serbia, ed. A. Börner and B. Kobijlski, 2012, pp. 23–26.
12. Blanco, A., Bellomo, M.P., Cenci, A., De Giovannini, C., D'Ovidio, R., Iacono, E., Laddomada, B., Pagnotta, M.A., Porceddu, E., Sciancalepore, A., Simeone, R., and Tanzarella, O.A., A genetic linkage map of durum wheat, *Theor. Appl. Genet.*, 1998, vol. 97, pp. 721–728.
13. Poperelya, F.A., Bito, M., and Sozinov, A.A., Association of blocks of gliadin components with survival of plants, their productivity, spike colour and flour quality in F₂ hybrids from the cross of the varieties Bezostaya 1 and Crvena Zvezda, *Doklady VASKhNIL*, 1980, vol. 4, pp. 4–7.
14. Metakovsky, E.V., Gliadin allele identification in common wheat. 2. Catalogue of gliadin alleles in common wheat, *J. Genet. Breed.*, 1991, vol. 45, pp. 325–344.
15. Pogna, N.E., Metakovsky, E.V., Redaelli, R., Raineri, F., and Dachkevitch, T., Recombination mapping of *Gli-5*, a new gliadin-coding locus on chromosomes 1A and 1B in common wheat, *Theor. Appl. Genet.*, 1993, vol. 87, no. 1–2, pp. 113–121.
16. Jones, S.S., Dvorak, J., and Qualset, C.O., Linkage relations of *Gli-D1*, *Rg2*, and *Lr21* on the short arm of chromosome 1D in wheat, *Genome*, 1990, vol. 33, no. 6, pp. 937–940.
17. Kozub, N.A., Sozinov, I.A., Sobko, T.A., Kolyuchii, V.T., Kuptsov, S.V., and Sozinov, A.A., Variation at storage protein loci in winter common wheat cultivars of the Central Forest-Steppe of Ukraine, *Cytol. Genet.*, 2009, vol. 43, no. 1, pp. 55–62.
18. Rokitskii P.F., *Biological Statistics*, Minsk: Vysheishaya Shkola, 1973, 320 p.

19. Waga, J., Inheritance of some ω -gliadin protein subunits in spelt wheat and their linkage with the red glume coding *Rg-1* locus, *Plant Breed. Seed Sci.*, 2002, vol. 46, no. 2, pp. 25–35.
20. Kozub, N.A., Boguslavskii, R.L., Sozinov, I.A., Tverdokhlebov, Ye.V., Xynias, I.N., Blume, Ya.B., and Sozinov, A.A., Alleles at storage protein loci in *Triticum spelta* L. accessions and their occurrence in related wheats, *Cytol. Genet.*, 2014, vol. 48, no. 1, pp. 33–41.
21. http://genbank.vurv.cz/ewdb/asp/ewdb_d2.asp?accn=56131
22. Alvarez, J.B., Caballero, L., and Martín, L.M., Variability for morphological traits and high molecular weight glutenin subunits in Spanish spelt lines, *Plant Genet. Res.*, 2007, vol. 5, no. 3, pp.128–130.
23. Szaby, A.T., and Hammer, K., Notes on the taxonomy of farro: *Triticum monococcum*, *T. dicoccon* and *T. spelta*, *Hulled Wheat*. Proc. 1st Int. Workshop on Hulled Wheats, eds S. Padulosi, K. Hammer, J. Heller, Castelvecchio Pascoli, Tuscany, Italy, 1995, pp. 1–29.
24. Zeven, A.C., The character brown ear of bread wheat: A review, *Euphytica*, 1983, vol. 32, no. 2, pp. 299–310.

Надійшла 10.08.15