

ПЕТРОВА І.В.<sup>1</sup>, ЧЕБОТАР С.В.<sup>1</sup>, РИБАЛКА О.І.<sup>2</sup>, СИВОЛАП Ю.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН*

*Україна, 65036, Одеса, Овідіопольська дорога, 3, (0482) 395-557, genote2006@mail.ru*

<sup>2</sup>*Селекційно-генетичний інститут - Національний центр насіннезнавства та сортовивчення  
УААН, Україна, 65036, Одеса, Овідіопольська дорога, 3*

## **SSR-АНАЛІЗ СЕЛЕКЦІЙНИХ ФОРМ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ З НУЛЬОВИМ ВМІСТОМ АМІЛОЗИ У КРОХМАЛІ**

**Вступ.** Важливим фактором прискорення селекційного процесу є впровадження новітніх технологій з використанням досягнень в галузі молекулярної генетики рослин.

Робота селекційно-дослідних центрів спрямована на селекцію сортів озимої м'якої пшениці з поліпшеними якісними та технологічними показниками зерна. Окрім генетичного контролю запасних білків, які впливають на хлібопекарські властивості, особлива увага приділяється також генам, що кодують синтез амілози в пшеничному крохмалі [1, 2].

Крохмаль становить близько 70 % зерна м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.). До складу крохмалю входять два глікополімери: амілоза (20 – 30 %) та амілопектин (70 -80 %), співвідношення яких істотно впливає на технологічні якості борошна [6, 7].

Низький вміст амілози обумовлюється рецесивними алелями *Wx*-генів, що кодують фермент, який контролює синтез амілози (GBSS1).

Впровадження у виробництво сортів м'якої пшениці, зерно яких має низький або нульовий вміст амілози, відкриває широкі перспективи для покращання якості продукції з замороженого та шарованого тіста, виробництва біоетанолу [12].

З 2000 р. в СГП розгорнуто селекційну програму зі створення сортів пшениці з частково або повністю блокованим синтезом амілози у крохмалі, з залученням цінного генетичного матеріалу закордонної селекції та вітчизняних високопродуктивних сортів [1]. Однією з задач даної селекційної програми було створення високо продуктивного сорту озимої м'якої пшениці, з якісними характеристиками, залученого до схрещувань, сорту Куяльник та нульовим вмістом амілози у крохмалі, перенесеним від лінії *Wx*-12 (R. Graybosh: Nebraska, USA).

В межах цієї програми нами з використанням молекулярних маркерів до *Wx*-генів, добрані селекційні форми з нульовим вмістом амілози у крохмалі [3].

Метою даної роботи був мікросателітний аналіз генотипів з нульовим вмістом амілози у крохмалі для добору з них таких форм, що максимально генетично подібні до вихідної материнської форми сорту Куяльник.

**Матеріали і методи.** Виділення ДНК з сухого зерна проводили згідно стандартної методики [4], за допомогою лізуючого буферу наступного складу: 0,1 М EDTA, 0,1 М тріс-НCl рН 8,5, 0,1 М NaCl, 1 % SDS, 0,1 % Тритон Х-100. Депротеїнізацію здійснювали сумішшю хлороформ : ізопентанол (24 : 1). ДНК розчиняли до концентрації 20 нг/мкл для застосування в ПЛР.

Для проведення SSR-аналізу використовували пари праймерів до мікросателітних локусів: *Xgwm 18* (1B), *Xgwm 382* (2A), *Xgwm 261* (2D), *Xgwm 155* (3A), *Xgwm 389* (3B), *Xgwm 186* (5A), *Xgwm 179* (5A), *Xgwm 156* (5A), *Xgwm 304* (5A), *Xgwm 595* (5A), *Xgwm 408* (5B), *Xgwm 499* (5B), *Xgwm 443* (5B), *Xgwm 190* (5D), *Xgwm 577* (7B), *Xgwm 437* (7D). ПЛР виконували згідно рекомендацій [8].

Продукти ПЛР-аналізу фракціонували у 10 % денатуруючому поліакриламідному гелі розміром 20×20 в 1×TBE-буфері.

Продукти ампліфікації після електрофоретичного розділення в поліакриламідних гелях забарвлювали сріблом згідно рекомендацій Silver sequence TMDNA sequencing System Technical Manual (Promega) [11].

За даними спектрів електрофоретичного розподілення продуктів ампліфікації ДНК було складено матрицю, де наявність у селекційних форм фрагменту ампліфікації характерного для сорту Куяльник позначали – 1, для *Wx*-лінії – 0.

Для встановлення генетичних дистанцій за даними з поліморфізму продуктів ампліфікації мікросателітних локусів використовували алгоритм Нея і Лі [9]. Кластерний аналіз генетичних дистанцій здійснювали методом UPGMA [10]. Для побудови дендрограми використовували програму „TREES”[5].

**Результати та обговорення.** За результатами проведеного аналізу встановлені алельні характеристики батьківських та селекційних форм з блокованим синтезом амілози (*Wx-A1b*, *Wx-B1b*, *Wx-D1b*) за 16 мікросателітними локусами. Алельний склад досліджених генотипів за SSR - локусами наведено у табл. 1.

У всіх досліджених селекційних форм були детектовані фрагменти ампліфікації характерні для батьківської форми (лінія *Wx*-12) за локусами *Xgwm 18* (192 п.н.), *Xgwm 261*

(165 п.н.), *Xgwm 179* (180 п.н.), *Xgwm 443* (133 п.н.). За локусами *Xgwm 389* (117 п.н), *Xgwm 408* (180 п.н) виявлені алелі з молекулярною вагою фрагментів ампліфікації, властивих материнській формі, сорту Куяльник. За локусом *Xgwm 186* алель розміром 113 п.н. характерний сорту Куяльник мали селекційні форми 180/2, 180/3, 170/1, 170/3. Мікросателітні локуси *Xgwm 437* (131 п.н.), *Xgwm 304* (203 п.н.) відрізнялися тим, що алелі характерні материнській формі зустрічалися лише у генотипах 180/2 та 234/1, відповідно. За локусами *Xgwm 595* (312 п.н.) та *Xgwm 382* (80 п.н.) спостерігалась наявність фрагментів ампліфікації властивих сорту Куяльник у генотипів 180/2, 180/3, та 65/1, 65/2. За локусом *Xgwm 577* алель з молекулярною вагою 152 п.н. був детектований у селекційних форм 234/1, 234/2, 234/3. Генотипи 65/2, 180/2, 180/3 за локусом *Xgwm 499* мали алель 160 п.н. За локусом *Xgwm 190* лише генотипи 180/2, 180/3, 234/3 мали алель 216 п.н. властивий лінії Wx-12. За локусом *Xgwm 156* у всіх генотипів крім 234/1, 234/2, 234/3 був детектований алель з молекулярною вагою фрагменту ампліфікації 230 п.н. характерний для сорту Куяльник. Таким чином з проаналізованих 10 селекційних форм ми відібрали найбільш генетично подібні до сорту Куяльник.

На основі розрахованих генетичних дистанцій та кластерного за допомогою програми „TREES” побудовано дендрограму.

На представленій дендрограмі (рис.1.) генотипи розподілені у два кластери, в межах яких відбувається розподілення на субкластери. Найбільша генетична дистанція спостерігається між батьківськими формами, сортом Куяльник та лінією Wx – 12 яка становить 0,956. Селекційні форми 65/1 та 65/2 за результатами МС – аналізу мають спільні алелі з сортом Куяльник за 6 та 7 МС локусами, відповідно. Селекційні форми під номерами 180/2 та 180/3 мають спільні алелі з материнською формою за 7 та 8 МС локусами. Дані генотипи складають перший субкласстер, генетична дистанція якого по відношенню до сорту Куяльник становить 0,319. Генотипи 170/1, 170/3 мають спільні алелі за 5 локусами з сортом Куяльник та формують підгрупу у другому субкластері. До цієї підгрупи входить також генотип під номером 170/2 (спільні алелі за 4 локусами). Генотипи 234/1, 234/2, 234/3 становили окрему групу в другому субкластері. Генетичних дистанцій зразків 234/1 та 234/2 виявились майже ідентичними (0,001). Між ними та генотипом 234/3 генетичні дистанції дорівнювали 0,111. Таким чином, генетична дистанція другого субкластеру, який об'єднав селекційні форми 170/1, 170/3, 170/2, 234/1, 234/2, 234/3, по відношенню до материнської форми (сорт Куяльник) становила 0,454.

**Висновки.** Проведений МС-аналіз селекційних форм носіїв трьох нуль-алелів за Wx-генами (*Wx-A1b*, *Wx-B1b*, *Wx-D1b*), добраних з популяції F<sub>5</sub>, отриманої від схрещування сорту Куяльник з лінією Wx-12, показав, що генотипи 65/1, 65/2, 180/2, 180/3 є найбільш генетично наближеними до сорту Куяльник. Таким чином, ці селекційні форми можуть бути запропоновані як вихідний селекційний матеріал для створення високо продуктивного сорту м'якої пшениці з блокованим синтезом амілози у крохмалі.

## Література

1. Рибалка О.І., Червоніс М.В., Топораши І.Г. Пшениця ваксі з унікальними властивостями крохмалю: можливі напрямки її використання // Зберігання та переробка зерна. - 2005. - Т. 7- № 73. - С. 24-28.

2. Петрова І.В., Чеботарь С.В., Рыбалка А.И., Сиволап Ю.М. Идентификация Wx генотипов среди сортов озимой мягкой пшеницы // Цитология и генетика. – 2007. –Т. 41, № 6. - С. 11-17

3. Петрова І.В., Чеботарь С.В., Рыбалка А.И., Сиволап Ю.М. Контроль Wx генов в процессе селекции при создании форм мягкой пшеницы с нулевым и низким содержанием амилозы. // 36. наук. праць.”Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології”. 2007. – Т. 1. - С. 162-164.

4. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях (научное руководство) // Под. ред. Ю.М. Сиволапа. - Киев: Аграрная наука, 1998.-156 с.

5. Календарь Р.Н. Компьютерная программа для построения эволюционных деревьев на основе электрофореграмм ДНК и белков. // Материалы конференции « Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений». Киев. – 1994. – С. 25-26.

6. Nakamura T., Vrinten P., Saito M., Konda M. Rapid classification of partial waxy wheats using PCR-based markers // Genome. – 2002. - V. 45 – P. 1150-1156.

7. McLauchlan A., Ogbonnaya F.C., Hollingsworth B. et.al. Development of robust PCR-based DNA markers for each homoeo-allele of granule-bound starch synthase and application in wheat breeding programs // Aust.J.Agric.Res. - 2001. – V. 52 – P.1409-1416.

8. Röder M.S., Korsun V., Wendehake K., Plaschke J., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat // Genetics. – 1998. – V. 49. – 2007-2023.

9. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetics variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1979. - V. 76. – P.5269-5273.

10. Sneath P. H., Socal R.R. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. – San Francisco: W.H. Freeman, 1973.

11. GenePrint STR Systems (Silver Stain Detection). Technical Manual. - 2001.- № D004. – P. 1-47.

**Резюме.** За допомогою мікросателітного аналізу селекційних форм з блокуванням синтезом амілози генотипи: 65/1, 65/2, 180/2, 180/3, що найбільш генетично наближені до сорту Куяльник (генетичні дистанції 0,319).

**Резюме.** С помощью проведенного микросателлитного анализа селекционных форм с заблокированным синтезом амилозы выявлены генотипы: 65/1, 65/2, 180/2, 180/3, которые наиболее генетически приближены к сорту Куяльник (генетические дистанции 0,319).

**Abstracts.** Microsatellite analysis of breeding forms with blocked synthesis of amylose have shown that genotypes: 65/1, 65/2, 180/2, 180/3 are genetically very close (genetic distances 0,319) to variety Kuyalnik.