

УДК 633.11:577.21

МОЛЕКУЛЯРНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ АЛЕЛЯ *Glu-B1a1* У СОРТАХ І ЛІНІЯХ ПШЕНИЦІ

Б.В. МОРГУН^{1, 2}, Т.В. ЧУГУНКОВА¹, О.І. РИБАЛКА^{1, 3}, В.М. ПОЧИНОК¹,
О.І. ТАРАСЮК¹, А.І. СТЕПАНЕНКО²

¹Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

²Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук
України

03680 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

³Селекційно-генетичний інститут — Національний центр насіннезнавства та
сортовивчення Національної академії аграрних наук України
65036 Одеса, Овідіопольська дорога, 3

За допомогою молекулярно-генетичного та біохімічного аналізів виявлено алелі, відповідальні за високу якість зерна. У сортах і лініях озимої м'якої пшениці ідентифіковано ген *Glu-B1a1*, який контролює синтез високомолекулярних глютенінів. Використані у роботі методи молекулярного маркування є ефективними і дають змогу диференціювати нові селекційні зразки озимої м'якої пшениці.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., озима м'яка пшениця *Glu-B1a1*, ДНК-аналіз, міні-ДСН-електрофорез.

Кількість і якість білка у зерні пшениці формується в онтогенезі і залежить як від спадкових особливостей сортів, так і від умов вирощування. Негативні кореляції між вмістом білка й компонентами структури врожаю (маса і розмір зернівки, кількість зернин у колосі, врожай зерна з одиниці площі посіву) ускладнюють виведення високопродуктивних сортів з підвищеним вмістом білка. Проте селекція на вміст і високу якість білка широко проводиться, має перспективу й обнадійливі результати [3–5].

Важливу роль у визначенні високої хлібопекарської якості борошна пшениці відіграють клейковинні білки глютеніни. Високо- й низькомолекулярні глютеніни формують макромолекулярний каркас клейковини і впливають на такі властивості тіста, як еластичність і пружність, необхідні для випікання різних сортів хліба та хлібобулочних виробів [2, 6].

Субодиниці низькомолекулярних глютенінів (LMW-GS — low molecular weight glutenin subunits) є аельними варіантами локусів *Glu-A3*, *Glu-B3*, *Glu-D3*, що знаходяться на коротких плечах хромосом відповідно 1A, 1B, 1D [13]. Субодиниці високомолекулярних глютенінів (HMW-GS — high molecular weight glutenin subunits) здебільшого мають молекулярну масу 65–90 кД [14] і кодуються тісно зчепленими *x* та *y* типами генів у локусах *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*, що розміщені на довгих плечах хромосом відповідно 1A, 1B, 1D [11].

HMW-GS як ключові компоненти високої хлібопекарської якості досліджували доволі широко [7, 9]. Було показано, що алелі *a* і *b* локусу *Glu-A1* помітно впливають на якість білка [12]. Виявлено, що вміст клейковини й поглинання борошном води збільшуються у генотипів з алелем *b*. За наявності алеля *Glu-B1c* скорочується час замісу тіста, збільшуються об'єм хліба, фаринографічна абсорбція води, вміст клейковини [10]. Однак найцікавішим для вивчення впливу високомолекулярних глютенінів на ознаки хлібопекарської якості виявився алель *Glu-B1a1*, продуктом експресії якого є дві субодиниці $Vx7^{OE} + Vy8^*$. Перша з них ($Vx7^{OE}$) має підвищений рівень експресії порівняно з субодиницею зі звичайним рівнем ($Vx7$) [6].

Алель *Glu-B1a1* вже доволі часто трапляється серед світової популяції високоякісних сортів м'якої пшениці, а також низки українських сортів. Його ідентифіковано серед біотипів мексиканських, угорських, австралійських, аргентинських сортів, у групі екстрасильних канадських пшениць, що й привернуло увагу до його детального дослідження. Однією з особливостей цього алеля є те, що його впевнено можна ідентифікувати за допомогою ПЛР-аналізу за інсерцією в 43 пн у регіоні MAR [1].

Метою наших досліджень було виявлення алеля *Glu-B1a1* у сортів і ліній озимої м'якої пшениці для визначення можливості їх використання у селекційних програмах, спрямованих на створення нових високопродуктивних екстрасильних конкурентоспроможних сортів пшениці.

Методика

Матеріалом дослідження було насіння 130 сорторазків озимої м'якої пшениці, отриманих в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України, та сорти Древянка і Панна. Загальну ДНК виділяли зі шроту за допомогою СТАВ-буфера, який забезпечував якісне переведення ДНК у розчин з мінімальними втратами. Очищення від білкової фракції досягали дворазовим екстрагуванням сумішшю хлороформ : ізоаміловий спирт (24 : 1) із подальшим відбиранням водної фази. ДНК осаджували розчином СТАВ-буфера протягом 1 год. Фракцію РНК вилучали додаванням до розчину ДНК 50 мкг RNase A (TS), інкубуванням при 37 °С упродовж 15 хв, екстрагуванням сумішшю хлороформу й ізоамілового спирту та осадженням високомолекулярних нуклеїнових кислот ізопропанолом. Осад рослинної ДНК промивали 70 %-м етанолом, підсушували і розчиняли у ТЕ-буфері (рН 8,0), який забезпечував оптимальні умови зберігання очищеного препарату. Внутрішнім контролем для полімеразної ланцюгової реакції слугували праймери до гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази G3PDH (GenBank:EF592180.1) : TaG3PDHF, 5'-CAA-CGC-TAG-CTG-CAC-CAC-TAA-CT-3' та TaG3PDHR, 5'-ACT-CCT-CCT-TGA-TAG-CAG-CCT-T-3', розмір очікуваного амплікону 604 пн. Для реакції брали 30 нг очищеної загальної ДНК. Режим ампліфікації: первинна денатурація при 94 °С — 3 хв, 35 циклів; денатурація — 94 °С, 30 с; відпал — 57 °С, 30 с; елонгація — 72 °С, 39 с; кінцева елонгація — 72 °С, 10 хв. Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу в 0,8 %-му агарозному гелі на основі ТАЕ-буфера з додаванням бромистого етидію й документували на робочій станції Ge1-Doc (BioRad). З метою виявлення інсерції у 43 пн в регіоні MAR

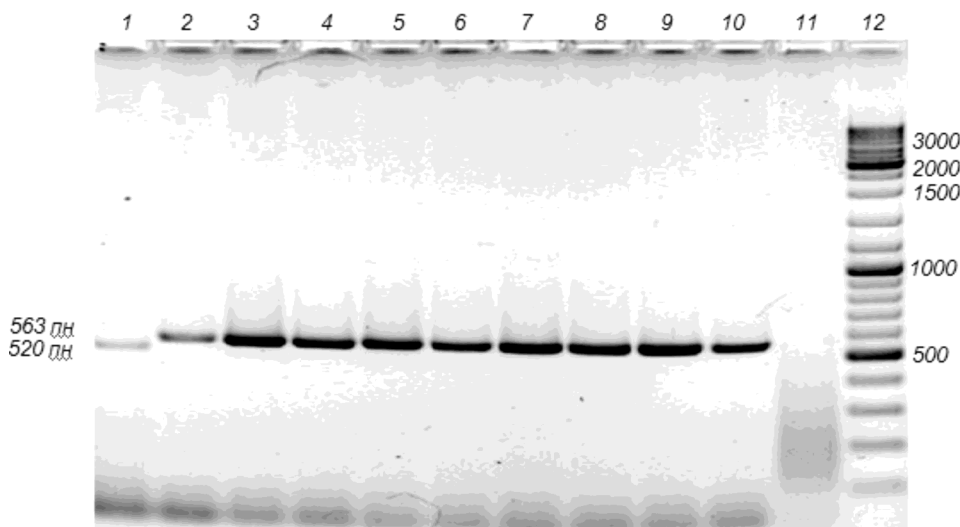


Рис. 1. Результати ПЛР-аналізу до регіону MAR гена *Glu-B1a1* зразків насіння пшениці:
 1 – 102; 2 – 103; 3 – 289; 4 – 4192; 5 – 101; 6 – 104; 7 – 105; 8 – 106; 9 – 107; 10 – позитивний контроль, Панна; 11 – негативний контроль, ТЕ-буфер; 12 – GeneRuler™ DNA Ladder Mix (TS)

проводили полімеразну ланцюгову реакцію з використанням праймерів Vx7 MAR-F 5'-CCTCA GCATG CAAAC ATGCA GC-3' і MAR-R 5'-CTGAA ACCTT TGGCC AGTCA TGTC-3' [14], розмір очікуваного амплікону 563 пн. Для реакції брали 30 нг ДНК. Режим ампліфікації: денатурація при 94 °C 3 хв, 40 циклів; денатурація – 94 °C, 30 с; відпал – 59 °C, 30 с; елонгація – 72 °C, 1 хв; кінцева елонгація – 72 °C, 5 хв. Продукти ампліфікації візуалізували після їх електрофоретичного розділення в агарозному гелі в ультрафіолетовому світлі із додаванням етидйіброміду як фарбувального реагенту.

Міні-ДСН-електрофорез високомолекулярних глютенінів пшениці в поліакриламідному гелі проводили за методом і на приладі, розробленими Рибалкою [6].

Результати та обговорення

Скринінг зразків на наявність інсерції, яка характерна для алеля *al* локусу *Glu-B1*, проводили з візуалізацією в 1,2 %-му (рис. 1) й 1,6 %-му агарозних гелях. Відомо, що певні зміни у методичних підходах при проведенні ПЛР-аналізу можуть впливати на його результати. Однак за використання різних концентрацій гелів (1,2 та 1,6 %) принципової відмінності в розділенні фрагментів не виявлено. Результати молекулярно-генетичного аналізу свідчать, що амплікон 563 пн спостерігався практично в усіх наведених на рис. 1 зразків, включаючи сорт Панна. Цей сорт пшениці є носієм інсерції 43 пн у регіоні MAR і відповідно гена *Vx7^{OE}* [1]. Винятком був зразок 102, який за даними проведеного ПЛР-аналізу містив амплікон 520 пн, із субодиницею Vx7 [8]. Типові результати ПЛР-аналізу на наявність локусу *Glu-B1a1* у проаналізованому нами селекційному матеріалі, отриманому способом простих міжсорткових, трілінійних, бекросних схрещувань, наведено на рис. 2. Вони підтвердили диференціацію селекційного матеріалу за

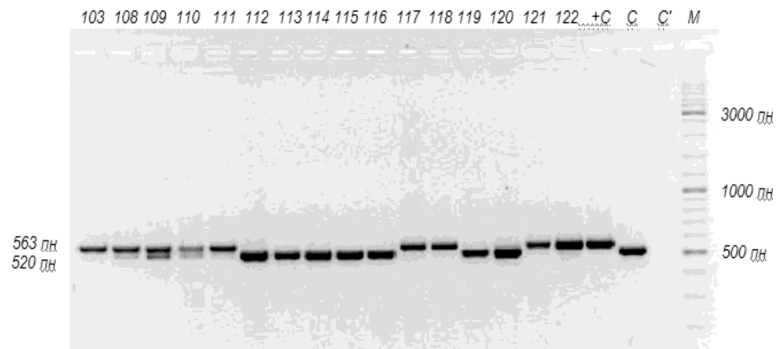


Рис. 2. Результати ПЛР-аналізу регіону MAR гена *Glu-B1a1* зразків насіння пшениці: 103, 108–122 — селекційні зразки; +С — позитивний контроль; С — негативний контроль; С' — негативний контроль — ТЕ-буфер; М — молекулярний маркер GeneRuler™ DNA Ladder Mix (TS)

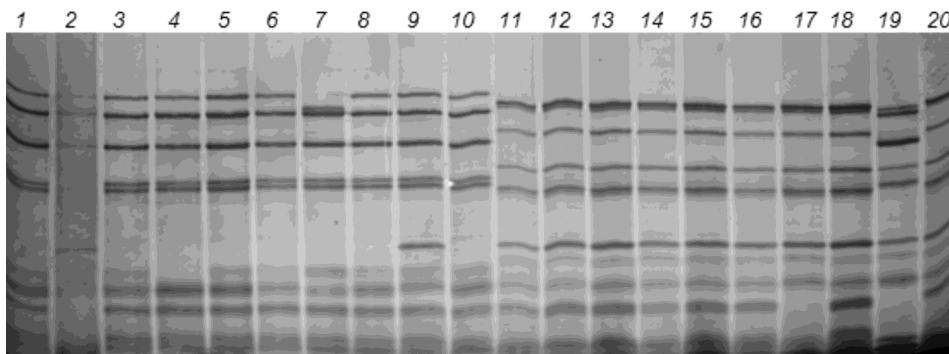


Рис. 3. Електрофореграма міні-ДСН-електрофорезу ВМ-глютенінів пшениці сорту Трипільська (1–10) та УК 1123 (11–20)

наявністю або відсутністю інсерції у 43 пн у регіоні MAR. Наявність обох ампліконів (520 і 563 пн) може бути індикатором гетерогенності популяції [8].

Загалом аналізом 130 селекційних зразків на наявність інсерції у 43 пн у регіоні MAR виявлено, що 70 зразків є позитивними щодо гена *Glu-B1a1*, 56 — негативними і 4 — гетерозиготними.

Результати міні-ДСН-електрофорезу запасних білків пшениці засвідчили, що серед 20 проаналізованих зразків лише один № 19 містив субодиницю 77 + 8 алеля *Glu-B1*, з якою пов'язані високі хлібопекарські властивості борошна (рис. 3).

Слід зазначити, що проблема підвищення якості пшеничного борошна набуває надзвичайної гостроти, особливо в зв'язку з необхідністю збільшення експорту зерна з України.

Розширюється застосування у селекційних програмах вихідного генетичного матеріалу з алелями високої якості зерна. Проведений нами молекулярно-генетичний аналіз на наявність у селекційному матеріалі озимої пшениці гена *Glu-B1a1* високомолекулярних глютенінів підтвердив, що обрані методи дослідження ефективні для виявлення алеля *al* локусу *Glu-B1*. За результатами масового аналізу з ідентифікації інсерції у 43 пн у регіоні MAR можна диференціювати нові створені селекційно-

генетичними методами зразки і добирати для подальшої роботи номери, які є позитивними щодо гена *Bx7^{OE} HMW-GS*.

1. Злацька А.В. Ідентифікація алеля *Glu-B1a1* високомолекулярних глютенінів та його вплив на ознаки хлібопекарської якості у пшениць, придатних до поширення в Україні // Физиология и биохимия культ. растений. — 2010. — **42**, № 4. — С. 315—321.
2. Конарев В.Г. Белки пшеницы. — М.: Колос, 1980. — 351 с.
3. Попереля Ф.О., Благодарова О.М. Генетика якості перших генотипів надсильної пшениці України // Цитология и генетика. — 1998. — **32**, № 6. — С. 11—17.
4. Починок В.М., Кірізій Д.А. Продуктивність і якість зерна пшениці у зв'язку з особливостями розподілу азоту в рослині // Физиология и биохимия культ. растений. — 2010. — **42**, № 5. — С. 393—402.
5. Рыбалка О.І., Моргун Б.В., Починок В.М. Сучасні дослідження якості зерна пшениці у світі: генетика, біотехнологія та харчова цінність запасних білків // Там само. — 2012. — **44**, № 1. — С. 3—22.
6. Рыбалка О.І. Якість пшениці та її поліпшення. — К.: Логос, 2011. — 495 с.
7. Усова З.В., Панченко І.А. Рівень показників якості зерна пшениці озимої м'якої як результат взаємодії субодиниць високомолекулярних глютенінів // Селекція і насінництво. — 2010. — Вип. 98. — С. 153—161.
8. Butow B.J., Gale K.R., Iken J. et al. Dissemination of the highly expressed Bx7 glutenin subunit (*Glu-B1a1* allele) in wheat as revealed by novel PCR markers and RP-HPLC // Theor. Appl. Genet. — 2004. — **109**, N 7. — P. 1525—1535.
9. Butow B., Ma W., Gale K. et al. Molecular discrimination of Bx7 alleles demonstrates that a highly expressed high-molecular-weight glutenin allele has a major impact on wheat flour dough strength // Ibid. — 2003. — **107**. — P. 1524—1532.
10. Khan K., Tanmingo G., Luka O. The effect of wheat blair proteins on mixing and baking correlations with protein fraction and high molecular weight subunit composition by gel electrophoresis // Cereal Chem. — 1989. — **66**. — P. 391—396.
11. Payne P.I., Law C.N., Mudd E.E. Control by homoeologous group 1 chromosome of the high-molecular-weight subunits of glutenin, a major protein of wheat endosperm // Theor. Appl. Genet. — 1980. — **58**. — P. 113—120.
12. Payne P.J., Lawrence G.J. Catalogue of alleles for the complex gene loci *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat // Cereal Res. Communic. — 1983. — **11**, N 1. — P. 29—34.
13. Singh N.K., Shepherd K.W. Linkage mapping of the genes controlling endosperm proteins in wheat. 1. Genes on the short arms of group 1 chromosomes // Theor. Appl. Genet. — 1988. — **75**. — P. 628—641.
14. Zhang Q., Dong Y.M., An X.L. et al. Characterization of HMW glutenin subunits in common wheat and related species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) // J. Cereal Sci. — 2008. — **47**. — P. 252—261.

Отримано 26.02.2013

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛЛЕЛЯ *Glu-B1a1* В СОРТАХ И ЛИНИЯХ ПШЕНИЦЫ

Б.В. Моргун^{1, 2}, Т.В. Чугункова¹, А.И. Рыбалка^{1, 3}, В.М. Починок¹, О.И. Тарасюк¹, А.И. Степаненко²

¹Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, Киев

³Селекционно-генетический институт — Национальный центр семеноведения и сортоизучения Национальной академии аграрных наук Украины, Одесса

С помощью молекулярно-генетического и биохимического анализов выявлены аллели, которые отвечают за высокое качество зерна. В сортах и линиях озимой мягкой пшеницы идентифицирован ген *Glu-B1a1*, который контролирует синтез высокомолекулярных глютеинов. Использованные в работе методы молекулярного маркирования эффективны и

дают возможность дифференцировать новые селекционные образцы озимой мягкой пшеницы.

MOLECULAR IDENTIFICATION OF ALLELE *Glu-B1a1* IN WHEAT VARIETIES AND LINES

B.V. Morgun^{1, 2}, *T.V. Chugunkova*¹, *O.I. Rybalka*^{1, 3}, *V.M. Pochinok*¹, *O.I. Tarasiuk*¹,
*A.I. Stepanenko*²

¹Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine
148 Akademika Zabolotnogo St., Kyiv, 03680, Ukraine

³Pant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivars Investigation,
National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine
3 Ovidiopska road, Odesa, 65036, Ukraine

The alleles of high grain quality in winter bread wheat were detected by molecular-genetic and biochemical analysis. It has been identified the gene *Glu-B1a1* in wheat varieties and lines. The methods of molecular labeling used in study are effective and allow to differentiate new breeding samples of winter bread wheat according to alleles which control high grain quality.

Key words: *Triticum aestivum* L., *Glu-B1a1*, DNA-analysis, mini-electrophoresis.