

ПОХИЛЬКО С.Ю.^{1,2}✉, ТРОЯНОВСЬКА А.В.³, СТЕПАНЕНКО А.І.^{1,4}, УРБАНОВИЧ О.Ю.⁵,
ДУГАН О.М.², РИБАЛКА О.І.³, МОРГУН Б.В.^{1,4}

¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, 03143, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

² Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»,
Україна, 03056, м. Київ, пр. Перемоги, 37

³ Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства і сортовивчення НААН України,
Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дорога, 3

⁴ Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17

⁵ ДНЗ Інститут генетики і цитології НАН Білорусі,
Білорусь, 220072, м. Мінськ, вул. Академічна, 27

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

ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНОТИПІВ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ З ПЕРЕНЕСЕНИМ ГЕНОМ *GPC-B1* ВІД *TRITICUM TURGIDUM* SSP. *DICOCCOIDES*

На пшеницю припадає 25% світового білкового харчування, також вона є важливим джерелом мікроелементів. Тому якість зерна пшениці стає однією з основних характеристик селекційних програм, що також пов'язано з більш високими стандартами споживачів, імпортерів, виробників. Збільшення урбанізації привело до зміни харчових раціонів людей і збільшення попиту на пшеницю з певними атрибутами якості. Підвищення вмісту білка в зерні (*GPC-grain protein content*) є важливим напрямком селекції пшениці, оскільки від цього залежать якість хліба, макаронів, тістечок та висока поживна цінність продуктів.

Проте складність у процесі підвищення у зерні вмісту білка зумовлює високий екзогенний ефект і складність комплексу генетичних систем, що регулюють цю характеристику [1]. Особливий інтерес у цьому напрямку становить ген *Gpc-B1*, що розташований на хромосомі 6BS [2], який збільшує накопичення білка (в середньому 14 г на кг⁻¹) у гексаплоїдній та тетраплоїдній пшениці в різних кліматичних умовах [2, 3]. Вперше ген *Gpc* був ідентифікований в дикій полбі *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. Вчені Jorra і Cantrell у 1990 році шляхом заміщення 6В хромосоми від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* у сорт Langdon довели, що цей ген міститься на хромосомі 6В.

Ген *Gpc* також відповідає за прискорене старіння листя та зумовлює ефект підвищеної концентрації у зерні пшениці важливих мікроелементів, таких як *Zn*, *Mn* та *Fe*. Ефект локусу було ретельно вивчено та показано суттєве збільшен-

ня у порівнянні з вихідною лінією вмісту в зерні цинку (60 мг/кг порівняно з 47,5 мг/кг), заліза (44,2 мг/кг порівняно з 35,9 мг/кг), марганцю (53,9 мг/кг порівняно з 40,9 мг/кг) та білка (14,4% порівняно з 10,8%) [4, 5].

Мета нашого дослідження – охарактеризувати генотипи з геном *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* у геномі м'якої озимої пшениці *T. aestivum* сорту Куяльник шляхом встановлення факту рекомбінації між хромосомами 6В *T. aestivum* і *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* та виявити алельні стани генів, які зумовлюють твердозерність.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження слугували гібридні лінії м'якої пшениці F₂, F₃ та F₄, які були отримані від схрещування сорту Куяльник *T. aestivum* з лінією – донором гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*. Виділення загальної рослинної ДНК проводили ЦТАБ-методом із зеленої маси листя та зернівок [6]. Реакційні суміші включали: по 0,5 мкМ форвардного та реверсного праймерів, по 2 мкл буфера для ПЛР 10 × Dream Taq Green Buffer (Thermo Scientific), по 0,2 мМ кожного дезоксирибонуклеотид-3-фосфату (Thermo Scientific), 0,5–0,75 од. полімерази Dream Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific), 100 нг сумарної рослинної ДНК, загальний об'єм реакції 20 мкл.

Для дослідження наявності гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* використовували домінантну та кодомінантну системи молекулярно-генетичних маркерів. Для встановлення фак-

ту рекомбінації між хромосомами 6В *T. aestivum* та *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* були використані кодомінантні системи молекулярно-генетичних маркерів до локусів *Xgwm508* (6BL), *Xgwm193* (6BL), *Xgwm626* (6BS) та *Xgwm219* (6BS) [7, 8].

Умовами мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції на ген *Gpc-B1* та референтний ген *Actin* були: денатурація 94 °С – 4 хв, 35 циклів: денатурація 94 °С – 30 с, ренатурація 64 °С – 1 хв, елонгація 72 °С – 1 хв 40 с, завершальна елонгація 72 °С – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів у реакції – 0,5 мкМ.

Умовами апмліфікації кодомінантної системи для визначення гена *Gpc-B1* були: денатурація 94 °С – 4 хв, 10 циклів: денатурація 94 °С – 30 с, ренатурація 65 °С – 30 с (зниження температури на 1 °С в кожному циклі), елонгація 72 °С – 20 с, потім 25 циклів: денатурація 94 °С – 30 с, ренатурація 55 °С – 20 с, елонгація 72 °С – 20 с; завершальна елонгація 72 °С – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів у реакції – 0,5 мкМ.

Умовами ПЛР для визначення локусу *Xgwm508* були: денатурація 94 °С – 4 хв, 35 циклів: денатурація 94 °С – 30 с, ренатурація 54 °С – 30 с, елонгація 72 °С – 30 с, завершальна елонгація 72 °С – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів у реакції – 0,5 мкМ.

Умовами ПЛР для визначення локусу *Xgwm193* були: денатурація 94 °С – 4 хв, 35 циклів: денатурація 94 °С – 30 с, ренатурація 60 °С – 30 с, елонгація 72 °С – 25 с, завершальна елонгація 72 °С – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів у реакції – 0,5 мкМ.

Умовами ПЛР для визначення локусу *Xgwm626* були: денатурація 94 °С – 4 хв, 35 циклів: денатурація 94 °С – 30 с, ренатурація 50 °С – 30 с, елонгація 72 °С – 25 с, завершальна елонгація 72 °С – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів у реакції – 0,5 мкМ.

Умовами ПЛР для визначення локусу *Xgwm219* були: денатурація 94 °С – 4 хв, 35 циклів: денатурація 94 °С – 30 с, ренатурація 62 °С – 30 с, елонгація 72 °С – 25 с, завершальна елонгація 72 °С – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів у реакції – 0,5 мкМ.

Розділення продуктів ампліфікації проводили за допомогою електрофорезу в агарозних гелях концентрацією 1,5, 2 та 3% з використанням бромистого етидію як барвника у натрій-боратному буфері [9]. Візуалізацію продуктів ампліфікації здійснювали в ультрафіолетовому світлі за допомогою фотосистеми Canon EOS 600D.

Частоту рекомбінації обраховували згідно з методикою генетичного аналізу рослин [10].

Результати та обговорення

Першим етапом нашої роботи була перевірка гібридних ліній озимої м'якої пшениці F₂ та F₃ на наявність гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* за допомогою доміантної системи молекулярно-генетичних маркерів. Очікувані амплікони 1600 п.н. ген *Gpc-B1* і 500 п.н. референтний ген *Actin*. Типова електрофореграма мультиплексної ПЛР представлена на рис. 1.

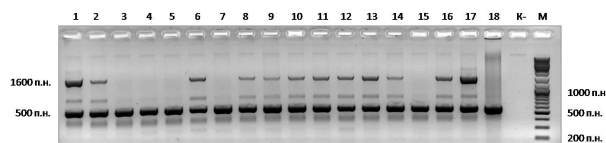


Рис. 1. Типова електрофореграма результатів мультиплексної ПЛР на наявність гена *Gpc-B1* та референтного гена *Actin*. Доріжки 1–16 – дослідні зразки; 17 – лінія пшениці, що несе ген *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*; 18 – сорт Куяльник; К – негативний контроль (без ДНК); М – маркер молекулярної маси Gene Ruler™ DNA Ladder Mix

Результати аналізу ДНК F₂ і F₃ покоління гібридів за цим маркером дали змогу відібрати гібриди з генотипом, ідентичним за геном *Gpc-B1*, який також спостерігався у батьківській лінії, кількість таких зразків становила 81,8% від загальної кількості проаналізованих зразків.

Оскільки, насамперед, для подальшого планування схрещувань нас цікавили генотипи з геном *Gpc-B1*, нами було відібрано 81 зразок пшениці F₃, у яких спектр ампліфікації збігався зі спектром батьківської форми, лінією – донором гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*.

При перевірці гібридів четвертого покоління на наявність гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* була використана кодомінантна молекулярно-генетична система маркерів. Очікувані амплікони 122 п.н. свідчать про алель гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, амплікон 126 п.н. – про наявність неактивного алеля від *T. aestivum*, присутність двох фрагментів показує гетерозиготний стан гібрида [11]. Типова електрофореграма мультиплексної ПЛР представлена на рис. 2.

Розробленою молекулярно-генетичною системою маркерів було перевірено 59 гібридів м'якої пшениці, які були відібрані з урахуванням фенотипових характеристик. Було показано, що 34 зразки несли ген *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp.

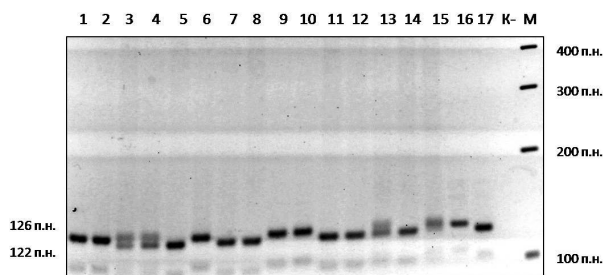


Рис. 2. Типова електрофореграма результатів ампліфікації ділянки гена *Gpc-B1*. Доріжки 1–15 – дослідні зразки; 16 – сорт Куяльник; 17 – лінія пшениці, що несе ген *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*; К- негативний контроль (без ДНК); М – маркер молекулярної маси Gene Ruler™ DNA Ladder Mix

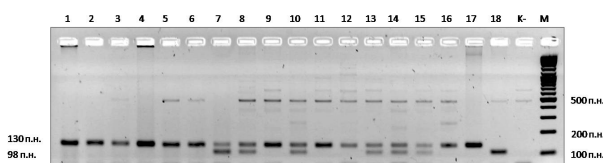


Рис. 3. Типова електрофореграма результатів ампліфікації локусу *Xgwm626*. Доріжки 1–16 – дослідні зразки; 17 – лінія пшениці, що має 6В хромосому від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*; 18 – м'яка пшениця – носій 6В хромосоми *T. aestivum* L.; К- негативний контроль (без ДНК); М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

dicoccoides, 11 зразків не містили його і 14 зразків були гетерозиготні, тобто несли гени від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* і від *T. aestivum*. Гібриди, що містили геном *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, були відібрані для розмноження з метою подальших досліджень.

Для з'ясування факту рекомбінації наступним кроком було проведення оцінки позитивних зразків за кодомінантними системами мікросателітних маркерів геному пшениці, які локалізовані в різних плечах хромосоми 6В *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm626* та *Xgwm219*.

Типові електрофореграми результатів ПЛР локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193* та *Xgwm219* наведено на рис. 3–6.

Наявність алеля SSR локусу *Xgwm626* від *T. aestivum* L. спостерігали у ліній 526/140, 526/151, 527/52 та 527/53. Частота рекомбінації за цим локусом становить $2,98 \pm 1,29\%$.

Наявність алеля SSR локусу *Xgwm219* від *T. aestivum* L. спостерігали у ліній 526/121, 526/153, 526/156, 526/164, 527/16, 527/44, 527/52 та 527/53. Частота рекомбінації за цим локусом становить $6,77 \pm 2,08\%$.

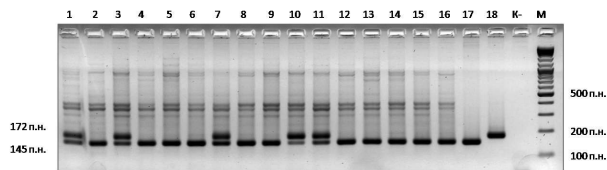


Рис. 4. Типова електрофореграма результатів ампліфікації локусу *Xgwm219*. Доріжки 1–16 – дослідні зразки; 17 – лінія пшениці, що має 6В хромосому *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*; 18 – м'яка пшениця – носій 6В хромосоми *T. aestivum* L.; К- негативний контроль (без ДНК); М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

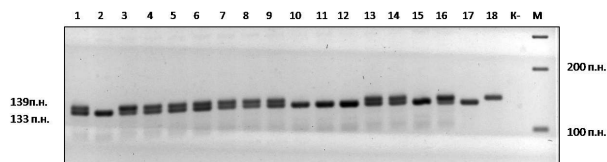


Рис. 5. Типова електрофореграма результатів ампліфікації локусу *Xgwm508*. Доріжки 1–16 – дослідні зразки; 17 – лінія пшениці, що має 6В хромосому *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*; 18 – м'яка пшениця – носій 6В хромосоми *T. aestivum* L.; К- негативний контроль (без ДНК); М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

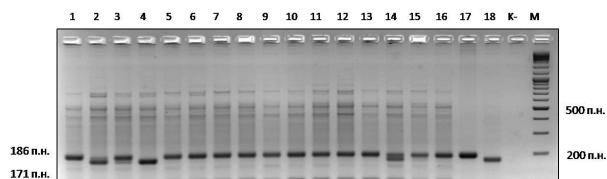


Рис. 6. Електрофореграма результатів ПЛР локусу *Xgwm193*. Доріжки 1–16 – дослідні зразки; 17 – лінія пшениці, що має 6В хромосому *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*; 18 – м'яка пшениця – носій 6В хромосоми *T. aestivum* L.; К- негативний контроль; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Наявність алеля SSR локусу *Xgwm508* від *T. aestivum* L. спостерігали у ліній 526/121, 527/14, 527/51 та 527/52. Частота рекомбінації за цим локусом становить $2,94 \pm 1,28\%$.

Наявність алеля SSR локусу *Xgwm193* від *T. aestivum* L. спостерігали у ліній 526/121, 526/123, 526/146, 527/52 та 527/53. Частота рекомбінації за цим локусом становить $3,96 \pm 1,50\%$.

У співпраці з Білоруським інститутом генетики і цитології НАН було проведено дослідження генів твердозерності відібраних найкращих гібридних ліній пшениці, які були носіями

гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*. З 10 досліджуваних ліній 4 містили одночасно функціональні або «дикі» алелі генів *PinA* (*PinA-D1a* алель) і *PinB* (*PinB-D1a* алель), що свідчить, що ці лінії пшениці м'язоцерні; 6 містили або делецію гена *PinA* (*PinA-D1b* алель), або одну з «мутантних» форм гена *PinB* (*PinB-D1b-g* або *pinB-D11* алель), це свідчить, що ці лінії твердозерні. Отримана інформація дуже важлива, адже можливість отримання м'язоцерних і твердозерних сортів пшениці з носієм гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* відкриває більш широкі можливості використання цієї пшениці в різних галузях харчової промисловості.

Висновки

Проведено оцінку трьох поколінь гібридних ліній на наявність гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp.

dicoccoides. Встановлено факт рекомбінації на хромосомі 6В та визначено частоту рекомбінації *Xgwm508* – $2,94 \pm 1,28\%$, *Xgwm193* – $3,96 \pm 1,50\%$, *Xgwm626* – $2,98 \pm 1,29\%$ та *Xgwm219* – $6,77 \pm 2,08\%$. У лінії 527/52 виявили алелі всіх 4 SSR локусів від *T. aestivum* (сорт Куяльник). Таким чином, результати проведеного маркерного аналізу дали змогу виявити перспективну гібридну лінію для подальшого схрещування, яка є носієм гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* та має при цьому досліджувані мікросателітні локуси від сорту Куяльник. Показано поліморфізм генів *PinA*, *PinB* у відібраних лініях, що відкриває нові можливості перед селекціонерами щодо створення твердозерних і м'язоцерних ліній – носіїв гена *Gpc-B1*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Simmonds N. The relation between yield and protein in cereal grain // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 1995. – № 67, № 2. – P. 309–315.
2. Olmos S., Distelfeld A., Chicaiza O., Schlatter A.R., Fahima T., Echenique V., Dubcovsky J. Precise mapping of a locus affecting grain protein content in durum wheat // Theoretical and Applied Genetics. – 2003. – 107, № 7. – P. 1243–1251.
3. Joppa L.R., Du C., Hart G.E., Hareland G.A. Mapping gene(s) for grain protein in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) using a population of recombinant inbred chromosome lines // Crop Science. – 1997. – 37, № 5. – P. 1586–1589.
4. Uauy C., Brevis J.C., Dubcovsky J. The high grain protein content gene *Gpc-B1* accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat // J. Exp. Bot. – 2006. – 57, № 11. – P. 2785–2794.
5. Tabbita F., Lewis S., Vouilloz J.P., Ortega M.A., Kade M., Abbate P.E., Barneix A.J. Effects of the *Gpc-B1* locus on high grain protein content introgressed into Argentinean wheat germplasm // Plant Breeding. – 2013. – 132, № 1. – P. 48–52.
6. Stewart C.N., Via L.E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications // BioTechniques. – 1993. – 14, № 5. – P. 748–749.
7. Marker Assisted Selection of Wheat [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://maswheat.ucdavis.edu>.
8. Rüder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.-H., Leroy Ph., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat // Genetics. – 1998. – 149, № 4. – P. 2007–2023.
9. Brody J., Kern S. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis // Anal. Biochem. – 2004. – 333. – P. 1–13.
10. Нецветаев В.П. Руководство по генетическому анализу растений: учеб.-метод. пособие для студ. 4–5 курсов биол. спец. ун-тов, аспирантов и науч. сотр. – Белгород: Изд-во БелГУ, 2008. – 36 с.
11. Скриник М.М., Похилько С.Ю., Степаненко А.І. Розробка кодомінантної системи маркерів для визначення гена *Gpc-B1* в гібридах м'якої пшениці // Матеріали X Міжнародної конференції молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери», 2–4 грудня 2015 р. – Харків: ФОП Шаповалова Т.М., 2015. – С. 41.

**POKHLYKO S.YU.^{1,2}, TROYANOVSKA A.V.³, STEPANENKO A.I.^{1,4}, URBANOVICH O.YU.⁵,
DUGAN O.M.², RYBALKO O.I.³, MORHUN B.V.^{1,4}**

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

² National Technical University of Ukraine «KPI», Ukraine, 03056, Kyiv, ave. Pobedy, 37

³ The Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed & Cultivar Investigation of the Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopol'skaya road, 3

⁴ Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kiev, Vasilkivska str., 31/17

⁵ Institute of genetics and Cytology of NAS of Belarus, Republic of Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27

STUDIES OF BREAD WHEAT GENOTYPES WITH TRANSFERRED GENE *Gpc-B1* OF *TRITICUM TURGIDUM* SSP. *DICOCCOIDES*

Aim. The aim of our study was to characterize genotypes with gene *Gpc-B1* from *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* in the genome of bread winter wheat pedigrees *T. aestivum* cv. Kuyalnyk by the finding of recombination between 6B chromosomes of *T. aestivum* and *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, and to detect allelic gene states that cause solid grain.

Methods. Polymerase chain reaction was used for molecular genetic analysis. **Results.** Three generations of wheat hybrid lines were studied for the presence of gene *Gpc-B1*. The recombination frequency microsatellite loci counted: *Xgwm508* – 2.94±1.28%, *Xgwm193* – 3.96±1.50%, *Xgwm626* – 2.98±1.29% and *Xgwm219* – 6.77±2.08%. The polymorphism of gene *PinA*, *PinB* was evaluated. **Conclusions.** The results of DNA marker analysis revealed a promising hybrid line that is a carrier of gene *Gpc-B1* from *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* and contains microsatellite loci of cv. Kuyalnyk.

Keywords: *Triticum aestivum* L., *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, gene *Gpc-B1*, PCR, molecular markers.