

## ПОЛІМОРФІЗМ ДОВЖИНИ ГЕНА *PINB-1* У *AEGILOPS BIUNCIALIS* VIS.

О.І. СОЗИНОВА<sup>1,2\*</sup>, Н.О. КОЗУБ<sup>1,2\*</sup>, Я.Б. БЛЮМ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України», Україна, 04123, Київ, вул. Байди-Вишневецького, 2а,

<sup>2</sup> Інститут захисту рослин НААН, Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 33

E-mail: natalkozub@gmail.com\*, sozinovaoksana1@gmail.com, cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

Пуроіндоліни (пуроіндолін а та пуроіндолін b) визначають текстуру зерна пшениці, що впливає на властивості помолу зерна та водопоглинальні властивості борошна. Рівень твердозерності пшениці м'якої контролюється алейним складом локусу *Ha* на короткому плечі хромосоми 5D, який містить тісно зчеплені гени *Pina-D1* та *Pinb-D1*. Джерелом нових варіантів пуроіндолінових генів для збагачення генофонду пшениці можуть бути види егілонсів. Одним з таких видів є тетраплоїдний вид *Aegilops biuncialis* Vis. (геномна формула UUMM). У нашій роботі було досліджено поліморфізм довжин пуроіндолінових генів з використанням ПЛР-ампліфікації з ген-специфічними праймерами у *Ae. biuncialis*. Аналізували колекцію зразків *Ae. biuncialis*, що походять з Кримського півострова. Виявлено поліморфізм за кількістю ампліконів з ген-специфічними праймерами до гена пуроіндоліну b: спостерігали один (завдовжки біля 520 п.н.) або два продукти ампліфікації (біля 520 і 500 п.н.). Частота зразків з двома ампліконами становила 12,5% у дослідженій колекції зразків. Зразки з двома ампліконами зустрічались у Східній та Південній частинах ареалу виду на Кримському півострові. Ймовірно, у зразків *Ae. biuncialis* з двома ампліконами фрагмент завдовжки біля 520 п.н. відповідає гену *Pinb-U1*, а фрагмент завдовжки 500 п.н. відповідає гену *Pinb-M1*, і цей алей може бути подібним до рідкісного аляля *Pinb-M1-III Ae. comosa*.

**Ключові слова:** *Aegilops biuncialis*, пуроіндолін, твердозерність, ПЛР, алей, різноманітність, популяція.

**Вступ.** Серед білків зерна пшениці м'якої *Triticum aestivum* L. (геномна формула AABBDD) виділяють дві групи, які роблять основний внесок у якість зерна. Це глютеніві білки, що визначають віскоеластичні властивості тіста, та пуроіндоліни, які визначають текстуру зерна (Shewry, 2022). За сучасною класифікацією і глютеніві білки, і пуроіндоліни відносяться до надродини проламінів (Morris et al, 2021). Текстура зерна впливає на властивості помолу

зерна та водопоглинальні властивості борошна. Відповідно, сорти пшениці м'якої поділяються на твердозерні та м'якозерні. Відмінності в кількості енергії, необхідної для помолу, цих двох типів пшениць пов'язують зі ступенем адгезії між поверхнями крохмальних гранул і білковим матриксом, у якому розміщені ці гранули. Ця адгезія сильніша у твердозерних пшениць (Shewry, 2022). Твердозерні сорти пшениці м'якої використовуються для виробництва хліба, тоді як борошно з м'якозерних сортів має кондитерське призначення. Рівень твердозерності визначається алейним складом пуроіндолінового локусу (або локусу твердозерності *Ha*) на короткому плечі хромосоми 5D, який містить тісно зчеплені гени, що кодують пуроіндолін а, пуроіндолін b, та білок, пов'язаний з м'якозерністю GSP-1 (Turnbull et al, 2003; Pauly et al, 2013).

Пуроіндоліни поділяються на пуроіндолін а (PINA) та пуроіндолін b (PINB) (Pauly et al, 2013). Пуроіндоліни синтезуються як «секреторні» білки – з N-термінальним сигнальним пептидом, який відщеплюється при потраплянні білка в порожнину ендоплазматичного ретикулула, даючи в результаті зрілий білок з молекулярною масою біля 13 кДа (Gautier et al, 1994). Це – основні білки з ізоелектричною точкою 10,5–11. PINA містить 120 амінокислотних залишків, PINB складається з 119 амінокислотних залишків. В амінокислотній послідовності пуроіндолінів є десять цистеїнових залишків та триптофан-багатий домен. PINA має 5 триптофанових залишків, PINB – 3 триптофанові залишки (Gautier et al, 1994). Саме триптофан-багатий домен забезпечує антимікробну дію пуроіндолінів через взаємодію з полярними ліпідами клітинних мембран, що призводить до утворення пор у мембрані (Pauly et al 2013, Morris, 2019).

Гени пуроіндолінів відсутні на хромосомах 5A і 5B *T. aestivum*, але ген, що кодує GSP-1

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2023

наявний у відповідних локусах на хромосомах 5A і 5B. Аналогічно, гени пуруіндолінів а та b відсутні у тетраплоїдній пшениці *T. turgidum* (з геномом AABB) при наявності гена *Gsp-1* на 5A і 5B (Chantret et al, 2005). Водночас гени *Pina-1* та *Pinb-1* є на хромосомі 5A<sup>m</sup> пшениці-однозернянки *T. monosocum* (Morris, 2002).

Пуруіндоліни пшениці відносяться до групи білків індолінів (Morris et al, 2021). Індоліни притаманні видам триб Triticeae та Avenae (Poae), причому переважає м'яка текстура ендосперму. Білки, аналогічні пуруіндолінам, називаються гордоіндолінами у ячменю, секалоіндолінами у жита, авеноіндолінами та вроміндолінами у вівса. Відповідні білки егілопсів також називаються пуруіндолінами (Morris et al, 2021). У *T. aestivum*, геном D і, відповідно, гени пуруіндолінів походять від *Ae. tauschii* (геномна формула DD) (Chantret et al, 2005). Джерелом різноманітності пуруіндолінових генів для збагачення генофонду пшениці можуть бути інші види егілопсів (Kumar et al, 2019). Одним з таких видів є тетраплоїдний вид *Ae. biuncialis* Vis. (UUMM). Це один з найбільш поширених видів роду *Aeglops* L. з високою екологічною адаптивністю (van Slageren, 1994). *Ae. biuncialis* розглядається як джерело генів стійкості до абіотичних факторів (Molnár et al, 2004; Dulai et al, 2014) та генів, пов'язаних з якістю зерна (Farkas et al, 2014; Rakszegi et al, 2017) для покращення *T. aestivum*. У ліній *T. aestivum* з доданими хромосомами показано вплив хромосом *Ae. biuncialis* на вміст білка в зерні, основних компонентів харчової клітковини зерна (арабіноксилану і бета глюкану) та співвідношення глютенінів і гліадинів у загальному білку (Rakszegi et al, 2017). Присутність транслокації 3Mb.4BS від *Ae. biuncialis* значно підвищує вміст мікроелементів Zn і Mn в зерні пшениці (Farkas et al, 2014). На матеріалі часткових амфіплоїдів пшениці і *Ae. biuncialis* та ліній з доданими хромосомами у певних інтрогресивних ліній показано імунність до борошністої роси та жовтої іржі (Tan et al, 2009) та позитивний вплив доданої хромосоми 1U на показники хлібопекарної якості та вміст білка (Zhou et al, 2014). Позитивний ефект на хлібопекарну якість спостерігався і при заміні хромосоми 1B у сорту Chuannong 19 на хромосому 1M *Ae. biuncialis* (Zhou et al, 2016).

Вид *Ae. biuncialis* характеризується значною різноманітністю за реакцією на абіотичні та біотичні фактори (Molnár et al, 2004), алелями локусів запасних білків (Kozub et al, 2011, 2015), вмістом бета-глюканів, пентозанів та білка в зерні (Ivanizs et al, 2022), за різними мультилокусними молекулярними маркерами (Okuno et al, 1998; Monte et al, 2001; Rabokon et al, 2019). Метою даної роботи було дослідження різноманітності довжин пуруіндолінових генів з використанням ПЛР-ампліфікації з ген-специфічними праймерами у *Ae. biuncialis*.

**Матеріали і методи.** Матеріалом дослідження слугувала колекція 24 зразків *Ae. biuncialis*, зареєстрована в Національному центрі генетичних ресурсів рослин України (Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва Національної академії аграрних наук України, Харків) (табл. 1). Також аналізували зразки пшениці м'якої (*T. aestivum*), пшениці твердої (*T. durum*), тритикале (*Triticosecale*), пирію (*Thinopyrum*), *Dasyphyrum villosum* L. та *Ae. cylindrica*.

ДНК виділяли з окремої подрібненої зернівки за допомогою комерційного набору на основі силіки NeoPrep\_100 («Неоген™», Україна). Виділення проводили за протоколом, наданим в інструкції виробника, однак збільшували час термостатування з лізисним буфером до 60 хв.

Для ампліфікації повних послідовностей пуруіндолінових генів використовували праймери *Pina* (Massa and Morris, 2006) та *Pinb* (Massa et al, 2004). Праймери до гена *Pina*: *Pina-F* – 5'-CCAAAACACACTGACAACATGA-3' і *Pina-R* – 5'-CGCAGTGGTATGTGACAGTTT-3' (Massa and Morris, 2006). Праймери до гена *Pinb*: *Pinb-F* – 5'-AATAAAGGGGAGCCTCA ACC-3'; *Pinb-R* – 5'-CGAATAGAGGCTATA TCATACCA-3' (Massa et al, 2004). ПЛР проводили на ампліфікаторі 2720 GeneAMP System із використанням суміші PCR MIX 2x HOT («Неоген™», Україна). Умови ПЛР для обох пар праймерів: початкова денатурація при 94 °C 12 хв; 35 циклів (денатурація – 94 °C 1 хв, відпал – 58 °C 90 с, елонгація при 72 °C 2 хв); кінцева елонгація при 72 °C 10 хв. Електрофорез проводили в 2%-ному агарозному гелі з бромистим етидієм. Гелі фотографували під ультрафіолетом за допомогою системи для гелі-документації VISION Gel.

Таблиця 1. Походження зразків *Ae. biuncialis* та кількість ампліконів з праймерами до гена *Pinb-1*

№ Національного каталогу України	Назва зразка	Походження	Кількість ампліконів
UA0400157	NK 1-1	Мис Март'ян	1
UA0400158	NK 4N2	Берегове, Бахчисарайський р-н	1
UA0400159	NK 6-2	Берегове, Бахчисарайський р-н	1
UA0400160	NK 10-3	Кара-Даг	1
UA0400161	NK 11-2	Кара-Даг	1
UA0400162	NK 13-1	Кара-Даг	1
UA0400163	NK 14-12	Кара-Даг	1
UA0400164	NK 50	Кара-Даг	1
UA0400165	NK B1-1	Піщане, Бахчисарайський р-н	1
UA0400166	NK MM2-1	Мис Март'ян	1
UA0400167	NK MM7-3	Мис Март'ян	1
UA0400168	NK MMB-2	Мис Март'ян	2
UA0400169	NK O2	Невідоме	1
UA0400170	NK O10	Кара-Даг	1
UA0400171	NK OZ-2	Аю-Даг	1
UA0400187	NK 4-1	Мис Март'ян	1
UA0400188	NK 24a-4	Ечки-Даг	1
UA0400189	NK B1-2	Піщане, Бахчисарайський р-н	1
UA0400190	NK 23a-2	Ечки-Даг	1
UA0400191	NK OZ-1	Аю-Даг	1
UA0400192	NK 13-2-1	Кара-Даг	2
UA0400193	NK 12-5	Кара-Даг	2
UA0400194	NK BS2-3	Мис Март'ян	1
UA0400195	NK B3-1	Піщане, Бахчисарайський р-н	1

Нуклеотидні послідовності генів пуроіндолінів *Ae. umbellulata* та *Ae. comosa* відбирали з бази даних GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)). Послідовності вирівнювали за допомогою програми MEGA (Kumar et al, 2018).

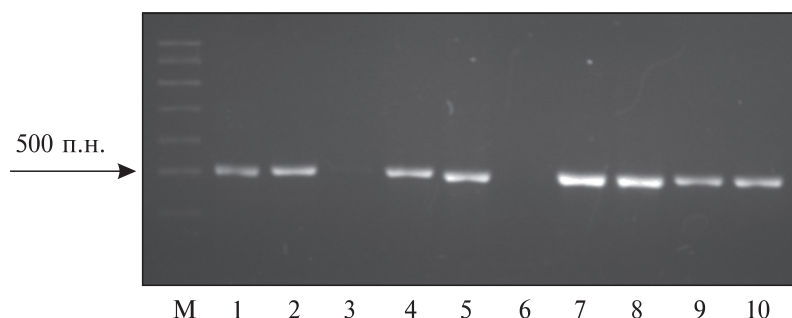
**Результати.** Для ампліфікації повної послідовності гена, що кодує пуроіндолін а, було застосовано пару праймерів *Pina* (Massa and Morris, 2006). Ця пара праймерів давала лише один продукт ампліфікації у зразків *Ae. biuncialis*, *Ae. cylindrica*, *Thinopyrum*, *T. aestivum*, *D. villosum* (рис. 1). Продуктів ампліфікації з даними праймерами не одержано у *T. durum*. Амплікони з праймерами *Pina* у *Ae. biuncialis* мають дещо більшу довжину, ніж відповідні продукти ампліфікації у пшениці м'якої, *D. villosum*, *Ae. cylindrica*. Видимих на агарозному електрофорезі відмінностей за довжиною ампліконів у зразків *Ae. biuncialis* не виявлено: їх ПЛР-продукти мали довжину 500 п.н.

У результаті ПЛР із застосуванням ген-специфічного праймера *Pinb* (Massa et al, 2004)

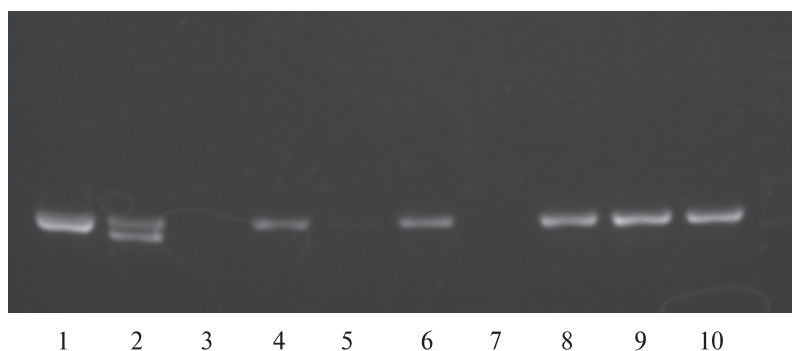
до гена, що кодує пуроіндолін b, одержали один продукт ампліфікації з довжиною біля 520 п.н, у зразків пирію, *T. aestivum*, *Ae. cylindrica* та тритикале а у *T. durum* не одержано ампліконів (рис. 2). У зразків *Ae. biuncialis* спостерігали поліморфізм за кількістю ампліконів: два продукти ампліфікації з довжиною біля 520 і 500 п.н., або один завдовжки біля 520 п.н.

Було проаналізовано продукти ампліфікації з парою праймерів *Pinb* у колекції зразків *Ae. biuncialis*, що походять, переважно, з Кримського півострова (рис. 3).

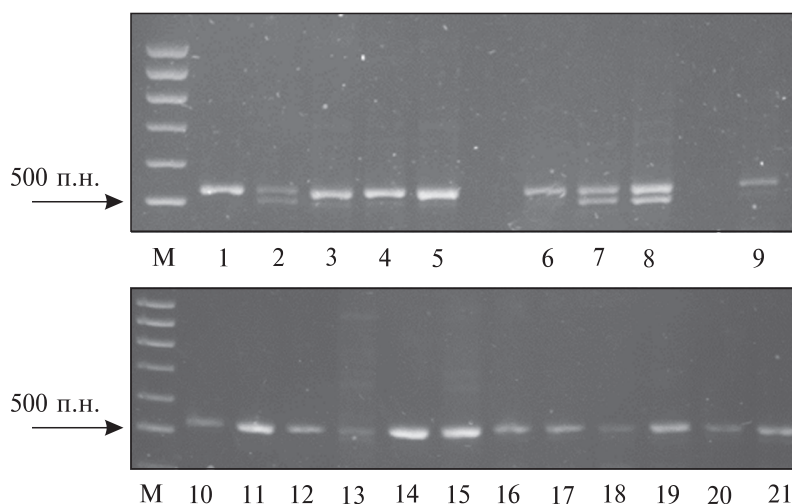
По два амплікони завдовжки біля 520 і 500 п.н. виявлено у зразків NK 13-2-1, NK 12-5 та NK MMB-2. Решта зразків мали один амплікон завдовжки біля 520 п.н. (рис. 3). Частота зразків з двома ампліконами на електрофореграмі становила в даній колекції 12,5 %. Ці зразки походять зі східної частини ареалу виду на Кримському півострові, а саме із заповідника Кара-Даг (NK 13-2-1, NK 12-5), та з південної частини ареалу виду (Мис Март'ян) (NK



**Рис. 1.** Продукти ампліфікації з ген-специфічними праймерами *Pina*: М – маркер довжин 100 bp DNA ladder; 1 – *Thinopyrum*; 2 – *Ae. biuncialis* NK 13-2; 3 – *T. durum* сорт Ізольда; 4 – *Ae. biuncialis* NK В1-1; 5 – *D. villosum*; 6 – тритикале сорт Волемир; 7 – *T. aestivum* сорт Білява; 8 – *T. aestivum* сорт Істра 1; 9 – *Ae. cylindrica*; 10 – *T. aestivum* сорт Антонівка



**Рис. 2.** Електрофореграма продуктів ПЛР з ген-специфічними праймерами *Pinb*: 1 – *Thinopyrum*; 2 – *Ae. biuncialis* NK 13-2; 3, 7 – *T. durum* сорт Ізольда; 4 – *Ae. biuncialis* NK В1-1; 5 – *D. villosum*; 6 – тритикале сорт Волемир; 8 – *Ae. cylindrica*; 9 – *T. aestivum* сорт Антонівка; 10 – *T. aestivum* сорт Білява



**Рис. 3.** Продукти ампліфікації зразків *Ae. biuncialis* з ген-специфічними праймерами *Pinb*: М – маркер довжин 100 bp DNA ladder; 1, 13 – NK 13-1; 2 – NK ММВ-2; 3 – NK 4-1; 4 – NK 24а-4; 5 – NK В1-2; 6 – NK ОZ-1; 7 – NK 13-2-1; 8 – NK 12-5; 9 – NK В3-1; 10 – NK 4N2; 11 – NK 6-2; 12 – NK О2; 14 – NK ММ7-3; 15 – NK В1-1; 16 – NK 1-1; 17 – NK 14-12; 18 – NK 50; 19 – NK ОZ-2; 20 – NK 10-3; 21 – NK 11-2

ММВ-2). Отже, у східній частині ареалу виду на Кримському півострові частота зразків з двома ампліконами — 20 %, а у південній — 17 %. Серед досліджених зразків із західної частини ареалу поліморфізму за числом ампліконів з використанням пари праймерів *Pinb* не виявлено.

**Обговорення.** *Ae. biuncialis* є тетраплоїдним видом (UUMM), геном U якого походить від *Ae. umbellulata* (UU), а геном M є спорідненим з геномом M *Ae. comosa* (MM) (van Slageren, 1994). Відповідно, цей вид має гени пуроіндолінів на хромосомах 5U і 5M. Очевидно, у зразків NK 13-2-1, NK 12-5, NK ММВ-2 амплікони генів *Pinb-UI* і *Pinb-MI* мають різну довжину, тоді як у решти зразків колекції — однакову, або, менш ймовірно, ампліфікується один ген.

Пошук у базі даних GenBank не виявив задепонованих послідовностей гена пуроіндоліну b *Ae. biuncialis*. У базі даних знаходяться послідовності *Pinb-UI* *Ae. umbellulata* з довжиною кодуєчої послідовності 450 п.н. (чотири послідовності), 449 п.н. (1), 448 (2), 447 (9) і одна завдовжки 414 п.н. (табл. 2). Для *Ae. comosa* наявні послідовності *Pinb-MI* завдовжки 450 п.н. (12) і одна завдовжки 426 п.н. (JX648341.1) (табл. 2).

У дослідженні Cuesta et al (2013) предкових диплоїдних видів *Ae. umbellulata* та *Ae. comosa* ідентифіковано чотири і три алелі, відповідно, для гена *Pina-1*, проте не виявлено поліморфізму довжини гена *Pina-1*: обидва види мали однакову довжину кодуєчої послідовності пуроіндолінового гена — 447 п.н. При аналізі колекції 56 зразків *Ae. umbellulata* Okada et al (2018) виявили сім алелів *Pina-1* (з них п'ять нових), але серед них також не було алелів, що відрізняються за довжиною. Тому в *Ae. biuncialis* спостерігається лише один фрагмент з праймерами до *Pina-1* на електрофореграмі (рис. 1), який, очевидно, складається з двох ампліконів однакової довжини, що відповідають генам *Pina-UI* і *Pina-M<sup>1</sup>*.

Водночас Cuesta et al (2013) при аналізі колекції зразків *Ae. umbellulata* та *Ae. comosa* виявили поліморфізм за довжиною гена пуроіндоліна b. Довжина кодуєчої послідовності гена *Pinb-UI* у *Ae. umbellulata* становить 447 (у двох алелів) і 450 п.н. (у одного), а довжина кодуєчої послідовності гена *Pinb-MI* у *Ae.*

*comosa* — 450 (у чотирьох алелів) і 426 п.н. (у одного алеля — *Pinb-MI-III*). Алель *Pinb-MI-III*, що кодує коротший варіант гена, має делецію у N-кінцевому домені завдовжки 21 п.н., що приводить до втрати семи амінокислот у пуроіндоліні b. Частота такого алеля була невисокою (8,3%) — серед 18 проаналізованих зразків ідентифіковано один грецький зразок *Ae. comosa* з таким алелем, ще один грецький зразок був гетерогенним за цим алелем (Cuesta et al, 2013). Okada et al (2018) виявили алель *m Pinb-UI* у грецького зразка *Ae. umbellulata* KU-12190, послідовність якого має довжину 414 нуклеотидів (задепоновано під номером LC375790.1 в GenBank).

Відмінності між довжинами ампліконів зразків NK 13-2-1, NK 12-5, NK ММВ-2 складають біля 20 п.н. Очевидно, амплікон завдовжки біля 520 п.н. (рис. 3) відповідає гену *Pinb-UI*, а амплікон завдовжки 500 п.н. — гену *Pinb-M<sup>1</sup>*. Не виключено, що відносно рідкісний варіант гена *Pinb-M<sup>1</sup>* у цих трьох зразків є подібним до рідкісного алеля *Pinb-MI-III* *Ae. comosa*. Дослідження нуклеотидної послідовності такого алеля у *Ae. biuncialis* може бути важливим для вивчення еволюції цього виду. Крім того нові

Таблиця 2. Довжини послідовностей гена *Pinb-1* у базі GenBank

№ у GenBank	Довжина, п.н.	№ у GenBank	Довжина, п.н.
<i>Ae. umbellulata</i>		<i>Ae. comosa</i>	
JX648364.1	450	JX648343.1	450
JX648363.1	450	JX648342.1	450
JX648362.1	450	JX648340.1	450
JX648361.1	450	JX648339.1	450
LC375789.1	449	JX648338.1	450
LC375788.1	448	FJ898239.1	450
LC375787.1	448	FJ898238.1	450
JX648366.1	447	FJ898237.1	450
JX648365.1	447	FJ898234.1	450
LC375786.1	447	DQ269882.1	450
LC375785.1	447	DQ269881.1	450
LC375784.1	447	DQ269880.1	450
LC375783.1	447	<b>JX648341.1</b>	<b>426</b>
LC375782.1	447		
LC375781.1	447		
DQ269883.1	447		
LC375790.1	414		

алельні варіанти пуринолінових генів можуть бути використані для збільшення різноманітності пшениці за ознакою твердозерності та отримання генотипів пшениці з новими властивостями через міжвидову гібридизацію (Okada et al, 2020) або генетичну трансформацію (Xiaoling et al, 2020).

Вважається, що серед диких видів Triticaceae переважає м'яка текстура зерна. Наприклад, при аналізі зразків різних видів егілопсів – *Ae. longissima*, *Ae. sharonensis*, *Ae. bicornis* з геномом S, *Ae. kotschyi* (UUSS), *Ae. triuncialis* (UUCS), *Ae. juvenalis* (DDMMUU) Chen et al (2005) виявили, що м'якозерну текстуру зерна мали всі, крім зразка *Ae. sharonensis* Q03–026. У дослідженні Okada et al (2018) несподівано виявлено високий рівень твердозерності у зразків *Ae. umbellulata* та амфідиплоїдів з участю твердої пшениці сорту Langdon та *Ae. umbellulata* (>70). Це свідчить про значний рівень різноманітності за ефектами пуринолінових генів у егілопсів та їх високий потенціал для збагачення генофонду м'якої пшениці.

Таким чином, у *Ae. biuncialis* виявлено поліморфізм за кількістю ампліконів з ген-специфічними праймерами до гена пуриноліну b: спостерігали один (завдовжки біля 520 п.н.) або два продукти ампліфікації (біля 520 і 500 п.н.). Частота зразків з двома ампліконами становила 12,5 % у колекції зразків *Ae. biuncialis*, що походять з Кримського півострова, і такі зразки зустрічались у Східній та Південній частинах ареалу виду. Ймовірно, амплікон завдовжки 500 п.н. відповідає гену *Pinb-M<sup>b</sup>1*, і цей алель може бути подібним до рідкісного алеля *Pinb-M1-III* *Ae. comosa*.

**Дотримання етичних стандартів.** Ця стаття не містить будь-яких досліджень за участю людей і тварин в якості об'єктів дослідження.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Робота фінансувалась за темою № ДР 0123U100962.

#### POLYMORPHISM OF THE *PINB-1* GENE LENGTH IN *AEGILOPS BIUNCIALIS* VIS.

O.I. Sozinova, N.O. Kozub, Ya.B. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics,  
NAS of Ukraine,  
Baidy-Vyshnevetskogo str., 2a, Kyiv, 04123, Ukraine

Institute of Plant Protection, NAAS,  
Vasylkivska str., 33, Kyiv, 03022, Ukraine

E-mail: \*natalkozub@gmail.com, sozinovaoksana1@gmail.com, cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

Puroindolines (puroindoline a and puroindoline b) determine the texture of the wheat grain, which affects milling properties of the grain and water absorption properties of the flour. The level of common wheat hardness is controlled by the allelic composition at the *Ha* locus on the short arm of chromosome 5D, which contains closely linked *Pina-D1* and *Pinb-D1* genes. *Aegilops* species can be a source of novel variants of puroindoline genes for enriching the wheat gene pool. Among them is the tetraploid species *Ae. biuncialis* Vis. (UUMM). In our study, the polymorphism of puroindoline gene length was analyzed in *Ae. biuncialis* using PCR amplification with gene-specific primers. We analyzed a collection of *Ae. biuncialis* accessions originating from the Crimean Peninsula. Polymorphism with respect to the number of amplicons produced with gene-specific primers to the puroindoline b gene was revealed: there were one (about 520 bp) or two amplification products (about 520 and 500 bp). The frequency of accessions with two amplicons in the collection was 12.5 %. Samples with two amplicons were found in the Eastern and Southern parts of the area of the species on the Crimean Peninsula. Probably, in the *Ae. biuncialis* accessions with two amplicons, the fragment of about 520 bp corresponds to the *Pinb-U1* gene; the 500-bp fragment, to the *Pinb-M1* gene, and this allele may be similar to the rare *Pinb-M1-III* allele of *Ae. comosa*.

#### REFERENCES

- Chantret N, Salse J, Sabot F et al (2005) Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*). *Plant Cell* 17(4):1033–1045. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.029181>.
- Chen M, Wilkinson M, Tosi P et al (2005) Novel puroindoline and grain softness protein alleles in *Aegilops* species with the C, D, S, M and U genomes. *Theor Appl Genet* 111(6):1159–1166. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0047-7>.
- Cuesta S, Guzmán C, Alvarez JB (2013) Allelic diversity and molecular characterization of puroindoline genes in five diploid species of the *Aegilops* genus. *J Exp Bot* 64(16):5133–5143. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert299>.
- Dulai S, Molnár I, Szopky D et al (2014) Wheat-*Aegilops biuncialis* amphiploids have efficient photosynthesis and biomass production during osmotic stress. *J Plant Physiol* 171:509–517. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.11.015>.

- Farkas A, Molnár I, Dulai S et al (2014) Increased micronutrient content (Zn, Mn) in the 3Mb(4B) wheat – *Aegilops biuncialis* substitution and 3Mb.4BS translocation identified by GISH and FISH. *Genome* 57:61–67. <https://doi.org/10.1139/gen-2013-0204>.
- Gautier MF, Aleman ME, Guirao A et al (1994) *Triticum aestivum* puroindolines, two basic cysteine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant Mol Biol* 25: 43–57. <https://doi.org/10.1007/BF00024197>.
- Ivanizs L, Marcotuli I, Rakszegi M et al (2022) Identification of new QTLs for dietary fiber content in *Aegilops biuncialis*. *Int J Mol Sci* 23(7):3821. <https://doi.org/10.3390/ijms23073821>.
- Kozub NA, Sozinov IA, Xynias IN et al (2011) Allelic variation at high-molecular-weight glutenin subunit loci in *Aegilops biuncialis* Vis. *Russ J Genet* 47(9):1078–1083. <https://doi.org/10.1134/S1022795411090092>.
- Kozub NA, Sozinov IA, Sozinov AA (2012) Identification of alleles at the gliadin loci *Gli-U1* and *Gli-M<sup>b</sup>1* in *Aegilops biuncialis* Vis. *Russ J Genet* 48(4):390–395. <https://doi.org/10.1134/S1022795412030052>.
- Kumar S, Stecher G, Li M et al (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Kumar A, Kapoor P, Chunduri V et al (2019) Potential of *Aegilops* sp. for improvement of grain processing and nutritional quality in wheat (*Triticum aestivum*). *Front Plant Sci* 10:308. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00308>.
- Massa A, Morris CF (2006) Molecular evolution of the puroindoline-a, puroindoline-b, and grain softness protein-1 genes in the tribe *Triticeae*. *J Mol Evol* 63(4):526–536. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp076>.
- Massa A, Morris CF, Gill BS (2004) Sequence diversity of Puroindoline-a, Puroindoline-b, and the grain softness protein genes in *Aegilops tauschii* Coss. *Crop Sci* 44(5):1808–1816. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1808>.
- Molnár I, Gaspar L, Savari E et al (2004) Physiological and morphological responses to water stress in *Aegilops biuncialis* and *Triticum aestivum* genotypes with differing tolerance to drought. *Funct Plant Biol* 31:1149–1159. <https://doi.org/10.1071/FP03143>.
- Monte JV, De Nova PJG, Soler C (2001) AFLP-based analysis to study genetic variability and relationships in the Spanish species of the genus *Aegilops*. *Hereditas* 135:233–238. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2001.00233.x>.
- Morris CF (2002) Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant Mol Biol* 48(5–6): 633–647. <https://doi.org/10.1023/a:1014837431178>.
- Morris CF (2019) The antimicrobial properties of the puroindolines, a review. *World J Microbiol Biotechnol* 35(6):86. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2655-4>.
- Morris CF, Luna J, Caffè-Treml M (2021). The Vro-mindolines of cv. Hayden oat (*Avena sativa* L.) – A review of the Poaceae and Triticeae indolines and a suggested system for harmonization of nomenclature. *J Cereal Sci* 97:103135. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103135>.
- Okada M, Ikeda TM, Yoshida K et al (2018) Effect of the U genome on grain hardness in nascent synthetic hexaploids derived from interspecific hybrids between durum wheat and *Aegilops umbellulata*. *J Cereal Sci* 83:153–161. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.08.011>.
- Okada M, Michikawa A, Yoshida K et al (2020) Phenotypic effects of the U-genome variation in nascent synthetic hexaploids derived from interspecific crosses between durum wheat and its diploid relative *Aegilops umbellulata*. *PLoS One* 15(4):0231129. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231129>.
- Okuno K, Ebana K, Noov B et al (1998) Genetic diversity and Central Asian and north Caucasian *Aegilops* species as revealed by RAPD markers. *Genet Res Crop Evol* 45:389–394. <https://doi.org/10.1023/A:1008660001263>.
- Pauly A, Pareyt B, Fierens E et al (2013) Wheat (*Triticum aestivum* L. and *T. turgidum* L. ssp. *durum*) kernel hardness: I. Current view on the role of puroindolines and polar lipids. *Comp. Rev Food Sci Food Saf* 12:413–426. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12018>.
- Rabokon A, Demkovich A, Sozinov A et al (2019) Intron length polymorphism of  $\beta$ -tubulin genes of *Aegilops biuncialis* Vis. *Cell Biol Int* 43(9):1031–1039. <https://doi.org/10.1002/cbin.10886>.
- Rakszegi M, Molnár I, Lovegrove A et al (2017) Addition of *Aegilops* U and M chromosomes affects protein and dietary fiber content of wholemeal wheat flour. *Front Plant Sci* 8:1529. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01529>.
- Shewry P (2022) Wheat grain proteins: past, present and future. *Cereal Chem* 100(1):9–22. <https://doi.org/10.1002/cche.10585>.
- Tan F, Zhou J, Yang Z et al (2009) Characterization of a new synthetic wheat – *Aegilops biuncialis* partial amphiploid. *Afr J Biotech* 8(14):3215–3218. <https://doi.org/10.5897/AJB09.359>.
- Turnbull KM, Turner M, Mukai Y et al (2003) The organization of genes tightly linked to the *Ha* locus in *Aegilops tauschii*, the D-genome donor to wheat.

- Genome 46(2):330–338. <https://doi.org/10.1139/g02-124>.
- van Slageren MW (1994) Wild Wheats: a Monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. & Spach) Eig (Poaceae). Wageningen: Agricultural University Papers.
- Xiaoling M, Xue H, Sun J et al (2020) Transformation of *Pinb-D1x* to soft wheat produces hard wheat kernel texture. J Cereal Sci 91:102889. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102889>.
- Zhou JP, Yao CH, Yang EN et al (2014) Characterization of a new wheat-*Aegilops biuncialis* addition line conferring quality-associated HMW glutenin subunits. Genet Mol Res 13(1):660–669. <https://doi.org/10.4238/2014.January.28.11>.
- Zhou JP, Cheng Y, Zang LL et al (2016) Characterization of a new wheat-*Aegilops biuncialis* 1M<sup>b</sup>(1B) substitution line with good quality-associated HMW glutenin subunit Cereal Res Commun 44(2):198–205. <https://doi.org/10.1556/0806.43.2015.048>.

Надійшла в редакцію 10.02.23  
Після доопрацювання 03.04.23  
Прийнята до друку 18.07.23