

Наведено результати визначення ефектів гетерозису та вивчення комбінаційної здатності уельсів при реципрокних поєднаннях з великою білою та полтавською м'ясною породами. Проведено оцінку кращих поєднань за участю тварин уельської породи свиней.

Приведены результаты определения эффекта гетерозиса и изучения комбинационной способности уэльсов при реципрокных сочетаниях с крупной белой и полтавской мясной породами. Проведена оценка лучших сочетаний приу частии животных уэльской породы свиней.

ЧЕБОТАР С.В.¹, ХОХЛОВ О.М.², КУРАКИНА Е.О.¹, СИВОЛАП Ю.М.¹

¹ Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН,

Україна, 65036, Одеса, Овідіонільська дорога, 3, e-mail: schebotar@yahoo.com

² Селекційно генетичний інститут НАЦ-НАІС,

Україна, 65036, Одеса, Овідіонільська дорога, 3

АНАЛІЗ АЛЕЛЬНОГО СТАНУ ГЕНІВ *Pina-D1* і *Pinb-D1* В ГЕНОТИПАХ УКРАЇНСЬКИХ СОРТІВ ПШЕНИЦІ

На основі текстури ендосперму сорти ботанічного виду м'якої пшениці розподіляються на дві великі групи – твердозерні (hard) та м'якозерні (soft). Твердозерна м'яка пшениця використовується в хлібопекарній промисловості. При помолі зерна твердозерної пшениці отримують „free-flowing” борошно, яке при замісі тіста добре утримує воду. Ця здатність досить важлива у хлібопекарному процесі, оскільки білки ендосперму, набираючи вологу, формують в'язко-еластичну масу – клейковину, яка в ході бродіння та випічки утримує гази в тісті, чим дає змогу хлібу підійматися [1]. Борошно з м'якозерних сортів м'якої пшениці менше поглинає воду, завдяки цьому більше підходить для виготовлення печива та бісквітів.

На сьогодні відомо, що фенотипічна різниця твердозерність / м'якозерність, контролюється декількома генами, які близько зчеплені та локалізовані на короткому плечі хромосоми 5D [2, 3], у так званому *Ha* (*Hardness*) локусі. У цьому локусі локалізовані гени, що кодуєть три поліпептиди, з яких, як вважають, складається білок фріабілін: пуруіндоліни *a* (*Pina*) і *b* (*Pinb*) з вираженою здатністю пов'язуватися із ліпідами, та, в меншій пропорції, *Grain Softnes Protein* (*Gsp1*) [4, 5].

Білок фріабілін розміром близько 15кДа [6] локалізується на поверхні крохмальних гранул у пшениць з м'якою текстурою ендосперму та відсутній у твердозерних м'яких пшениць і сортів твердої пшениці (*Triticum durum* L.). Пуруіндоліни *a* і *b* взаємодіють як гетеродимери [7] та пов'язують гранули крохмалю з мембранними ліпідами амілопластів. Ці поліпептиди є представниками специфічної групи низькомолекулярних протеїнів злаків, багатих на цистеїн та триптофан. Їх назва походить з термінів “*rugos*”, який означає зерно на грецькій мові та “*indolin*”, який вказує на хімічну номенклатуру індолінових продуктів, що утворюються триптофаном.

Пуруіндолінові протеїни показують між собою 71% гомології, а в порівнянні з *Gsp* вона сягає 57-58% [8].

Дослідження мутацій [9,10], а також роботи по створенню трансгенної пшениці [11] свідчать, що за різницю у текстурі зерна відповідають пуруіндолінові гени. На противагу цьому, варіація доз *Gsp1* генів не показала впливу на твердість зерна [10].

Огляд світових літературних джерел [7, 10, 12, 13, 14, 15] свідчить про можливість ефективного використання молекулярних маркерів для диференціювання алельного стану генів *Pina-D1* та *Pinb-D1* пуруіндолінів *a* і *b*.

Згідно з останніми літературними даними, градація ознаки твердозерності зерна пшениці в значній мірі зумовлена різноманітними сполученнями алелів пуруіндолінових генів *Pina-D1* та *Pinb-D1*.

Дикий тип м'яких пшениць має м'яку текстуру ендосперму, це пов'язано з алелями пуруіндолінових генів - *Pina-D1a* та *Pinb-D1a*.

У твердозерних пшениць *Triticum aestivum* L. перший або другий пуруіндоліновий ген, або продукти цих генів атрофовані не функціональною мутацією. Перша виявлена мутація, що впливає на твердозерність, була описана як така, що призводить до заміни гліцина на серин в позиції 46 пуруіндолінового протеїну *b* (*pinb-D1b*, [12]. З того часу було описано декілька алельних станів для пуруіндолінових генів (табл. 1).

Таблиця 1

Алельні стани пуруіндолінових генів

Алелі <i>Pina-D1</i>	Алелі <i>Pinb-D1</i>	Зміни на молекулярному рівні	Фенотип	Літературне джерело
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>	-	М'якозерність, дикий тип	[12]
<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	-	Твердозерність, <i>pin-a</i> null	[7]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	Gly-46 на Ser-46	Твердозерність	[12]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1c</i>	Leu-60 на Pro-60	Твердозерність	[13]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1d</i>	Trp-44 на Arg-44	Твердозерність	[13]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1e</i>	Trp-39 на стоп кодон	Твердозерність, <i>pin-b</i> null	[15]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1f</i>	Trp-44 на стоп кодон	Твердозерність, <i>pin-b</i> null	[15]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1g</i>	Cys-56 на стоп кодон	Твердозерність, <i>pin-b</i> null	[15]
<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1h(t)</i>	Делеція дистальної ділянки 5DS	Твердозерність, <i>pin-a</i> и <i>pin-b</i> null	[16]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1i(t)</i>	Зсув рамки зчитування	Твердозерність, <i>pin-b</i> null	[16]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1p</i>	Зсув рамки зчитування	Твердозерність <i>pin-b</i> null	[17]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1q</i>		Твердозерність	[18]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1r</i>	Зсув рамки зчитування та передчасний стоп кодон	Твердозерність	[19]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1s</i>	Зсув рамки зчитування і транзиція А (205) → G	Твердозерність	[19]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1t</i>	Gly-47 на Arg-47	Твердозерність	[20]
<i>Pina-D1l</i>	<i>Pinb-D1a</i>	Делеція Cyt-265	Твердозерність	[20]
<i>Pina-D1m</i>	<i>Pinb-D1a</i>	Pro-35 на Ser-35	Твердозерність	[20]
<i>Pina-D1n</i>	<i>Pinb-D1a</i>	Trp-43 на стоп кодон	Твердозерність	[20]

Матеріали і методи

В роботі досліджено українські сорти озимої м'якої пшениці: Альбатрос, Вимпел, Вікторія одеська, Застава, Знахідка, Зустріч, Красуня одеська, Лада, Лелека, Леля, Лузанівка одеська, Любава, Ніконія, Обрій, Одеська 16, Одеська 51, Одеська 132, Одеська 133, Одеська 162, Одеська 265, Одеська 267, Одеська червоноколоса, Панна, Порада, Пріма, Селянка, Сирена, Струмок, Тіра, Українка одеська, Фантазія (селекції СГІ); Білоцерківська напівкарликова (ЩБ); Донецька 46 (Донецький І АПВ); Мирич,

Мирлебен, Миронівська 27, Миронівська 33, Мирхард (МНІССП); Херсонська остиста (УкрНДІЗ), а також сорти і форми, які використовуються в селекційних програмах в Україні - Безоста 1 (НДІСГ); Донська напівкарликова, Дончанка 3 (Донський СЦ).

Через жорсткий добір на хлібопекарний тип переважна більшість сортів України створених як за часів СРСР, так і в останні роки, є твердозерними. Лише два із досліджених нами сортів, обидва Миронівського селекцентру: Мирлебен (створений за програмою співробітництва з Інститутом зернових культур у Хадмерслебені, Германия) та Миронівська 33 є типово м'якозерними. Для вивчення було також залучено створений у СГІ та районований в Узбекистані експериментальний сорт кормової пшениці Шердор та його 2 сестринські лінії із цілеспрямовано введеними маркерними ознаками екзотичного кольору зерна: *pp* (пурпурний перикарп) та *gg* („житне” голубувато-зелене забарвлення алейрону). Сорт Шердор (лінія Б16) є твердозерним, проте через дуже низьку хлібопекарну якість помилково вважався м'якозерним сортом. Його сестринська лінія Б16 pp перейняла м'якозерний фенотип від донора маркерної ознаки. Лінія Б16 gg є типово твердозерною за фенотипом. Оскільки обидві маркерні ознаки походять від віддалених схрещувань, можна було очікувати наявності у них нетипових алелів пуроіндолінів.

Виділення ДНК проводили за стандартною методикою [21].

Для визначення алелів генів *Pina-D1* та *Pinb-D1* використовували: спрямовану ПЛР з праймерами до гену *Pina-D1* [4], які дозволяють тестувати *pina-D1a* аллель, та з парами праймерів алеле-специфічними до *pinb-D1a* та до *pinb-D1b* алелів [12].

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 зворотнього праймерів, 1 U Hotstar *Taq* полімерази (Qiagen, Hilden, Німеччина). Використовували такі умови ампліфікації: перша денатурація – 95 °С 5 хв, потім 35 циклів: 94 °С – 0,5 хв; 60 °С – 0,5хв; 72 °С – 0,75 хв; заключна елонгація -72 °С – 7 хв. Продукти ПЛР розділяли у 2% агарозному гелі, візуалізували за допомогою забарвлення бромистим етідієм за стандартною процедурою [21].

Результати та їх обговорення

ПЛР, виконана за допомогою специфічних праймерів [4], дозволила виявити продукт ампліфікації розміром 450 п.н. у всіх досліджених сортів, це свідчить про значну перевагу у розповсюдженні алелю *Pina-D1a* у генотипах українських сортів.

Продукт ампліфікації розміром 250 п.н. було отримано з праймерами, що є специфічними для виявлення нуклеотидної послідовності, яка кодує гліцин в положенні 46 білка пуроіндолина *b*, при аналізі сортів Мирлебен, Миронівська 33, форми Б16 pp . Це вказує на те, що в цих генотипах присутній алель *Pinb-D1a*. Він, як відомо, є характерним для м'якозерних сортів, тоді як у твердозерних ген *Pinb* має мутацію, яка призводить до заміни гліцину в положенні 46 білка *pin-b* на серин 46.

Для більшості досліджених сортів ампліфікація з праймерами, специфічними для нуклеотидної послідовності, що кодує серин в положенні 46 білка *pin-b*, визначила у наших дослідженнях відповідний специфічний продукт ампліфікації розміром 250 п.н. Це свідчить, що вказані сорти мають алель *Pinb-D1b*.

Заміна гліцина-46 на серин-46 (*Pinb-D1b*) є найбільш розповсюдженою мутацією, яка зумовлює твердозерність м'якої пшениці. При дослідженні північноамериканських пшениць Морісом з співавторами [15] показано, що дана мутація присутня майже у всіх м'яких озимих (*T. aestivum* L.) твердозерних пшениць за виключенням декількох сортів. Ця мутація також присутня у більшості твердозерних ярих пшениць, хоча вони мають і багато інших алелів. За даними [13] по твердозерним пшеницям, які були представлені якими пшеницями Північної та Східної Європи, з 166 генотипів 100 мали точкову мутацію, яка змінює гліцин-46 на серин-46. З 24 досліджених Британських сортів 20 мали цю мутацію. У більшості ж м'якозерних сортів в положенні 46 присутній гліцин.

Таким чином, за допомогою молекулярних маркерів до генів пуринодолінів *a* і *b*, що контролюють якісний показник зерна м'якої пшениці – твердозерність, здійснено визначення алелів генів *Pina-D1* та *Pinb-D1* в генотипах українських сортів, створених селекційними установами різних кліматичних зон. Досліджено також три російські сорти, що мали свого часу широке розповсюдження в Україні. За результатами аналізу два сорти: Миронівська 33 і Мирлебен та лінія Б16pp показали алельний склад пуринодолінів, найбільш розповсюджений у світі серед м'язозерних сортів (*Pina-D1a*; *Pinb-D1a*). Це знаходиться у повній відповідності з їх фенотипом (Хохлов, неопубліковані данні). Решта сортів за складом пуринодолінів повністю належить до також найбільш розповсюдженого у світі типу – але вже серед твердозерних сортів, тобто має алелі - *Pina-D1a*; *Pinb-D1b*.

Хоча для повної характеристики алельного різноманіття у локусах *Pina-D1a* та *Pinb-D1b* необхідно використовувати значну кількість молекулярних маркерів, проста система ПЛР-праймерів, до найбільш розповсюджених алелів генів пуринодолінових білків дозволяє диференціювати на типи hard/ soft більшу частину вітчизняних сортів. Нами не виявлено регіональної або будь-якої іншої специфіки серед досліджених сортів, що втім не виключає можливості деткції екзотичних алелів при більш широких обстеженнях.

Висновки

1. Встановлена алель на характеристика генів *Pina -D1* та *Pinb- D1* для 45 сортів та форм м'якої пшениці, переважно української селекції.
2. Сорти Миронівська 33 і Мирлебен та лінія Б16 pp показали алельний склад пуринодолінів, найбільш розповсюджений у світі серед м'язозерних сортів (*Pina-D1a*; *Pinb-D1a*).
3. 93 % досліджених сортів мали алельний склад пуринодолінів *Pina-D1a*; *Pinb-D1b*, тобто характеризувались як твердозерні сорти *Triticum aestivum* L.

Література

1. Хохлов О.М. Генетично обумовлена твердість зерна м'якої пшениці (*T. aestivum* L.): стан і перспективи досліджень в Україні // Зб. наук. праць СГІ НАЦ НАІС. – Одеса, 2002. – Вип. 2(42).- С.9-29.
2. Mattern P.J., Morris R., Schmidt J.W., Johnson V.A. Location of genes for kernel properties in the wheat cultivar Cheyenne using chromosome substitution lines. Proc 4th Int Wheat Genet. Symp, University of Missouri, Columbia, Mo.- 1973.- pp 703-707
3. Law C.N., Young C.F., Brown J.W.S., et al. The study of grain protein control in wheat using whole chromosome substitutional lines. In: Seed protein improvement by nuclear techniques. International Atomic Energy Agency. Vienna, Austria.-1978 – pp 483-502.
4. Gautier M.F., Aleman M.E., Guirao A., Marion D., Joudrier P. *Triticum aestivum* puroindolines, 2 basic cysteine-rich seed proteins-cDNA sequence-analysis and development gene-expression// Plant Molecular biology.- 1994.- 25(1):43-57.
5. Rahman S., Jolly J.C., Skeritt J.H., Walloscheck A. Cloning of a wheat 15-kDa grain softness protein (GSP). GSP is a mixture of puroindoline-like polypeptides // Eur J Biochem – 1994. – 223:917-925.
6. Greenwell P., Schofield J.D. A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat // Cereal Chem – 1986. - 63:379-380.
7. Giroux M.J., Morris C.F. A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low level of starch-surface friablin// Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America 1998, 95:6262-6266.
8. Chantret N., A.Cenci, F.Sabot, et al. Sequencing of the *Triticum monococcum* Hardness locus reveals good microcolinearity with rice// Mol Gen Genomics – 2004. – 271:377–386.

9. *Morris C.F.* Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness// *Plant Mol. Biol.* - 2002. - 48:633-647
10. *Tranquilli G., Heaton J., Chicaiza O., et al.* Substitutions and deletions of genes related to grain hardness in wheat and their effect on grain texture// *Crop. Sci* -2002. - 42: 812-1817
11. *Beecher B., Bettge A., Smidansky E., Giroux J.* Expression of wild-type *pinB* sequence in transgenic wheat complements a hard phenotype// *Theor Appl Genet* - 2002. - 105: 870-877
12. *Giroux M.J., Morris C.F.* A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low level of starch-surface friablin// *Theor Appl Genet* – 1997 – 95 : 857-864
13. *Lillemo M., Morris C.F.* A leucine to proline mutation in puroindoline B is frequently present in hard wheats from Northern Europe// *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 1100-1107.
14. *Martin J.M., Frohberg R.C., Morris C.F., et al.* Milling and bread baking traits associated with puroindolin sequence type in hard red spring wheat// *Crop Sci* – 2000.- 41 : 228-234
15. *Morris C.F., Lillemo M., Simeone M.C., et al.* Prevalence of puroindoline grain hardness genotypes among historically significant North American spring and winter wheats// *Crop Science* 2001, 41(1):218-228.
16. *Ikeda T.M., Ohnishi N., Nagamine T. et al.* Identification of new puroindoline genotypes and their protein products among wheat cultivars// *J. Cereal Sci.* – 2005. -41 : 1-6.
17. *Xia L.Q., Chen F., He Z.F., et al.* Occurrence of puroindoline alleles in Chinese winter wheats// *Cereal Chem.*- 2005.- 82: 38- 43.
18. *Chen F., He Z.H., Xia X.C. et al.* A new puroindoline b mutation present in Chinese winter wheat cultivar Jingdong 11//*J. Cereal Sci.*- 2005.- 42:267-269
19. *Ram S., Jain N., Shoran J., Singh R.* New frame shift mutation in puroindoline b in Indian wheat cultivars Hyb65 and NI5439// *J Plant Biochem Biotech.*- 2005.-14 : 45-48.
20. *Chen F., He Z.H., Xia X.C. et al.* Molecular and biochemical characterization of puroindoline a and B alleles in Chinese Landraces and historical cultivars// *Theor Appl Genet.*- 2006.- 112: 400-409.
21. *Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях (научное руководство) под ред. Ю.М. Сиволап Киев: Аграрная наука - 1998. – 156 с.*

Резюме

Аналізували алельне состояние генів *Pina-D1* і *Pinb-D1* пуринодолинов *a* і *b*, які контролюють один із важливих показателів якості зерна – твердозерність, у 45 сортів і форм м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), переважно української селекції. Показали, що 93% сортів мають алельний склад *Pina-D1a* і *Pinb-D1b* і являються твердозерними сортами.

Визначали алельний стан генів *Pina-D1* та *Pinb-D1* пуринодолинів *a* і *b*, які контролюють один із важливих якісних показників зерна – твердозерність, у 45 сортів та форм м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), переважно української селекції. Встановлено, що 93 % досліджених сортів мали алелі *Pina-D1a* і *Pinb-D1b*, тобто характеризувались як твердозерні сорти.

The aim of work was to investigate alleles of puroindoline *a* and *b* genes *Pina-D1* and *Pinb-D1*, that are coding one of the most important trait – grain hardness (“hard” or “soft” kernel texture) among the 45 bread wheat varieties and lines (*Triticum aestivum* L.), that have been developed mainly in Ukraine. There have been revealed alleles *Pina-D1a* and *Pinb-D1b* for 93 % of varieties which have been identified as hard wheat varieties.