

¹ Інститут захисту рослин НААН,

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

² ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України»,

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

✉ natalkozub@gmail.com, sia1@i.com.ua, (044) 257-22-58

ГЕНЕТИЧНА КОЛЕКЦІЯ *AEGILOPS BIUNCIALIS* VIS.

Для ефективного збереження генетичних ресурсів рослин певного виду *ex situ* в колекції генетичного банку [1] було запропоновано створення корових колекцій. В ідеалі, коро́ва колекція виду складається з обмеженого набору зразків, які репрезентують генетичну різноманітність виду з мінімальною подібністю між зразками [2]. Зручним методом відбору зразків для формування коро́вої колекції може бути метод з використанням аналізу різноманітності за маркерами (білковими або ДНК-маркерами). В межах цього методу виділяють Н-стратегію та М-стратегію. М-стратегія спрямована на включення максимальної кількості різних алелів за кожним маркерним локусом (алельного багатства) при підтриманні обмеженого об'єму колекції [2].

Дикий родич пшениці *Aegilops biuncialis* Vis. (UUM^bM^b, 2n = 28) є широко розповсюдженим видом. Його ареал включає Південно-Східну Європу та прилеглий азійський 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 [3–5]. Він може бути джерелом нових генів стійкості до абіотичних та біотичних стресів, а також генів, що поліпшують харчову якість пшениці [6, 7], в тому числі і високомолекулярних субодиниць глютенінів [8], що безпосередньо визначають хлібопекарну якість тіста [9].

У наших попередніх дослідженнях показано значну різноманітність кримських популяцій *Ae. biuncialis* за локусами запасних білків *Gli-U1*, *Gli-M^b1* (містять кластер генів, що кодують спираторозчинні білки – гліadini), *Glu-U1*, *Glu-M^b1* (містять по два гени, що кодують високомолекулярні субодиниці глютенінів) [10, 11]. Нами розпочато створення колекції зразків *Ae. biuncialis*, яка репрезентувала б різноманітність алелів за вказаними вище локусами запасних білків. У На-

ціональному центрі генетичних ресурсів рослин України НААН (НЦГРРУ) вже зареєстровано 15 зразків цього виду з ідентифікованими алелями за вказаними локусами запасних білків [12]. Метою нашої роботи було створення генетичної колекції зразків *Ae. biuncialis* «Колекція зразків *Aegilops biuncialis* Vis. за алелями локусів запасних білків *Glu-U1*, *Glu-M^b1*, *Gli-U1*, *Gli-M^b1*» та аналіз представленості в колекції алелів локусів, знайдених у Кримській частині ареалу цього виду.

Матеріали і методи

Матеріалом для створення колекції слугували вибірки з природних популяцій Криму – Кара-Даг, Ечки-Даг, Мис Март'ян, Яю-Даг, Берегове, Піщане Бахчисарайського р-ну. Для розмноження висівали окремі колоси на дослідній ділянці (Київська обл.).

Електрофорез гліадинів проводили в кислому середовищі в 10% поліакриламідному гелі за методикою [13], електрофорез високомолекулярних (HMW) субодиниць глютенінів – за [14]. Для кожної зернівки *Ae. biuncialis* визначали генотип за локусами проламінів (гліадинів) *Gli-U1*, *Gli-M^b1* та високомолекулярних субодиниць глютенінів *Glu-U1*, *Glu-M^b1*, алелі цих локусів позначали малими латинськими літерами. Для позначення алелів високомолекулярних субодиниць глютенінів використовували каталог [10] з доповненнями [15]. Алелі за гліадиновими локусами *Gli-U1*, *Gli-M^b1* позначали згідно з каталогом [11]. Для ідентифікації алелів на кожну пластину наносили білки зразків *Ae. biuncialis* з відомими алелями: зареєстрований зразок NK 10-3 (*Gli-U1a*, *Gli-M^b1c*, *Glu-U1b*, *Glu-M^b1d*) і зразок NK 13-2 (*Gli-U1a*, *Gli-M^b1a*, *Glu-U1b*, *Glu-M^b1a*). За необхідності електрофорез повторювали з нанесенням на пластину білків інших зразків з раніше ідентифікованими алелями. Для характеристики генетичної різноманітності використовували такі показники: число алелів на локус, показник гене-

Походження зразків генетичної колекції *Ae. biuncialis*

№	№ Нац. каталогу	Назва зразка	Походження*
1	UA0400157	NK 1-1	Мис Март'ян
2	UA0400157	NK B1-1	Піщане, Бахчисарайський р-н
3	UA0400158	NK 4N2	Берегове, Бахчисарайський р-н
4	UA0400159	NK 6-2	Берегове, Бахчисарайський р-н
5	UA0400160	NK 10-3	Кара-Даг
6	UA0400161	NK 11-2	Кара-Даг
7	UA0400162	NK 13-1	Кара-Даг
8	UA0400163	NK 14-12	Кара-Даг
9	UA0400164	NK 50	Кара-Даг
10	UA0400166	NK MM2-1	Мис Март'ян
11	UA0400167	NK MM7-3	Мис Март'ян
12	UA0400168	NK MMB-2	Мис Март'ян
13	UA0400169	NK O2	Зібрано як заносну самосійну рослину на дослідній ділянці м. Києва
14	UA0400170	NK O10	Кара-Даг
15	UA0400171	NK OZ-2	Аю-Даг
16	–	NK 4-1	Мис Март'ян
17	–	NK 24a-4	Ечки-Даг
18	–	NK B1-2	Піщане, Бахчисарайський р-н
19	–	NK 23a-2	Ечки-Даг
20	–	NK OZ-1	Аю-Даг
21	–	NK 13-2-1	Кара-Даг
22	–	NK 12-5	Кара-Даг
23	–	NK BS2-3	Мис Март'ян
24	–	NK B3-1	Піщане, Бахчисарайський р-н

Примітка. * – добір з природної популяції, крім NK O2.

тичної різноманітності за NeH , ефективне число алелів n_e [16].

Результати та обговорення

Основним принципом створення колекції зразків *Ae. biuncialis* було представлення максимальної кількості різних алелів локусів *Gli-U1*, *Gli-M^b1*, *Glu-U1*, *Glu-M^b1* при мінімальній кількості зразків, що відповідає М-стратегії створення корової колекції виду [2]. У такому випадку ми обмежилися лише невеликою частиною ареалу виду, а саме популяціями Криму. Раніше нами вже було зареєстровано у НЦГРПУ 15 зразків *Ae. biuncialis* [12]. Для створення генетичної колекції подано на реєстрацію зразки з новими алелями за маркерними локусами, виділені з популяцій мису Март'ян (NK 4-1, NK BS2-3), Бахчисарайського р-ну (NK B1-2, NK B3-1), Аю-Дагу (NK OZ-1), Ечки-Дагу (NK 24a-4, NK 23a-2), Кара-Дагу (NK 12-5, NK 13-2-1). На основі цих та раніше зареєстрованих зразків сформована та подана на реєстрацію до НЦГРПУ генетична колекція *Ae.*

biuncialis «Колекція зразків *Aegilops biuncialis* Vis. за алелями локусів запасних білків *Glu-U1*, *Glu-M^b1*, *Gli-U1*, *Gli-M^b1*».

У генетичній колекції *Ae. biuncialis* представлено зразки з різних регіонів Криму (табл. 1).

До складу колекції включено 10 зразків зі східної частини ареалу в Криму (Кара-Даг – 8 зразків, Ечки-Даг – 2 зразки), з південної частини ареалу – 8 зразків (Мис Март'ян – 6 зразків, Аю-Даг – 2 зразки), із західної частини – 5 зразків (Бахчисарайський р-н, Берегове – 2 зразки, Піщане – 3 зразки), тобто охоплено практично весь ареал виду в Криму. Також у колекцію включено один зразок невідомого походження (NK O2).

При відборі зразків для колекції базувалися на таких критеріях: у першу чергу наявність нових алелів за маркерними локусами, гомогенність зразка, достатня кількість рослинного матеріалу. Генотипи зразків колекції за маркерними локусами наведено в табл. 2.

Електрофоретичні спектри високомолекулярних субодиниць глютенінів та гліадинів, ко-

Таблиця 2

Генотипи зразків *Ae. biuncialis* за локусами запасних білків

Назва зразка	<i>Glu-U1</i>	<i>Glu-M1</i>	<i>Gli-U1</i>	<i>Gli-M1</i>
NK 4N2	a	e	c	e
NK 6-2	a	e	f	g
NK O2	g	h	h	h
NK 13-1	e	d	a	a
NK MM7-3	c	a	j	b
NK B1-1	d	m	i	c
NK 1-1	b	b	b	a
NK 14-12	b	f	d	a
NK 50	b	g	e	a
NK OZ-2	b	a	n	a
NK 10-3	b	d	a	c
NK 11-2	b	a	a	d
NK MM2-1	b	a	g	d
NK O10	b	a	a	i
NK MMB-2	b	a	a	j
NK 4-1	c	a	f	f
NK 24a-4	b	a	o	a
NK B1-2	c	b	e	g
NK 23a-2	b	a	j	k
NK OZ-1	b	b	a	b
NK 13-2-1	b	a	a	a
NK 12-5	b	d	e	c
NK BS2-3	b	c	l	a
NK B3-1	c	b	i	l

дованих мажорними локусами хромосом першої гомеологічної групи, зразків колекції *Ae. biuncialis* показано на рис. На спектрах гліадинів також можливо ідентифікувати продукти експресії алелів за гліадиновими локусами хромосом шостої гомеологічної групи *Gli-U2*, *Gli-M^b2* (блоки a-B0 b-3; V048=V2), що вимагає подальших досліджень. Опис генетичної колекції, поданої на реєстрацію в НЦГРРУ, також включає каталоги білкових компонентів, кодованих алелями локусів *Glu-U1*, *Glu-M^b1*, *Gli-U1*, *Gli-M^b1*, що представлені в даній колекції зразків *Ae. biuncialis*.

Серед генотипів зразків створеної нами колекції зразків *Ae. biuncialis* зустрічається 6 різних алелів локусу високомолекулярних субодиниць глютенінів *Glu-U1* (алелі a–e, g), 9 алелів локусу *Glu-M^b1* (a–h, m), 13 алелів гліадинкодуєчого локусу *Gli-U1* (a–j, l, n, o) та 12 – локусу *Gli-M^b1* (a–l). Зразки колекції можуть слугувати зразками-стандартами відповідних алелів (табл. 2).

Алелі в колекції зустрічаються з різними частотами, найбільші частоти мають алелі *Glu-U1b* (0,625), *Glu-M^b1a* (0,417), *Gli-U1a* (0,292), *Gli-M^b1a* (0,333). Найменше значення показника генетичної різноманітності за He_i в колекції – за локусом *Glu-U1* (0,569), найбільше – за локусом *Gli-U1* (0,865) (табл. 3). Відповідно, найбіль-

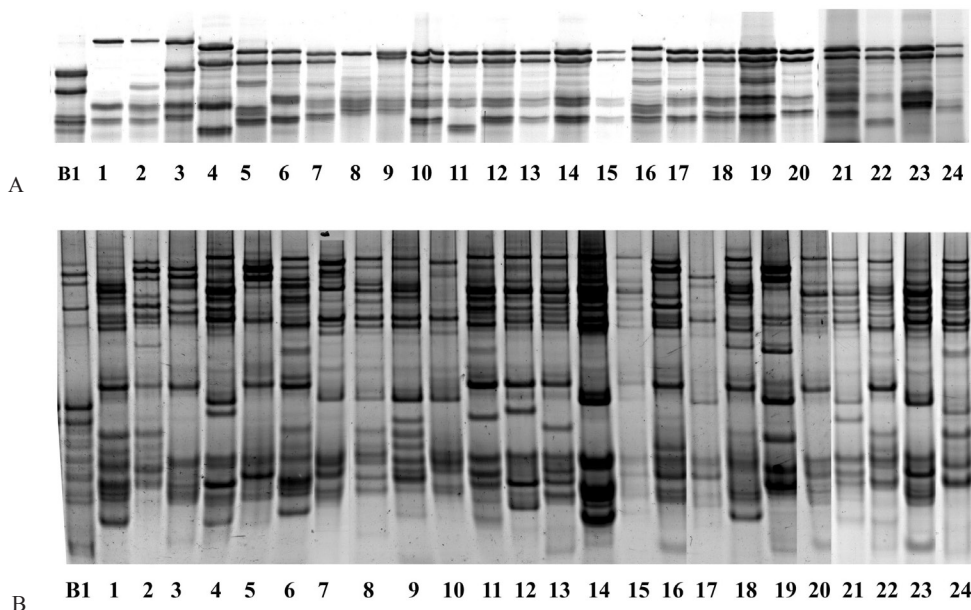


Рис. Електрофоретичні спектри високомолекулярних субодиниць глютенінів зразків *Ae. biuncialis* (A) та гліадинів (B): 1. NK 4N2; 2. NK 6-2; 3. NK O2; 4. NK 13-1; 5. NK MM7-3; 6. NK B1-1; 7. NK 1-1; 8. NK 14-12; 9. NK 50; 10. NK OZ-2; 11. NK 10-3; 12. NK 11-2; 13. NK MM2-1; 14. NK O10; 15. NK MMB-2; 16. NK 4-1; 17. NK 24a-4; 18. NK B1-2; 19. NK 23a-2; 20. NK OZ-1; 21. NK 13-2-1; 22. 12-5; 23. BS2-3; 24. B3-1. B1 – сорт пшениці м'якої озимої Безоста 1

Таблиця 3

Показники різноманітності колекції *Ae. biuncialis* та порівняння з кількістю алелів у загальній вибірці кримських популяцій (С – колекція, Р – популяція)

Локус	Кількість алелів		С/Р	H	n _c
	С	Р			
<i>Glu-U1</i>	6	10	0,6	0,569	2,3
<i>Glu-M^b1</i>	9	18	0,5	0,767	4,3
<i>Gli-U1</i>	13	19	0,7	0,865	7,4
<i>Gli-M^b1</i>	12	12	1,0	0,840	6,3

ше ефективне число алелів визначено для локусу *Gli-U1* (7,4), а найменше – для *Glu-U1* (2,3).

Порівняння з попередньо одержаними даними для вибірок з природних популяцій Криму показує, що ця колекція охоплює значну частину виявленої різноманітності алелів локусів запасних білків у кримських популяціях *Ae. biuncialis*. У колекції представлено 60% ідентифікованих алелів локусу *Glu-U1*, 50% алелів локусу *Glu-M^b1*, 68% алелів локусу *Gli-U1* та 100% ідентифікованих у кримських популяціях алелів локусу *Gli-M^b1*. Крім того, продовжується розмноження зразків *Ae. biuncialis* з іншими алелями локусів запасних білків для доповнення колекції.

Отже, створена невелика за розміром колекція охоплює від 50% і більше різноманітності алелів маркерних локусів *Glu-U1*, *Glu-M^b1*, *Gli-U1*, *Gli-M^b1* кримських популяцій *Ae. biuncialis*. Тому цю колекцію можна вважати основою корової колекції для збереження генетичних ресурсів цього злаку *ex situ*, яка буде розширюватися після розмноження зразків з новими алелями.

Збереження зразків *Ae. biuncialis* у колекції НЦГРПУ дозволить застосовувати їх у міжвидовій гібридизації як джерело нових алелів корисних ознак для культурної пшениці, а також використовувати для дослідження та моніторингу природних популяцій з використанням маркерних локусів.

Висновки

У генетичній колекції з 24 зразків *Ae. biuncialis* «Колекція зразків *Aegilops biuncialis* Vis. за алелями локусів запасних білків *Glu-U1*, *Glu-M^b1*, *Gli-U1*, *Gli-M^b1*» представлено 40 алелів за основними локусами запасних білків хромосом першої гомеологічної групи. Відповідні зразки можуть слугувати зразками-стандартами для ідентифікації цих алелів. Колекція включає від 50 до 100% різноманітності алелів локусів запасних білків, виявленої в кримських популяціях.

ЛІТЕРАТУРА

1. Nevo E. Genetic diversity in wild cereals: regional and local studies and their bearing on conservation *ex situ* and *in situ* // Genet. Resources Crop Evol. – 1998. – 45. – P. 355–370.
2. van Hintum Th.J.L., Brown A.H.D., Spillane C., Hodgkin T. Core collections of plant genetic resources // IPGRI Technical Bulletin. – International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. – 2000. – N 3. – 50 p.
3. Богуславский Р.Л., Голик О.В. Род *Aegilops* L. как генетический ресурс селекции. – Харьков, 2004. – 236 с.
4. 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.
5. Kimber G., Feldman M. Wild wheat. An introduction. Special Report 353 – Columbia: College of Agriculture University of Missouri, 1987. – 146 p.
6. 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.
7. Farkas A., Molnar I., Dulai S., Rapi S., Oldal V., Cseh A., Kruppa K., Molnar-Lang M. Increased micronutrient content (Zn, Mn) in the 3M^b(4B) wheat – *Aegilops biuncialis* substitution and 3M^b.4BS translocation identified by GISH and FISH // Genome. – 2014. – 57. – P. 61–67.
8. Zhou J.P., Yao C.H., Yang E.N., Yin M.Q., Liu C., Ren Z.I. Characterization of a new wheat-*Aegilops biuncialis* addition line conferring quality-associated HMW glutenin subunits // Genetics and Molecular Research. – 2014. – 13, N 1. – P. 660–669.
9. 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.
10. Козуб Н.А., Созінов І.А., Ксиниас І.Н., Созінов А.А. Разнообразие аллелей локусов высокомолекулярных субъединиц глютеинов *Aegilops biuncialis* Vis. // Генетика. – 2011. – 47, № 9. – С. 1216–1222.
11. Козуб Н.А., Созінов І.А., Созінов А.А. Идентификация аллелей глиадиновых локусов *Gli-U1* и *Gli-M^b1* *Aegilops biuncialis* Vis. // Генетика. – 2012. – 48, № 4. – С. 473–479.
12. Козуб Н.О., Созінов І.О., Бідник Г.Я., Дем'янова Н.О., Созінов О.О. Реєстрація зразків-стандартів алелів локусів високомолекулярних субодиниць глютеїнів *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. 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 // Цитология и генетика. – 2009. – 43, № 1. – С. 69–77.
14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – 227, N 5259. – P. 680–685.

15. Козуб Н.О., Созінов І.О., Бідник Г.Я., Дем'янова Н.О., Ксиніас І.Н., Блюм Я.Б., Созінов О.О. Поліморфізм високомолекулярних субодиниць глютенінів *Aegilops biuncialis* Vis. // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – К.: Логос, 2015. – 17. – С. 308–312.
16. Laurentin H. Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources // Genet. Resour. Crop. Evol. – 2009. – 56. – P. 277–292.

KOZUB N.A.^{1,2}, SOZINOV I.A.¹, BIDNYK H.YA.^{1,2}, DEMIANOVA N.A.^{1,2}, BLUME YA.B.², SOZINOV A.A.²

¹ Institute of Plant Protection, NAAS,

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 33, e-mail: sial@i.com.ua

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

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

GENETIC COLLECTION OF *AEGILOPS BIUNCIALIS* VIS.

Aim. The aim of the study was to make the genetic collection of *Aegilops biuncialis* Vis. «Collection of *Aegilops biuncialis* Vis. accessions with respect to alleles at the storage protein loci *Glu-U1*, *Glu-M^b1*, *Gli-U1*, *Gli-M^b1*» and analyze its diversity in comparison with that in Crimean populations. **Methods.** We used SDS and APAG electrophoresis to identify alleles at the *Glu-1* and *Gli-1* loci. **Results.** In the *Ae. biuncialis* collection there are 6, 9, 13, and 12 alleles at the loci *Glu-U1*, *Glu-M^b1*, *Gli-U1* and *Gli-M^b1*, respectively. In comparison with the allele diversity revealed in Crimean populations of the species, the collection represents 60% of identified alleles at *Glu-U1*, 50% of alleles at *Glu-M^b1*, 68% of alleles at *Gli-U1*, and 100% of alleles at *Gli-M^b1*. **Conclusions.** The *Ae. biuncialis* collection comprises from 50 to 100% of diversity of alleles at the storage protein loci revealed in Crimean populations and may be considered as the basis of the core collection from its Crimean part of the area.

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