

ПОХИЛЬКО С.Ю.<sup>1,2✉</sup>, СТЕПАНЕНКО А.І.<sup>1,3</sup>, ДУГАН О.М.<sup>2</sup>, МОРГУН Б.В.<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,  
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148<sup>2</sup> Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»,

Україна, 03056, м. Київ, пр. Перемоги, 37

<sup>3</sup> Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17

✉ molgen@icbge.org.ua, (093) 118-38-15

**ВИЗНАЧЕННЯ АЛЕЛЬНОГО СТАНУ ГЕНІВ *GLU-1* У ГІБРИДНИХ СІМ'ЯХ,  
НОСІЇВ ГЕНА *GPC-B1* ВІД *TRITICUM TURGIDUM* SSP. *DICOCCOIDES***

Головним напрямком у селекції зернових культур є поліпшення якості зерна, яка характеризується вмістом білків, сирої клейковини, крохмалю, цукрів, мікроелементів, незамінних амінокислот, вітамінів, мінеральних сполук і тісно пов'язана з такими ознаками, як продуктивність, тривалість вегетаційного періоду, стійкість до хвороб і шкідників [1].

Важливу роль у визначенні високої хлібопекарської якості борошна пшениці відіграють клейковинні білки глютеніни і гліadini, які загалом складають близько 80-85 % від загального вмісту білка в зерні [2]. З них найбільш цінними є глютеніни, які здатні до полімеризації шляхом утворення інtermолекулярних -S-S- зв'язків. Ці білки, головним чином, формують макромолекулярний каркас клейковини і відповідають за такі важливі властивості тіста, як його еластичність та пружність [3]. Субодиниці високомолекулярних глютенінів здебільшого мають молекулярну масу 65–90 кДа і кодуються тісно зчепленими *x* та *y* типами генів у локусах *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*, що розміщені на довгих плечах хромосом 1A, 1B, 1D [4].

Найбільший вплив на якість борошна пшениці мають алелі локусу *Glu-D1*, за ним йдуть локуси *Glu-B1* та *Glu-A1* [5]. За шкалою якості борошна пшениці за д-р П. Пейн, найбільший індекс якості за *Glu-D1* має алельний варіант (5+10), за *Glu-B1* – (7+8; 17+18; 13+16), за *Glu-A1* – (2\*; 1) [6]. Перспективним для вивчення впливу високомолекулярних глютенінів на хлібопекарську якість є алель *Glu-B1al*, продуктом експресії якого є дві субодиниці Vx7<sup>OE</sup> та Vy8\*. Алель, що кодує першу з них, має під-

вищений рівень експресії порівняно з алелем субодиниці Vx7 [7].

Визначення алельного стану генів *Glu-1* проводили в гібридних сім'ях покоління F<sub>5</sub>, які є носіями гена *Gpc-B1* від дикої полби *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. Сорт Куяльник як материнська форма має екстрасильні показники борошна і несе найсильніші алелі *Glu-D1d* (білкові субодиниці 5 та 10), *Glu-B1al* (білкові субодиниці 7 (екстраекспресія) та 8), *Glu-A1b* (білкова субодиниця 2\*), тоді як батьківська лінія не має таких сильних алелей.

Для створення пшениці з високою продуктивністю важливими є оцінка таких показників як кущистість, довжина колоса, кількість зерен у колосі, маса 1000 зерен, маса зерна з одного колоса і маса зерна з усєї рослини [8].

Маса зерна з колосу є одним із важливих елементів продуктивності. Ця ознака тісно з пов'язана показниками кількість зерен у колосі, довжиною колосу та умовами вирощування [9]. Маса 1000 зерен відображає крупність і виповненість повітряно-сухих зерен. Вона також є показником якості насінневого матеріалу, який враховується при визначенні норми висіву, та в значній мірі визначає схожість і життєздатність [10]. Пшениця з масою 1000 зерен до 25 г має мілкі зерна, якщо від 25 г до 35 г – зерна середнього розміру, якщо більше 35 г – крупного розміру.

Метою роботи було провести аналіз генів *Glu-1* у гібридних сім'ях пшениці для встановлення алельного стану і відбору генотипів із комплексом алелей, які максимально відповідають вихідному материнському екстрасильному сорту пшениці, паралельно з визначенням важ-

ливих параметрів продуктивності гібридних сімей.

### Матеріали і методи

Аналізували насіння гібридних сімей покоління F<sub>5</sub> з геном *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, перенесеним із донорної лінії Glu-Pro гексаплоїдної ярої пшениці у генетичне оточення сорту м'якої озимої пшениці Куяльник [11]. Фізіологічний дослід проводився на базі Дослідного сільськогосподарського виробництва Інституту фізіології рослин і генетики НАН України.

Виділення загальної ДНК проводили ЦТАБ-методом із суміші 5-ти зернівок [12]. Для дослідження алельного стану генів *Glu-1* було використано шість пар праймерів із них 2 пари на референтні гени *actin* (Genbank accession AB181991) і *TaTM20* (Genbank accession DQ323065) та 4 пари на виявлення *Glu-D1d(5+10)*, *Glu-B1a1(77+8)*, *Glu-A1b(2\*)*.

Умови ПЛР на виявлення алелей локусу *Glu-D1*: денатурація 94°C – 3 хв, 34 цикли: денатурація 94°C – 30 с, ренатурація 61°C – 30 с, елонгація 72°C – 30 с; завершальна елонгація 72°C – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів у реакції для *Glu-D1 5* – 0,75 мкМ, для *Glu-D1 10* – 1 мкМ.

Умови ПЛР для виявлення алелей локусу *Glu-B1*: денатурація 94°C – 3 хв, 34 цикли: денатурація 94°C – 30 с, ренатурація 61°C – 30 с, елонгація 72°C – 1 хв; завершальна елонгація 72°C – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів у реакції для *Glu-B1(77+8)* – 0,5 мкМ, для *TaTM20* – 0,25 мкМ.

Умови ПЛР для виявлення алелей локусу *Glu-A1*: денатурація 94°C – 3 хв, 34 цикли: денатурація 94°C – 30 с, ренатурація 60°C – 30 с, елонгація 72°C – 30 с; завершальна елонгація

72°C – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів у реакції для *Glu-A1(2\*)* – 0,5 мкМ, для *actin* – 0,3 мкМ [13].

Розділення продуктів ампліфікації проводили за допомогою електрофорезу у агарозному гелі концентрацією 1,5 % з 0,5 мкг/мл бромистого етидію в однократному літій-боратному буфері. Візуалізували продукти ампліфікації в ультрафіолетовому світлі (LKB Transilluminator Macrovue 2011), документували фотосистемою Canon EOS 600D, обробляли знімки GIMP та MS PowerPoint.

Для розрахунку маси 1000 зерен відраховували дві проби по 500 зерен. Обчислювали середньоарифметичне мас обох повторів, їхню суму, а також фактичну розбіжність між ними. Остання не повинна перевищувати 3 % від середньоарифметичного [14]. Розрахунок маси і кількості зерен в одному колосі проводили в трьох повторностях.

### Результати та обговорення

Першим етапом роботи був аналіз гібридних сімей, попередньо перевірених на наявність та гомозиготність гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, на встановлення алельного стану генів *Glu-1*.

Найціннішою алеллю для якості борошна вважається *Glu-D1d*. Типова електрофореграма дуплексної ПЛР представлена на рис. 1.

Цією системою молекулярно-генетичних маркерів було перевірено 44 гібридні сім'ї. Довжина очікуваних ампліконів становила: *Glu-D1(5)* – 281 пар нуклеотидів (пн), *Glu-D1(2)* – 299 пн, *Glu-D1(10)* – 397 пн, *Glu-D1(12)* – 415 пн. Обоє батьків несли алель *Glu-D1d*, тому поліморфізму у гібридних сімей не виявлено. Всі вони мали алельний стан гена *Glu-D1d*.

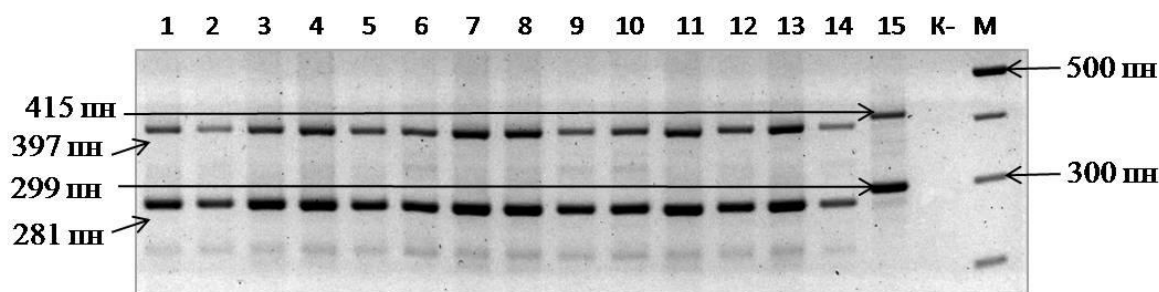


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ділянок гена *Glu-D1*: 1–12 – гібридні сім'ї 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17; 13 – сорт Куяльник, носій *Glu-D1d*; 14 – донор, лінія Glu-Pro; 15 – сорт Золотоколоса, контроль на алель *Glu-D1a*; K – негативний контроль, без ДНК; M – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Наступним етапом роботи був аналіз ділянки гена *Glu-A1*. Материнський сорт пшениці Куяльник несе алель *Glu-A1b*, який кодує субодиницю 2\*, тоді як батьківська донорна лінія несе алель *Glu-A1a* (субодиниця 1), що показано

в попередніх дослідженнях білкових фракцій у поліакриламідному гелі [15]. Типова електрофореграма дуплексної ПЛР представлена на рис. 2.

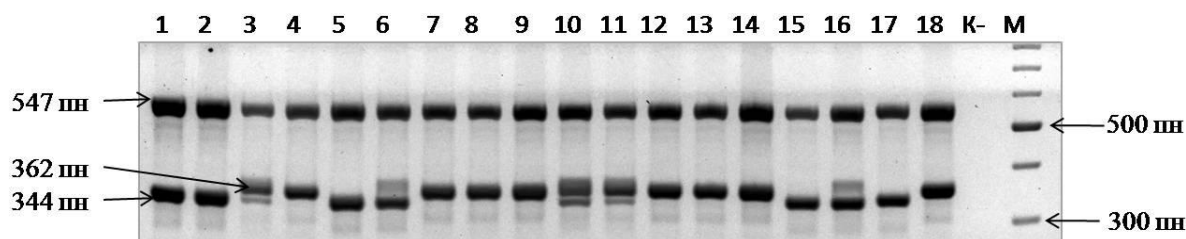


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ділянок генів *Glu-A1* та *actin*: 1–16 – гібридні сім'ї 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21; 17 – сорт Куяльник, носій *Glu-A1b*; 18 – донор, лінія *Glu-Pro*; К – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Довжина очікуваних ампліконів: для референтного гена *actin* – 547 пн, у разі наявності субодиниці *Glu-A1b* – 344 пн, відсутності – 362 пн. Серед перевірених 44 сімей було виявлено, що 11 із них несуть *Glu-A1b*, 22 – *Glu-A1a*, а 11 – гетерозиготні. Субодиниці 1 та 2\* однаково добре впливають на якість борошна, тому

для нас представляють цінність стабільні гомозиготні сім'ї з будь-якою із цих алелей.

Гібридні сім'ї також аналізували на наявність субодиниці *Glu-B1a1*, яка присутня лише у материнського сорту Куяльник, тоді як батьківська лінія несе *Glu-B1d*, який кодує синтез субодиниць 6 та 8. Типова електрофореграма мультіплексної ПЛР наведена на рис. 3.

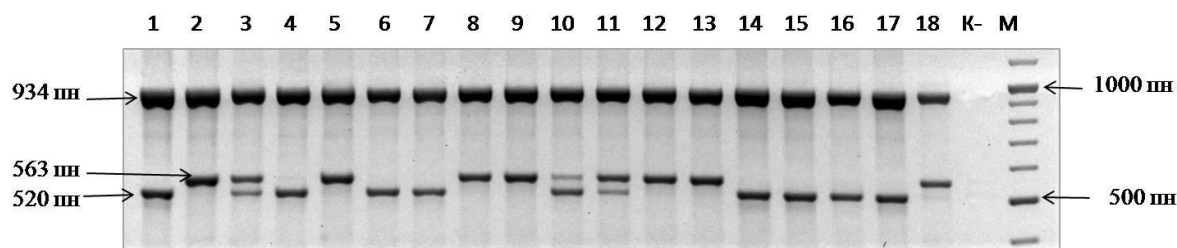


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації регіону MAR гена *Glu-B1a1* та референта *TaTM20*: 1–16 – гібридні сім'ї 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21; 17 – донор, лінія *Glu-Pro*; 18 – сорт Куяльник, містить *Glu-B1a1*; К – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Довжина очікуваних ампліконів: для референтного гена *TaTM20* – 934 пн, за наявності *Glu-B1a1* – 563 пн, відсутності – 520 пн. Серед перевірених 44 гібридних сімей було виявлено 21-у сім'ю, що несе *Glu-B1a1*, 16 сімей, що несуть *Glu-B1d*, і 7 сімей гетерозиготних. Цінними є сім'ї, що несуть алель *Glu-B1a1*, тому що наявність *Glu-B1d* значно знижує якість борошна.

Для попередньої оцінки продуктивності було обраховано масу 1000 зерен, масу зерна з

одного колоса і кількість зерен в одному колосі для кожної гібридної сім'ї (табл.).

Показники продуктивності порівнювали з вихідним сортом Куяльник, який є високопродуктивним районуваним сортом м'якої озимої пшениці. Серед 44-х гібридних сімей 8 мали масу більшу за 39,5 грамів, що є показником сорту Куяльник. Для більшості сімей маса 1000 зерен була прямо залежна від маси зерен в одному колосі.

Таблиця. Зведені результати визначення показників продуктивності та алельного стану локусу *Glu-1*

№ сім'ї	Маса 1000 зерен, г	Кількість зерен в 1 колосі, шт	Вага зерен з 1 колосу, г	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>
1	37,58	36	1,692	b	d	d
2	36,51	40	1,554	b	al	d
5	34,23	48	1,757	b/a	al/d	d
7	32,23	42	1,676	a	d	d
8	30,96	38	1,413	b	al	d
9	33,45	59	1,765	b/a	d	d
10	28,35	55	1,648	a	d	d
11	31,73	45	1,696	a	al	d
12	37,00	53	2,125	a	al	d
14	30,95	49	1,507	b/a	al/d	d
15	30,39	51	1,703	b/a	al/d	d
17	27,53	62	1,683	a	al	d
18	36,13	45	1,718	a	al	d
19	32,87	42	1,488	a	d	d
20	29,83	50	1,465	b	d	d
21	23,40	54	1,448	b/a	d	d
30	31,39	55	1,702	a	d	d
35	36,53	55	2,168	a	al	d
36	41,01	55	2,226	b	al	d
38	36,47	37	1,316	a	al	d
39	38,10	39	1,503	a	al	d
40	40,93	56	2,261	a	al	d
41	36,89	38	1,378	a	al	d
42	36,65	57	2,211	b/a	al/d	d
44	39,16	54	2,126	b/a	al	d
45	40,57	53	2,154	b/a	al/d	d
46	59,38	47	2,194	b/a	al	d
49	43,08	51	2,323	b/a	al	d
50	45,35	48	2,048	a	al/d	d
51	35,51	54	1,999	a	d	d
56	37,97	53	2,029	a	d	d
58	36,36	44	1,861	b	al	d
60	38,60	49	1,903	b	d	d
62	32,23	53	1,653	a	al/d	d
64	38,22	49	1,832	a	al	d
66	34,37	44	1,364	a	d	d
67	38,70	55	2,130	b	d	d
68	37,50	52	1,996	a	al	d
75	36,57	51	1,894	b/a	al	d
76	27,10	52	1,451	b/a	al	d
80	37,86	35	1,512	b	d	d
81	57,04	51	2,238	b	d	d
84	40,32	49	2,016	b	d	d
86	34,51	43	1,464	a	al	d
Куял.	39,50	53	2,115	b	al	d
Glu-Pro	28,15	49	1,503	a	d	d

Примітки: Куял. – сорт Куяльник, материнська форма. Glu-Pro – батьківська лінія-донор гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*.

## Висновки

Проведено оцінку 44 гібридних сімей F<sub>5</sub> покоління, носіїв гена *Gpc-B1*, взятого від дикої полби *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* на наявність алельних субодиниць генів *Glu-1* запасних білків. По трьох локусах *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* виявлено 16-ть найбільш цінних сімей – 2, 8, 11, 12, 17, 18, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 58, 64, 68, 86. Вони містять оптимальну для хлібопекарської якості алельну формулу локусу *Glu-1* (*Glu-A1a* або *Glu-A1b*, *Glu-B1a1*, *Glu-D1d*). За результата-

ми аналізу маси 1000 зерен виявлено, що дві (№ 36, 40) з 16 сімей мають значення маси більше за материнський сорт. Показано, що комбінування в нащадках алелей, відповідальних за підвищення якості борошна, є важливим етапом створення екстрасильних сортів пшениці. Максимальний ефект цінного алеля досягається правильним підбором генетичного оточення. Отримані експериментальні дані дають можливість комплексно підійти до відбору гібридних сімей у селекції озимої м'якої пшениці.

## Література

1. Ларченко К.А., Моргун Б.В. Ознаки якості зерна пшениці та методи їх поліпшення // Физиология и биохимия культурных растений. – 2010. – Т. 42, № 6. – С. 463–474.
2. Yasmeen F., Khurshid H., Ghafoor A. Genetic divergence for high-molecular weight glutenin subunits (HMW-GS) in indigenous landraces and commercial cultivars of bread wheat of Pakistan // Genetics and Molecular Research. – 2015. – V. 14 (2). – P. 4829–4839.
3. Атабаева Х.Н., Массино И.В. Биология зерновых культур. – Ташкент: Гос. науч. изд. «Узбекистон миллий энциклопедияси», 2005. – 204 с.
4. 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. – V. 58. – P. 113–120.
5. Payne P. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality // Ann. Rev. Plant Physiol. – 1987. – V. 38. – P. 141–153.
6. Payne P., Corfield K., Holt L., Blackman J. Correlations between the inheritance of certain high-molecular-weight glutenin subunits and bread-making quality in progenies of six crosses of bread wheat // J. Sci. Food. Agric. – 1981. – V. 32. – P. 51–60.
7. Рибалка О.І., Литвиненко М.А. Новітні генетичні аспекти поліпшення якості пшениці // Вісн. аграр. науки. – 2009. – № 4. – С. 35–39.
8. Молоцький М.Я., Васильківський С.П., Князюк В.І., Власенко В.А. Селекція і насінництво сільськогосподарських рослин. – К.: Вища освіта, 2006. – 463 с.
9. Жемела Г.П., Кузнецова О.А. Вплив сортових властивостей на продуктивність та якість зерна пшениці м'якої озимої // Сільське господарство. Рослиництво. – 2012. – № 3. – С. 23–25.
10. Целуйко О.А., Медведева В.И. Зависимость массы 1000 зерен сельскохозяйственных культур от удобрений // Агронмия и лесное хозяйство. – 2014. – № 2 – С. 58–60.
11. Похилько С.Ю., Трояновська А.В., Степаненко А.І., Урбанович О.Ю., Дуган О.М., Рибалка О.І., Моргун Б.В. Дослідження генотипів пшениці м'якої з перенесеним геном *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К.: Логос, 2016. – Т. 18. – С. 132–135.
12. Stewart C.N., Via L.E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications // BioTechniques. – 1993. – V. 14, No. 5. – P. 748–749.
13. Степаненко А.І. Розробка систем молекулярно-генетичних маркерів для детекції якісних ознак у пшениці та ячменю : дис. канд. біол. наук: 03.00.20. – К., 2015. – 164 с.
14. ДСТУ 4138–2002. Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості. – Держспоживстандарт України. – 2013. – С. 172.
15. Похилько С.Ю., Моргун Б.В., Степаненко А.І., Дуган О.М. Аналіз білкових фракцій озимої пшениці носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* // Матеріали I міжнародної науково-практичної інтернет конференції «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації», 14–15 грудня 2016 р. – К., 2016. – С. 432.

**POKHYLKO S.Yu.<sup>1,2</sup>, STEPANENKO A.I.<sup>1,3</sup>, DUGAN O.M.<sup>2</sup>, MORGUN B.V.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 148, molgen@icbge.org.ua*

<sup>2</sup> *National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute", Ukraine, 03056, Kyiv, Peromohy ave., 37*

<sup>3</sup> *Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17*

#### **DETERMINATION OF ALLELIC VARIANTS OF GENE *GLU-1* IN HYBRID FAMILIES, BEARING GENE *GPC-B1* OF *TRITICUM TURGIDUM* SSP. *DICOCCHOIDES***

**Aim.** The aim of our study was to analyze the hybrid families of generation F<sub>5</sub> carrying gene *Gpc-B1* of *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* for the allelic state of *Glu-1*, to calculate 1000 kernel weight and to select families with the best set of alleles and performance. **Methods.** Polymerase chain reaction for molecular genetic analysis and calculation of the 1,000-kernel weight for wheat grain yields were used. **Results.** Determination of the three loci *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* shows that among 44 hybrid families it is possible to identify 16 most promising families that have the most valuable allelic variants. Furthermore, given the analysis of the 1,000-kernel weight, two families (#36 and 40) having the highest values can be selected among those 16 families. **Conclusions.** The results of study enable a comprehensive approach to the selection of progeny with the best genetic base, which will be used in breeding of soft winter wheat later on.

**Keywords:** *Triticum aestivum* L., gene *Gpc-B1*, *Glu-1* loci, PCR, molecular markers.