УДК 577:2:633.11:575

С. В. ЧЕБОТАР[1,2], д. б. н., член-кор. НААН, пров. наук. співроб., зав. каф.,
О. М. БЛАГОДАРОВА[1], наук. співроб.,
Н. О. КОЗУБ[3], к. б. н., зав. лаб.,
І. О. СОЗІНОВ[3], ст. наук. співроб.
[1]СГІ — НЦНС, Одеса,
[2]ОНУ ім. І. І. Мечникова, Одеса
[3]ІЗР НААН, Київ
e-mail: s.v.chebotar@gmail.com

ПЛР-АНАЛІЗ ПОЛІМОРФІЗМУ ЛОКУСІВ, ЩО ВПЛИВАЮТЬ НА ЯКІСТЬ ЗЕРНА ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ (*Triticum aestivum* L.)

У Південному біотехнологічному центрі в рослинництві НААН (ПБЦ) у період 2002–2012 рр. досліджували молекулярно-генетичний поліморфізм у локусах Gli-A1, Gli-B1, Gli-D1 і Glu-A3, за генами пуроіндолінів Pina-D1 та Pinb-D1, що контролюють ознаку «твердозерність», а також за генами Wx, які зумовлюють вміст амілози в крохмалі ендосперму зерна пшениці м'якої, із застосуванням ПЛР-аналізу. Зіставлено результати визначеного генетичного поліморфізму методом ПЛР з алель-специфічними праймерами до локусів γ-гліадинів, з даними, отриманими електрофорезом запасних білків зерна пшениці. Рівень визначеного ПЛР поліморфізму був нижчий від виявленого електрофорезом запасних білків. ПЛР-аналізом генів Pina-D1 та Pinb-D1 у більшості досліджених українських сортів пшениці були детектовані алелі, характерні для твердозерних сортів, лише три сорти мали алелі, що властиві м'якозерним пшеницям. Серед досліджених українських пшениць-носіїв нуль-алелів за Wx-генами не виявлено.

Ключові слова: *пшениця м'яка, ПЛР-аналіз, локуси Gli-A1, Gli-B1, Gli-D1 і Glu-A3, гени Pina-D1 та Pinb-D1, Wx-гени.*

Вступ. У зв'язку з розробкою у відомих наукових центрах світу нових методів дослідження генетичного поліморфізму, зокрема за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), яка дозволяє виявляти зміни в нуклеотидній послідовності генів, що викликані мутаціями, або відстежувати зчеплене успадковування алелів генетичних локусів, що косегрегують з генами, які визначають прояв господарсько цінних ознак сільськогосподарських культур, у Південному біотехнологічному центрі в рослинництві НААН (ПБЦ) на початку 2000-х років Ю. М. Сиволапом та С. В. Чеботар були ініційовані дослідження локусів геному пшениці м'якої, що впливають на якість зерна. Зокрема: 1) спільно з аспіранткою А. М. Поліщук проведено молекулярно-генетичний аналіз сортів та майжеізогенних ліній

Gli- та *Glu-*локусів, а у дослідженнях з фахівцями відділу генетичних основ селекції СГІ н. с. О. М. Благодаровою і завідувачкою лабораторії екологічної генетики і біотехнології к. б. н. Н. О. Козуб та с. н. с. І. О. Созіновим з Інституту захисту рослин НААН зіставлено визначені алелі *Gli-* та *Glu-*локусів за ПЛР з алельними варіантами блоків гліадинів, що спостерігаються за електрофорезом у ПААГ [1, 2]; 2) ідентифіковано алельний стан генів пуроіндолінів вітчизняних сортів пшениці м'якої та спільно із тодішнім завідувачем лабораторії наукових досліджень інтелектуальної власності, маркетингу інновацій та сортовивчення к. с.-г. н. О. М. Хохловим проведено зіставлення з фізичними показниками твердозерності, визначеними за методом NIR [3, 4]; 3) з аспіранткою І. В. Петровою здійснено ПЛР-детекцію алелів *Wx*-генів у сортах та проведено добір селекційних ліній пшениці, що мають нуль-алелі за *Wx*-генами, спільно з завідувачем відділу генетичних основ селекції СГІ д. б. н. О. І. Рибалкою; оцінено ефекти впливу функціональних алелів за *Wx*-генами на вміст амілози в крохмалі зерна генотипів пшениці, що розрізняються за алелями вказаних генів у спільних дослідженнях з к. с.-г. н. О. М. Хохловим [5, 6].

Хлібопекарські властивості сортів пшениці визначаються фізичними властивостями клейковинного комплексу зерна, який складають білки: мономерні гліадини та високополімерні глютеніни. Генетичний контроль білків клейковини пшениці здійснюється мультиалельними *Glu-/Gli-*локусами, локалізованими в хромосомах гомеологічних груп 1 та 6, алелі кожного з яких вносять певний позитивний чи негативний вклад в ознаки технологічної та хлібопекарської якості борошна [7–10]. Слід звернути увагу, що значення глютенінів у формуванні хлібопекарських властивостей пшениці оцінюється науковцями (Paine et al. [11], О. М. Благодарова та ін. [9]) як визначальне. Але поліморфізм культурних сортів за локусами HMW (високомолекулярних) глютенінів досить низький. За даними [9], сорти України мають по три алелі локусів *Glu-A1* і *Glu-B1*, і, окрім 1–2 %, не відрізняються за локусом *Glu-D1*. У ПБЦ було розпочато дослідження з визначення алелів генів запасних білків за молекулярними маркерами. Ставилось завдання: вивчити, чи може ПЛР-аналіз генів запасних білків на рівні нуклеотидних послідовностей дати нову інформацію про різні алельні стани окремих генів з кластерів генів запасних білків. Проводилося порівняння і зіставляння систем класифікації алельних станів генів гліадинів та глютенінів за даними ДНК-маркерів та за даними електрофорезу білків [2].

Твердозерність/м'якозерність — також одна з найважливіших характеристик зерна пшениці, яка має стосунок до помелу зерна, замісу тіста та виготовлення хлібобулочних виробів. Борошно твердозерних пшениць *Triticum aestivum* L. використовують в хлібопекарській промисловості. М'якозерна пшениця *T. aestivum* L. більш підходить для виготовлення печива та бісквітів у кондитерській галузі [12].

локалізовані у *Ha (Hardness)* локусі на короткому плечі хромосоми 5D. Ці гени кодують три поліпептиди, з яких складається білок фріабілін: пуроіндоліни *a* (*Pina-D1*) і *b* (*Pinb-D1*) та *Grain Softnes Protein (GSP1)* [13,14].

Градація ознаки «твердозерність» зерна пшениці значною мірою зумовлена різноманітними сполученнями алелів пуроіндолінових генів *Pina-D1* та *Pinb-D1*. Дикий тип м'яких пшениць має м'яку текстуру ендосперму, це пов'язано з алелями *Pina-D1a* та *Pinb-D1a*. У твердозерних пшениць *T. aestivum* L. перший або другий пуроіндоліновий ген або обидва мають мутації, досить повна характеристика яких наведена у роботах [4, 15].

Коливання вмісту амілози з тенденцією до зниження (від 20 до 0 %) також суттєво впливає на технологічні якості крохмалю та борошна пшениці. Ключовим ферментом синтезу амілози у крохмальних гранулах є фермент *GBSS1 (granule-bound starch synthase)*, який ще називають Wx-протеїном (молекулярна маса 60 кДа). Wx-протеїни кодуються генами, що були ідентифіковані у пшениці [16] як *Wx-A1* (7AS), *Wx-B1* (4AL), *Wx-D1* (7DS). Як повідомлено І. В. Петровою із співавторами [5], зазначені гени мають функціональні і нефункціональні (нуль) алелі. Для локусу *Wx-A1* функціональними є алелі *Wx-A1a*, *Wx-A1c*, нефункціональним нуль-алель — *Wx-A1b*. Локус *Wx-B1 у Triticum aestivum* L. має *Wx-B1a*, *Wx-B1c*, *Wx-B1e*, *Wx-B1f* функціональні алелі та нефункціональний алель *Wx-B1b*. Локус *Wx-D1* відрізняється алельним складом від попередніх наявністю двох нуль-алелів — *Wx-D1b*, *Wx-D1e* та функціональних *Wx-D1a*, *Wx-D1c*, *Wx-D1d*, *Wx-D1f*. Всі три нуль-алелі не рівноцінні за впливом на вміст амілози в крохмалі. Найсуттєвіше зниження вмісту амілози, у порівнянні з дією нефункціональних алелів генів *Wx-A1* та *Wx-D1*, спричинює нуль-алель гена *Wx-B1*.

Метою нашої роботи було з'ясування генетичного поліморфізму за локусами *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* та *Glu-A3*, *Pina-D1*, *Pinb-D1* та *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* у вітчизняних сортів м'якої пшениці; зіставляння результатів визначення алелів за локусами *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* та *Glu-A3*, ідентифікованих за допомогою ПЛР та електрофорезу гліадинів у ПААГ.

У нашій роботі [2] підкреслено, що важливість ПЛР ідентифікації алелів запасних білків пов'язана: по-перше, зі складністю білкових спектрів, коли електрофореграми містять одночасно продукти експресії декількох локусів (7 для гліадинів, по 3 для LMW і HMW глютенінів), що робить перехід до їхньої ідентифікації в автоматичному режимі неможливим; по-друге, тільки так буде можливо ідентифікувати алелі, що розрізняються за кількістю копій генів; і, по-третє, можливо поліпептиди з однаковою рухливістю при їхньому поділі за масою (SDS-електрофорез) і за показником маса + заряд (кислий електрофорез) будуть все ж відрізнятися послідовністю нуклеотидів кодуючих їх генів.

Матеріали та методи. У роботі з вивчення генетичного поліморфізму генів запасних білків використано сорти м'якої пшениці: Лузанівка одеська, Зустріч одеська, Струмок, Одеська 267, Знахідка одеська, Любава одеська, Фантазія одеська, Прима одеська, Лада одеська, Застава одеська, Вікторія, Альбатрос одеський; шість майжеізогенних ліній м'якої пшениці, що були запропоновані та надані для дослідження к. б. н. Н. О. Козуб і с. н. с. І. О. Созіновим, зокрема лінії GLI-D1–5, GLI-B1–3, GLI-B1–4, GLI-A1–1, GLI-D1–4, GLI-B1–12, що відрізняються за певними алелями гліадинових локусів. Зазначені лінії створено д. б. н. М. М. Копусем [17] на основі сорту Безоста 1 в результаті шести бекросів та добору за гліадиновими маркерами. Донорами алельних варіантів локусів запасних білків при схрещуванні з сортом Безоста 1 (генетична формула *Gli-A1b Glu-B1b Glu-D1b*) є сорти Кримка місцева (алелі *Gli-D1j, Gli-A1m*), Левент (*Gli-B1o*), Zg2689/74 (*Gli-B1g*), Тріумф (*Gli-B1g*), Аврора (*Gli-B1l*). Також використано вихідний сорт Безоста 1 і сорт Одеська червоноколоса та лінію Б-16, яка несе транслокацію 1RS.1BL.

Зернівки досліджуваних сортів було поділено на дві частини. Та, що з зародком, використовувалась для пророщування і виділення ДНК, а друга — для електрофорезу запасних білків. ДНК виділяли відповідно методичним рекомендаціям [18]. Ампліфікацію проводили за допомогою алель-специфічних праймерів до алелів *GliA-1.1*, *GliA-1.2*, *GliB-1.1*, *GliB-1.2*, *GliD-1.1*, *GliD-1.2*, згідно Zhang et al. [19] та алель-специфічних праймерів *Glu-A3a*, *Glu-A3e*, *Glu-A3ac*, *Glu-A3d*, *Glu-A3f* і *Glu-A3g* [20]. Продукти ампліфікації розділяли в 8 % неденатуруючому ПААГ. Для візуалізації продуктів ампліфікації використовували забарвлення за допомогою $AgNO_3$ [21].

Електрофорез запасних білків виконувався науковим співробітником відділу генетичних основ селекції СГІ О. М. Благодаровою за методикою Ф. О. Поперелі [7]. Для аналізу брали по три зерна кожного сорту. Алелі гліадинів позначено за каталогом Е. В. Метаковського [22].

Для визначення алелів генів *Pina-D1* та *Pinb-D1* використовували: спрямовану ПЛР з праймерами до гена *Pina-D1* [23], які дозволяють тестувати *Pina-D1a* алель, та з парами праймерів алель-специфічними до *Pinb-D1a* та до *Pinb-D1b* алелів [24]. ПЛР виконували у 20 мкл реакційної суміші, яка містила 1x Hotstar буфер, 1x Hotstar Q розчин, 100 нг ДНК, 4 нмоль dNTP, по 10 пмоль прямого та зворотного праймерів, 1 U Hotstar *Taq* полімерази (Qiagen, Hilden, Німеччина). Використовували такі умови ампліфікації: первинна денатурація — 95 °C 5 хв, потім 35 циклів: 94 °C — 0,5 хв; 60 °C — 0,5 хв; 72 °C — 0,75 хв; заключна елонгація –72 °C — 7 хв. Продукти ПЛР розділяли у 2 % агарозному гелі, візуалізували із забарвленням бромистим етидієм за стандартною процедурою.

Відносні показники твердозерності у зерні сортів пшениці були визначені методом NIR (інфрачервоний коефіцієнт відбиття) на приладі Infrapid 61 (комп'ютеризована версія; Labor MIM, Угорщина), а також на приладі Спектран-119М (ЛОМО Фотоніка, Росія) як описано [4].

Аналізували 46 сортів та лінії Wx-15, Wx-12 за допомогою алель-специфічних праймерів до *Wx-A1a* [5, 6, 25], праймерів Wx98F1 і Wx98R1 до *Wx-B1* та праймерів WxD1b1F і WxD1b1R до локусу *Wx-D1* [26].

Проводили маркерний добір селекційних ліній з популяції F_5 від схрещування сорту Куяльник (носій *a*-алелів за трьома локусами *Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1*) та лінії Wx-12 (носій *b*-алелів за трьома локусами *Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1*) (популяція створена завідувачем відділу генетичних основ селекції СГІ д. б. н. О. І. Рибалкою) та здійснювали спектрофотометричне визначення вмісту амілози в крохмалі зерна відібраних ліній за допомогою спектрофотометру Cary win UV «Varian» (Австрія) за методикою, що наведена [28].

Результати та обговорення. За результатами ПЛР-аналізу з алель-специфічними праймерами, що розроблені Zhang et al. [19], як було показано в нашій роботі [2], досліджені сорти розділилися на 4 групи (табл. 1). Перша група — сорти з алелями *Gli-A1.1*, *Gli-B1.1*, *Gli-D1.2:* Лузанівка одеська, Зустріч одеська, Знахідка одеська, Любава одеська, Фантазія одеська, Альбатрос одеський. Друга група — сорти з *Gli-A1.1*, *Gli-B1.1*, *Gli-D1.1:* Одеська 267, Вікторія. Третя група — сорти з *Gli-A1.1*, *Gli-B1.2*, *Gli-D1.1:* Прима одеська і Застава одеська. Четверта група — сорти з *Gli-A1.2*, *Gli-B1.1*, *Gli-D1.2:* Струмок і Лада одеська. За локусом *Glu-A3* сорт Зустріч одеська мав алель *Glu-A3f*, Застава одеська — *Glu-A3a*, Струмок і Лада одеська — *Glu-A3d*, а інші сорти мали алель *Glu-A3c*.

За даними електрофорезу запасних білків, поліморфізм гліадинів у досліджуваних сортів був набагато більшим. Так, за локусом *Gli-A1* виявлено 4 алельні варіанти блоків гліадинів, їм відповідало тільки 2 алеля згідно ПЛР-аналізу. Генотипи з блоками гліадинів Gli-A1f, Gli-A1b і Gli-A1c мали єдиний алель *Gli A1.1,* за даними ПЛР. Як зауважено О. М. Благодаровою та наведено у [2], що, згідно каталогу алельних варіантів блоків гліадинів Ф. О. Поперелі [27], Gli-A1b і Gli-A1c представлені блоками компонентів білків, близьких за рухливістю при електрофорезі в ПААГ, а алельні варіанти Gli-A1f і Gli-A1o — дуже відрізняються блоками компонентів білків один від одного і від Gli-A1b і Gli-A1c. У дослідженій групі сортів за допомогою ПЛР-аналізу можна було диференціювати генотипи з алельним варіантом блоків гліадинів Gli-A1o — алель *Gli A1.2* за даними ПЛР.

При аналізі електрофореграм гліадинів за локусом *Gli-B1* у досліджуваних сортів виявлені 3 алельні варіанти блоків запасних білків — Gli-B1b, Gli-B1d, Gli-B1e, згідно ПЛР-аналізу, першим двом блокам відповідає алель *Gli-B1.1*, а третьому — *Gli-B1.2.* Оскільки алельний варіант гліадину Gli-B1e значно впливає на якість борошна, можливість його ідентифікації за допомогою ПЛР-аналізу має бути підтверджена на більшому наборі сортів.

За локусом *Gli-D1* не вдалося виявити відповідності між алельними варіантами блоків гліадинів на електрофорезі білків і за продуктами ПЛР-реакції.

Таблиця 1

Алельний стан локусів *Gli-A1, Gli-B1, Gli-D1* та *Glu-A3* у генотипах сортів та майже ізогенних ліній пшениці за даними алель-специфічної ПЛР та алельні варіанти блоків гліадинів

Сорт	Алелі за даними ПЛР-аналізу			Алельні варіанти блоків гліадинів			Алелі локусу
	Gli-A1	*Gli-B1*	*Gli-D1*	*Gli-A1*	*Gli-B1*	*Gli-D1*	*Glu-A3*
Лузанівка од.	*1*	*1*	*2*	b	d	g	*c*
Зустріч од.	*1*	*1*	*2*	*f*	*b*	*x*	*f*
Знахідка од.	*1*	*1*	*2*	b	b	j	*c*
Любава од.	*1*	*1*	*2*	b	b, d	b, j	*c*
Фантазія од.	*1*	*1*	*2*	b	b	j	*c*
Альбатрос од.	*1*	*1*	*2*	b	b	j	*c*
Одеська 267	*1*	*1*	*1*	b	b	g	*c*
Вікторія	*1*	*1*	*1*	b	b	j	*c*
Прима од.	*1*	*2*	*1*	c	e	f	*c*
Застава од.	*1*	*2*	*1*	b	e	j	*a*
Струмок	*2*	*1*	*2*	o	d	b	*d*
Лада од.	*2*	*1*	*2*	*o*	*b*	*j*	*d*
Майжеізогенні лінії пшениці, вихідний сорт та окремі донори алелів							
GLI-D1–5	*1*	*1*	*1*	b	b	g	*c*
GLI-B1–3	*1*	--	*2*	b	l	b	*c*
GLI-B1–4	*1*	*2*	*2*	b	g	b	*c*
GLI-A1–1	*2*	*1*	*2*	m	b	b	*e*
GLI-D1–4	*1*	*1*	*2*	b	b	j	*c*
GLI-B1–12	*1*	*Новий алель*	*2*	b	o	b	*c*
Безоста 1	*1*	*1*	*2*	b	b	b	*c*
Б-16	*1*	--	*2*	x	l	j	*c*
Одеська червоноколоса	*1*	*2*	*2*	g	c	f	*c*

За результатами ПЛР-аналізу локусу *Glu-A3* визначені алелі *a* і *c*, присутні в генотипах, для яких детектований алель *Gli-A1.1*. *Glu-A3a* і *Glu-A3c* алелі виявлені у сортів з алельними варіантами блоків гліадинів Gli-A1b і Gli-A1c. Алель *Glu-A3d* чітко відповідає алельному варіанту гліадина Gli-A1o і ПЛР-алелю *Gli-A1.2*. Алель *Glu-A3f* представлений тільки у генотипі сорту Зустріч одеська (для цього сорту характерний алельний варіант блоку гліадинів (Gli-A1f). Але цей сорт не відрізняється від усіх інших сортів, крім Струмка і Лади одеської, за ПЛР-аналізом локусу *Gli-A1*.

При дослідженні методами ПЛР та електрофорезу запасних білків алельного складу локусів, що кодують запасні білки у майже ізогенних ліній, а також у лінії Б16 і сорту Одеська червоноколоса, нами виявлено

у лінії GLI-B1–12 новий алель, якому відповідає продукт ампліфікації розміром 399 п. н., ще не описаний в літературі [1, 2]. При ПЛР-аналізі у ліній з житньою транслокацією продуктів ампліфікації не виявлено, тому що праймери, використані у роботі, розроблені до нуклеотидних послідовностей *Gli-1* локусів, які не містяться у житніх транслокаціях; отримані за ПЛР дані узгоджуються з даними електрофорезу запасних білків.

У результаті молекулярно-генетичного аналізу за допомогою праймерів до локусу *Glu-A3* майже у всіх лініях виявлено алель *Glu-A3c*. Тільки лінія GLI-A1–1 мала *Glu-A3e*. Отримані результати узгоджуються з даними про наявність ПЛР-алеля *Gli-A1.2* у цієї лінії. За даними Zhang et al. [20], наявність цього алеля збігається з присутністю алелів *Glu-A3d* і *Glu-A3e* для локусу *Glu-A3*. Слід звернути увагу на наявність у цієї лінії блоку компонентів гліадинів Gli-Alm за даними електрофорезу запасних білків.

Отже, у виконаних у ПБЦ спільних дослідженнях була показана можливість диференціювати ПЛР-методом генотипи м'якої пшениці з алельними варіантами блоків гліадинів Gli-A1m і Gli-A1o, які мають за ПЛР алель *Gli-A1.2*, від генотипів з варіантами блоків гліадинів Gli-A1f, Gli-A1b, Gli- A1c, Gll-A1x, Gli-A1g; а також генотипи з варіантами блоків гліадинів Gli-B1e, Gli-B1g і Gli-B1c, які, за даними ПЛР, мають *Gli-B1.2* алель, від генотипів з алельними варіантами блоків гліадинів Gli-B1b і Gli-B1d і з алелем *Gli-B1.1.* за ПЛР.

За допомогою молекулярних маркерів до генів пуроіндолінів *a* і *b*, що контролюють якісну ознаку зерна м'якої пшениці — твердозерність, визначено алелі генів *Pina-D1* та *Pinb-D1* у генотипах українських сортів, створених селекційними установами різних кліматичних зон (табл. 2). Досліджено також три російські сорти, що були свого часу широко розповсюджені в Україні. За результатами аналізу два сорти — Миронівська 33 і Мирлебен та лінія Б16рр характеризувалися алелями *Pina-D1a* та *Pinb-D1a*, які розповсюджені у світі серед м'якозерних сортів. Це знаходиться у повній відповідності з їхнім фенотипом, визначеним методом NIR [4, 15]. 93 % сортів належить до найбільш розповсюдженого у світі твердозерного типу сортів та має алелі *Pina-D1a; Pinb-D1b*.

Згідно даних аналізу ознаки твердозерність, визначеної для 85 сортів пшениці м'якої методом NIR (рис.1), чітко вирізняються дві групи сортів; умовно виділена група значень до 45 одиниць відповідає групі м'якозерних сортів, група значень від 50 одиниць і вище — групі твердозерних сортів. Показник χ^2 свідчить про те, що розподіл за ознакою твердозерність відрізняється від нормального (через очевидну бімодальність).

Як ми вже зазначали [4], невелика різниця у твердозерності для сортів з однаковим алельним станом генів пуроіндолінів *a* і *b* може пояснюватися різними умовами вирощування, значна ж різниця може зумовлюватися впливом інших генів, у тому числі таких, які досі остаточно не визначені.

Таблиця 2

Параметри твердозерності та алельний стан генів пуроіндолінів, визначений у досліджених сортів згідно [4]

Текстура ендосперму зерна за класифікацією Williams (1998)	Твердо-зерність	Алелі генів пуроін-долінів	Сорти / лінії
Very soft	20–30	*Pina-D1a* *Pinb-D1b*	Фарандоль
Soft	33,6–38,6	*Pina-D1a* *Pinb-D1a*	Миронівська 33, Б16рр
Medium hard	50–65	*Pina-D1a* *Pinb-D1b*	Дальницька, Знахідка одеська, Володарка, Порада, Вдала, Застава, Світанок, Вимпел, Федорівка, Струмок, Батько, Сирена, Фантазія, Василина, Диканька, Ніконія, Селянка, Вікторія одеська, Леля, Веснянка
Hard	65–78	*Pina-D1a* *Pinb-D1b*	Б16 gg, Одеська 51, Лада, Либідь, Білосніжка, Красуня, Одеська 132, Тіра, Херсонська остиста, Апогей луганський, Одеська 133, Донецька 46, Писанка, Любава, Одеська 265, Ренан, Землячка одеська, Одеська 162, Обрій, Українка одеська, Альбатрос одеський, Дончанка 3, Супутниця, Краснодарська 99, Фаворитка, Ясочка, Победа 50, Золотоколоса, Станична, Білоцерківська напівкарликова, Прима, Зустріч
Very hard	78,8–90,0	*Pina-D1a* *Pinb-D1b/c*	Донський сюрприз, Лузанівка одеська, Мирхад, Миронівська 27, Мирич, Циганка
Extra hard	93	?	Миронівська 65

За локусом *Wx-A1* у всіх сортів виявлено алель *Wx-A1a*, нуль-алелі *Wx-B1b* і *Wx-D1b* не виявлені [5, 6]. Для ліній Wx-15 і Wx-12 тестовані *Wx-B1b* і *Wx-D1b* алелі і не отримано специфічний продукт ампліфікації для *Wx-A1a*.

Отримані нами дані узгоджуються з характеристикою українських сортів м'якої пшениці, що мають нормальний вміст амілози — 20–30 %. У той же час проведені дослідження є необхідним етапом для введення маркерної селекції за Wx-генами у селекційні програми СГІ. Так, в СГІ д. б. н. О. І. Рибалкою були створені популяції F_4–F_5 рекомбінантних інбредних ліній від схрещування сорту Куяльник *(Wx-A1aWx-A1a,*

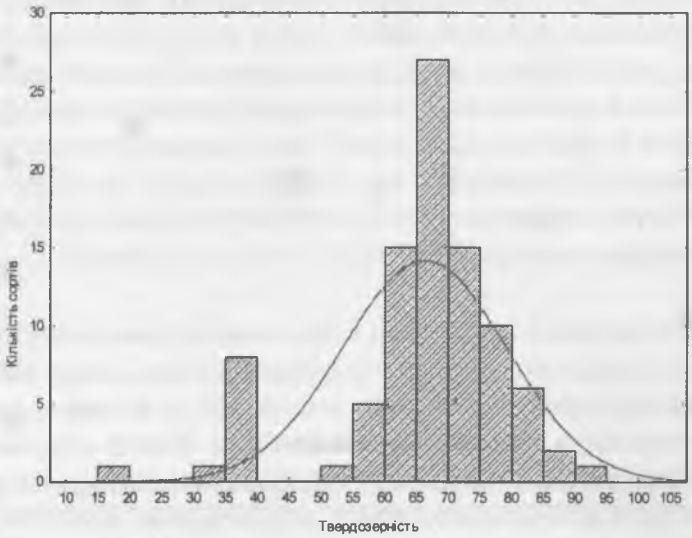

Рис. 1. Розподіл за ознакою твердозерність у зерні сортів пшениці, що визначені методом NIR χ^2=24,52 (df=6, p=0,00042) згідно [4]

Wx-B1aWx-B1a, Wx-D1aWx-D1a) х лінія Wx-12 (*Wx-A1bWx-A1b, Wx-B1bWx-B1b, Wx-D1bWx-D1b*).

Ми застосували алель-специфічні праймери для гібридологічного аналізу популяції F_5, де виявлено розщеплення, що відповідає теоретично очікуваному — 15: 2: 15 за локусом *Wx-A1* (χ^2 = 5,05; 0,20> P> 0,05), за локусом *Wx-B1* (χ^2 = 7,65; 0,05> P> 0,01), за локусом *Wx-D1* (χ^2 = 2,352; 0,50> P> 0,20) [6]. Відібрано 10 селекційних форм носіїв — алелів *Wx-A1bWx-A1b*, *Wx-B1bWx-B1b*, *Wx-D1bWx-D1b*, які пропонуються для подальшого використання при створенні вітчизняних сортів з низьким вмістом амілози. Визначено ефекти впливу алельного стану *Wx*-локусів на вміст амілози в крохмалі зерна генотипів гібридної популяції. Показано неповне відтворення *Wx*-фенотипу за наявності нуль-алелів за локусами *Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1* у селекційних форм (рис. 2).

Визначено непропорційний характер ефектів впливу активних алелів *Wx*-генів на вміст амілози в крохмалі досліджених генотипів та відхилення від адитивності, спричинені ефектом компенсації алелів цих генів. Мінімальна абсорбція спостерігалася у гібридів з трьома нуль-алелями за локусами *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1*. За наявності лише одного функціонального алеля «*a*» у будь-якому з трьох локусів абсорбція в середньому підвищувалась на 0,138 одиниці. Генотипи з трьома алелями «*a a a*» мали рівень абсорбції, характерний для батьківської форми — сорту Куяльник. У селекційних форм із повним набором мутантних алелів *Wx-A1b, Wx-B1b, Wx-D1b* спектри абсорбції були помітно вищі, ніж у батьківської лінії Wx-12.

Неповне відтворення Wx-фенотипу за наявності нуль-алелів за локусами *Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1* може зумовлюватися додатковими чинниками, які впливають на вміст амілози в крохмалі зерна пшениці м'якої.

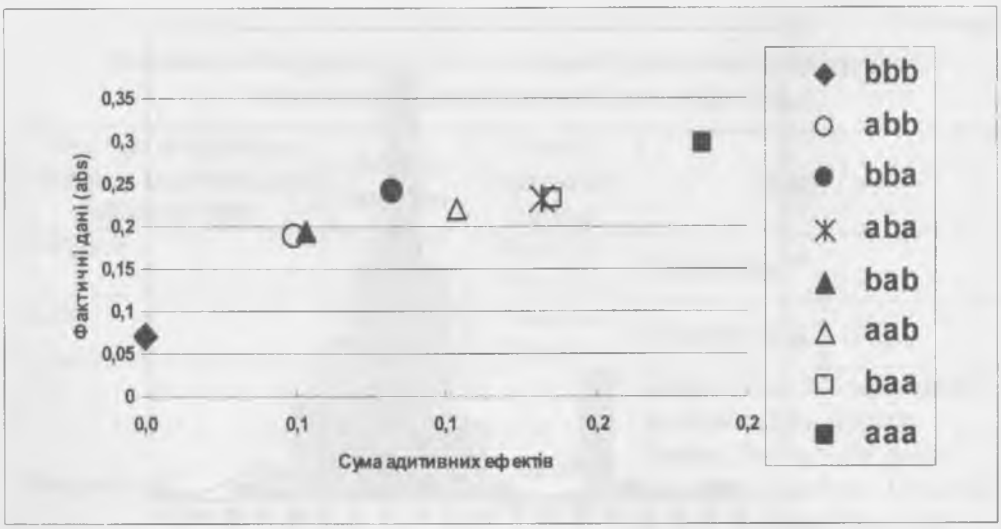

Рис. 2. Порівняння ефектів впливу алельного стану *Wx*-локусів (*Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1*) на вміст амілози в крохмалі генотипів, обчислених за адитивною моделлю взаємодії генів із фактичними даними абсорбції згідно [28]: a –функціональні алелі *Wx*-локусів, b — нуль-алелі *Wx*-локусів. По осі ординат дані абсорбції при довжині хвилі 600 нм

Висновки.

Отже, науковцями ПБЦ спільно з провідними фахівцями СГІ та Інституту захисту рослин НААН досліджено поліморфізм низки генетичних локусів, які детермінують якісні показники зерна пшениці м'якої. Визначено алельний стан українських сортів пшениці за *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* та *Glu-A3* локусами. Зіставлено генетичний поліморфізм, визначений із застосуванням ПЛР-аналізу за зазначеними вище локусами, та поліморфізм, який детектується за допомогою електрофорезу гліадинів у ПААГ (тобто, звичайним методом оцінки селекційного матеріалу пшениці за спектром запасних білків — гліадинів, що використовують у відділі генетичних основ селекції СГІ–НЦНС уже протягом 40 років з успішним виходом на практичну селекцію).

Порівняльними дослідженнями показано, що рівень генетичного поліморфізму за *Gli-1* та *Glu-A3* локусами, які детектували у ПЛР з праймерами, розробленими Zhang et al. [19, 20], нижчий, ніж спектр спостережуваного різноманіття алельних варіантів блоків гліадинів. Це пояснюється тим, що використані у дослідженні алель-специфічні праймери, розроблені Zhang et al. [19, 20] на основі попередньої детекції однонуклеотидних замін в послідовності *Gli-1* та *Glu-A3* локусів. Тобто, використану панель праймерів необхідно доповнювати іншими ПЛР-маркерами, які дозволять детектувати поліморфізм за нуклеотидною послідовністю в інших сайтах генних кластерів гліадинів.

Застосування ПЛР-аналізу алельного стану генів пуроіндолінів у генотипах вітчизняних сортів дозволило визначити, що переваж-

на більшість сортів має алелі *Pina-D1a* та *Pinb-D1b*, які характерні для твердозерних пшениць, але у сортів з зазначеними алелями фізичний показник твердозерності значно варіює. Тому припускаємо, що, окрім генів пуроіндолінів, на ознаку твердозерність впливають й інші генетичні детермінанти, які потрібно вивчати. Також доцільно було б виявити сорти пшениці, показники тердозерності яких відповідають вищим хлібопекарським технологічним властивостям, якщо також враховувати для цих сортів алельний стан локусів *Gli-1* та *Glu-A3* та алельні варіанти блоків гліадинів.

За результатами аналізу виконаних робіт з дослідження поліморфізму *Wx*-генів показано, що переважна більшість українських сортів пшениці не має нуль-алелів за *Wx*-генами. Залучення у селекційні програми сортів-донорів нуль-алелів *за Wx*-генами може бути ефективно контрольовано та прискорено за маркерною селекцією на основі застосування ПЛР-аналізу *Wx*-генів, зокрема для добору селекційних ліній з низьким вмістом амілози у зерні.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Полищук А. М. Молекулярно-генетический анализ почти-изогенных линий мягкой пшеницы с помощью аллель-специфических праймеров к *Gli*-локусам / А. М. Полищук, С. В. Чеботарь, Н. А. Козуб, И. А. Созинов, Ю. М. Сиволап // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології : зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. Вавилова ; за ред. М. В. Роїка. — К. : ЛОГОС, 2007. — Т. 1 — С. 165–167.
2. Поліщук А. М. Аналіз сортів та майже-ізогенних ліній м'якої пшениці за допомогою ПЛР-аналізу з алель-специфічними праймерами до *Gli*- та *Glu*-локусів / А. М. Поліщук, С. В. Чеботар, О. М. Благодарова, Н. А. Козуб, І. О. Созінов, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2010. — № 6. — С. 22–31.
3. Чеботар С. В. Аналіз алельного стану генів *Pina-D1* і *Pinb-D1* в генотипах українських сортів пшениці / С. В. Чеботар, О. М. Хохлов, К. О. Куракіна, Ю. М. Сиволап // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. Вавилова ; редкол. : Кунах В. А. (голов. ред.) [та ін.] — К. : ЛОГОС, 2008. — Т. 5. — С. 207–212.
4. Чеботар С. В. Фенотипічні прояви алелів пуроіндолінових генів м'якої пшениці / С. В. Чеботар, К. О. Куракіна, О. М. Хохлов [та ін.] // Цитология и генетика. — 2012. — № 4. — С. 8–19.
5. Петрова І. В. ПЛР-аналіз алельного стану *Wx*-генів у сортів пшениці / І. В. Петрова, С. В. Чеботар, О. І. Рибалка [та ін.] // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. Вавилова ; за ред. М. В. Роїка. — К. : ЛОГОС, 2006. — Т. 3. — С. 127–132.
6. Петрова И. В. Контроль *Wx*-генов в процессе селекции при создании форм мягкой пшеницы с низким содержанием амилозы / И. В. Петрова, С. В. Чеботарь, А. И. Рыбалка, Ю. М. Сиволап // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології : зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. Вавилова ; редкол. : Кунах В. А. (голов. ред.) [та ін.]. — К. : ЛОГОС, 2007. — Т. 2. — С. 162–164.

7. Созинов А. А. Полиморфизм белков и его использоание в генетике и селекции / А. А. Созинов — М. : Наука, 1985. — 272 с.
8. Попереля Ф. А. Полиморфизм глиадина и его связь с качеством зерна, продуктивностью и адаптивными свойствами сортов мягкой озимой пшеницы / Ф. А. Попереля // Селекция, семеноводство и интенсивная технология возделывания озимой пшеницы. — М. : Агропромиздат, 1989. — С. 138–150.
9. Благодарова О. М. Геногеографія алелів гліадин- і глютенінкодуючих локусів українських сортів озимої м'якої пшениці / О. М. Благодарова, М. А. Литвиненко, Є. А. Голуб // Зб. наук. праць СГІ–НАЦ НАІС. — Одеса, 2004. — Вип. 6 (46), ч. 2. — С.179–193.
10. Рибалка О. І. Генетична гетерогенність сортів пшениці одеської селекції за алельним складом *Gli-/Glu*-локусів / О. І. Рибалка, М. В. Червоніс, М. А. Литвиненко // Вісн. аграр. науки. — 2008. — № 2. — С. 54–59.
11. Payne P. I. Catalogue of alleles for the complex gene loci *Glu-A1, Glu-B1, Glu-D1* which code for high-molecular weight subunits of glutenin in hexaploid wheat / P. I. Payne, G. J. Lawrence // Cereal Research Communic. — 1983. — Vol. 11. — P. 29–35.
12. Хохлов О. М. Генетично обумовлена твердість зерна м'якої пшениці (*T. aestivum*): стан та перспективи досліджень в Україні / О. М. Хохлов // Зб. наук. праць СГІ. — Одеса, 2002. — Вип. 2 (42). — С. 9–29.
13. Sourdille P. Linkage between markers and genes affecting kernel hardness in wheat / P. Sourdille, M. Perretant, G. Charmet [et al.] // Theor. Appl. Genet. — 1996. — V. 93. — P. 580–586.
14. Giroux M. J. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoiine a and b / M. J. Giroux, C. F. Morris // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — No 95. — P. 6262–6266.
15. Чеботарь С. В. Генетический полиморфизм локусов, определяющих хлебопекарное качество украинских сортов пшеницы / С. В. Чеботарь, Е. М. Благодарова, Е. А. Куракина [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2012. — Том 16, № 1. — С. 87–98.
16. Yamamori M. Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat / M. Yamamori, T. Nakamura, T. R. Endo // Theor. Appl. Genet. — 1994. — Vol. 89. — P. 179–184.
17. Копусь М. М. О естественной геногеографии глиадиновых аллелей у озимой мягкой пшеницы / М. М. Копусь // Селекция и семеноводство. — 1994. — 5. — С. 9–14.
18. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях / под ред. Ю. М. Сиволапа — К. : Аграр. наука, 1998. — С. 34–40.
19. Zhang W. Identification of SNPs and development of allele-specific PCR markers for γ-gliadin alleles in *Triticum aestivum* / W. Zhang, M. C. Gianibelli, W. Ma, L. Rampling, K. R. Gale // Theor. Appl. Genet. — 2003. — Vol. 107. — P. 130–138.
20. Zhang W. Characterisation and marker development for low molecular weight glutenin genes from *Glu A3* alleles of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) / W. Zhang, M. C. Gianibelli, L. R. Rampling // Theor. Appl. Genet. — 2004. — Vol. 108. — P. 1409–1419.
21. GenePrint STR Systems (Silver Stain Detection). Technical Manual. Promega, 2001. — D004 — P. 1–47.

22. Metakovsky E. V. Gliadin allele identification in common wheat. 2. Catalogue of gliadin alleles in common wheat / E. V. Metakovsky // J. Genet. Breed. — 1991. — Vol. 45. — P. 325–344.
23. Gautier M. F. *Triticum aestivum* puroindolines, 2 basic cysteine-rich seed proteins-cDNA sequence-analysis and development gene-expression / M. F. Gautier, M. E. Aleman, A. Guirao, D. Marion, P. Joudrier // Plant Molecular biology. — 1994. — Vol. 25 (1) — P. 43–57.
24. Giroux M. J. A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low level of starch-surface friablin / M. J Giroux, C.F. Morris // Theor Appl Genet. — 1997. — Vol. 95. — P. 857–864.
25. Семенюк И. В. Молекулярно-генетический анализ селекционных линий мягкой пшеницы с крахмалом амилопектинового типа / И. В. Семенюк, С. В. Чеботарь, А. И. Рыбалка, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2011. — Т. 45, № 5. — С. 17–22.
26. McLauchlan A. Development of robust PCR-based DNA markers for each homoeo-allele of granule-bound starch synthase and application in wheat breeding programs / A. McLauchlan, F. C. Ogbonnaya, B. Hollingsworth // Aust. J. Agric. Res. — 2001. — Vol. 52, № 11–12. — P. 1409–1416.
27. Попереля Ф. О. Три основні генетичні системи якості зерна озимої м'якої пшениці / Ф. О. Попереля // Реалізація потенційних можливостей сортів та гібридів Селекційно-генетичного інституту в умовах України : зб. наук. праць СГІ. — Одеса, 1996. — С. 117–132.
28. Петрова І. В. Метрологічна характеристика методу спектрофотометричного визначення вмісту амілози в крохмалі зерна селекційних ліній пшениці / І. В. Петрова, О. М. Хохлов, С. В. Чеботар, Ю. М. Сиволап // Физиология и биохимия культурних растений. — 2010. — Т. 42, № 2. — С. 146–152.

Надійшла 17.07.2015.

UDC 577:2:633.11:575

Chebotar S. V., Blagodarova O. M., Kozub N. O., Sozinov I. O. Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

PCR-ANALYSIS OF POLYMORPHISM LOCI AFFECTING THE QUALITY GRAINS OF BREAD WHEAT *(Triticum aestivum* L.)

In South Plant Biotechnology Center NAAS during the 2002–2012 there were carried out PCR-analysis of molecular genetic polymorphisms in loci *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* and *Glu-A3, Pina-D1* and *Pinb-D1* genes of puroindolines, that determine «hardness», as well as genes *Wx*, which determine the content of amylose in starch of the endosperm of bread wheat. There were done comparison of the level of the genetic polymorphism that have been revealed by PCR wlth allele-specific primers for γ-gliadin loci and the polymorphisms of storage proteins of wheat. The level of polymorphism that have been detected by PCR was lower than polymorphism of storage proteins. PCR-analysis of gene *Pina-D1* and *Pinb-D1* have detected alleles which are specific for «hard» and «very hard» wheat varieties mostly among investigated Ukrainian varieties, only for few varieties have been identified alleles that are specific for «soft wheat». Among the tested Ukrainian wheat were not found null alleles of *Wx*-genes.

УДК 577:2:633.11:575

Чеботарь С. В., Благодарова Е. М., Козуб Н. А., Созинов И. А.

ЯЦР-АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ЛОКУСОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА КАЧЕСТВО ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ (*Triticum aestivum* L.)

В Южном биотехнологическом центре в растениеводстве НААН в период 2002–2012 гг. с помощью ПЦР проводились исследования молекулярно-генетического полиморфизма в локусах *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* и *Glu-A3* по генам пуроиндолинов *Pina-D1* и *Pinb-D1*, контролирующим признак «твердозерность», а также по генам *Wx*, обусловливающим содержание амилозы в крахмале эндосперма пшеницы мягкой. Проведено сопоставление результатов ПЦР-определения генетического полиморфизма с аллель-специфичными праймерами к локусам γ-глиадинов с данными, полученными методом электрофореза запасных белков зерна пшеницы. Уровень выявленного полиморфизма с помощью ПЦР был ниже, чем детектированного с помощью электрофореза запасных белков. Методом ПЦР-анализа генов *Pina-D1* и *Pinb-D1* в большинстве

исследованных украинских сортов пшеницы были определены аллели, характерные для твердозерных сортов, только в трех сортах обнаружены аллели, присущие мягкозерной пшенице. Среди исследованных украинских пшениц не было обнаружено носителей нуль-аллелей по *Wx*-генам.