

С.В. ЧЕБОТАР¹, К.О. КУРАКІНА²,
О.М. ХОХЛОВ³, Г.О. ЧЕБОТАР¹, Ю.М. СИВОЛАП¹

¹ Південний біотехнологічний центр в рослинництві
НААН України, Одеса

E-mail: sabina-chebotar@rambler.ru

² Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова

³ Селекційно-генетичний інститут – Національний центр
насіннезнавства та сортовивчення НААН України, Одеса

ФЕНОТИПІЧНІ ПРОЯВИ АЛЕЛІВ ПУРОІНДОЛІНОВИХ ГЕНІВ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ



Методом NIR досліджено 85 сортів та ліній м'якої озимої пшениці переважно української селекції для визначення відносного показника твердозерності та вмісту білка. Фактичні дані щодо твердозерності було порівняно з даними попередніх генетичних досліджень та літературних джерел. Значне варіювання показника твердозерності при однаковому аallelному стані генів пуринолінів свідчить про наявність додаткових генів, що впливають на прояв даної ознаки.

© С.В. ЧЕБОТАР, К.О. КУРАКІНА, О.М. ХОХЛОВ,
Г.О. ЧЕБОТАР, Ю.М. СИВОЛАП, 2012

Вступ. Серед усіх культурних рослин м'яка та тверда пшениці є одними з найбільш цінних, тому що дозволяють виробляти широкий спектр продуктів харчування, які характеризуються гарними смаковими якостями та поживними властивостями. Щорічно у світі виробляється близько 600 млн тон пшениці, з яких біля 100 млн продається на світовому ринку. Пшениця різних сортів має унікальний склад білків, що формують під час гідратування клейковину, яка дозволяє утримувати виділені у процесі ферментативного бродіння газу. Багато в чому цей якісний показник пшениці залежить від текстури ендосперму зерна, що також називається твердозерністю [1].

Твердозерність є однією з важливих характеристик зерна пшениці, яка має відношення до розмолу, замісу тіста та виготовлення хлібобулочних виробів. На основі текстури ендосперму сорти ботанічного виду м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) розділяються на дві великі групи – твердозерні («hard») та м'якозерні («soft»).

Твердозерна пшениця використовується у хлібопекарській промисловості, тому що розсипчасте («free-flowing») борошно, отримане з неї під час замісу тіста, краще утримує воду. Ця властивість важлива при хлібопеченні, бо велика кількість клейковини дає хлібу можливість підходити.

М'якозерна пшениця більш крихка, потребує менших зусиль в процесі розмолу, в результаті якого утворюється борошно з меншими розмірами часток [1–3]. Борошно м'якозерних сортів менше поглинає воду, завдяки чому технологічно більше підходить для виготовлення печива та бісквітів.

Показник «hardness» визначає не тільки стан поверхні крохмальних гранул, але й інші особливості внутрішньої морфології, такі, наприклад, як стан клітинних стінок. Якщо у сортів типу «hard» (а також виду *T. durum*) клітинна структура ендосперму зберігається до етапу повної зрілості, у групі «soft» клітинні стінки ніжніші та на пізніших етапах частково руйнуються [4].

Україна як експортер зерна на світовий ринок потребує зростання випуску конкурентоздатної продукції – сортів пшениці різних груп якості.

Генетична детермінація. Фенотипова різниця твердозерність/м'якозерність контролю-

ється кількома генами, що близько зчеплені та локалізовані на короткому плечі хромосоми 5D, у так званому *Ha (Hardness)* локусі [1]. В цьому локусі знаходяться гени, які кодують три поліпептиди, що складають білок фріабілін: пуроіндоліни *a* (ген *Pina-D1*) та *b* (ген *Pinb-D1*), а також Grain Softness Protein (*Gsp-1*) [1, 5, 6]. Білки PINA та PINB є головними компонентами фріабіліну та можуть бути екстраговані за допомогою Triton X-114 [1, 7].

Білок фріабілін має близько 15 кДа та локалізується на поверхні крохмальних гранул, в більшій мірі – у пшениць з м'якою текстурою ендосперму [5]. Взаємодія фріабіліну з крохмальними гранулами відбувається за рахунок гідрофобних та іонних зв'язків [1].

Пуроіндоліни та GSP-1 знайдені як у твердо-, так і у м'якозерних сортів пшениці, але ступінь адгезії на поверхні крохмальних гранул варіює в залежності від генотипу пшениці [6]. Рівень адгезії фріабіліну на поверхні крохмальних зерен корелює з твердозерністю пшениці (цит. за [7]). У сортів твердої пшениці (*T. durum*) цей білок взагалі відсутній [8]. Пуроіндоліни *a* та *b* взаємодіють як гетеродимери та зв'язують гранули крохмалю з мембранними ліпідами амілопластів. Особливості пуроіндолінів – наявність багатого триптофаном домена (БТД) [9].

Гени *Pina-D1* та *Pinb-D1* демонструють 70%-ну гомологію. Аналіз сиквенсу *Gsp-1* показав, що цей ген також має 56- та 58%-ну гомологію з генами пуроіндолінів *a* та *b* відповідно [10].

Показано, що твердозерність знижується у процесі дозрівання зерна. Це корелює з експресією пуроіндолінових генів та накопиченням фріабіліну у зерні [11].

Дослідження мутацій та делецій, а також роботи зі створення трансгенної пшениці свідчать, що різницю у текстурі зерна визначають в основному пуроіндолінові гени. Натомість варіація доз гена *Gsp-1* не показала впливу на твердість зерна [11].

Інші види злаків також мають пуроіндолінові гени (егілопс, овес, ячмінь, жито та тритікале). Цікавим є те, що у вивчених диплоїдних видів пшениці та егілопсу знайдено багато мутацій генів пуроіндолінів, однак вони не впливали на третичну структуру пуроіндолінів та не порушували зв'язування

цих білків з ліпідами мембран крохмальних зерен, тому всі зерновки цих видів мали м'яку текстуру ендосперму [9].

Згідно з останніми літературними даними градація ознаки твердозерності м'якої пшениці значною мірою обумовлена комбінаціями алелів пуроіндолінових генів *Pina-D1* та *Pinb-D1*. Але, крім генетичної детермінації, до 40 % варіації твердозерності залежать від невідомих до цього часу факторів, серед яких, вочевидь, і умови навколишнього середовища [12].

Алельні стани пуроіндолінових генів. Дикий тип м'яких пшениць має м'яку текстуру ендосперму, що пов'язано з наявністю алелів пуроіндолінових генів *Pina-D1a* та *Pinb-D1a* [1].

У твердозерних пшеницях перший або другий пуроіндоліновий ген чи продукти цих генів атрофовані нефункціональною мутацією.

Перша виявлена мутація, яка впливає на твердозерність, призводить до заміни гліцину на серин у позиції 46 пуроіндолінового протейна *b* (*Pinb-D1b*) [13]. Виявлено ще кілька алельних станів пуроіндолінових генів: нуль-мутація гена *Pina-D1* (*Pina-D1b*), точкові мутації у гені *Pinb-D1*, які призводять до амінокислотних замін (*Pinb-D1c, d, t*), три мутації з утворенням стоп-кодонів у гені *Pinb-D1* (*Pinb-D1e, f, g*) [1, 14]. У 2005 р. Айкеда зі співавт. [7] показали наявність ще двох мутацій: подвійної нуль-мутації за обома генами (*Pina-D1b/Pinb-D1h(t)*) та мутації, що призводить до зсуву рамки зчитування у *Pinb-D1* (*Pinb-D1i(t)*). Подвійна нуль-мутація може пояснюватися делецією дистальної ділянки короткого плеча хромосоми 5D [7]. У цьому ж році різні дослідники [15–17] виявили чотири невідомі раніше мутації (*p, q, r, s*) у гені, що кодує пуроіндолін *b*, дві з них містили декілька одиничних точкових змін. Останні з виявлених на 2006 рік мутацій були знайдені у гені пуроіндоліну *a*: одна з них призводить до зсуву рамки зчитування (*Pina-D1l*), інша веде до одиничної амінокислотної заміни у білковому ланцюгу (*Pina-D1m*), ще одна – до появи стоп-кодону (*Pina-D1n*) [14].

Аналіз розповсюдження мутантних алелів пуроіндолінових генів у м'якої пшениці різного географічного походження дозволив виявити значні відмінності складу алелів у різних

регіонах світу. Виборки сортів м'якої пшениці з Північної Європи, Північної Америки та Південної Австралії містили більше твердозерних сортів, у той час як у виборці сортів з Китаю переважали м'якозерні сорти, а також зустрічалися рідкісні для інших регіонів мутантні алелі *Pinb-D1p*, *Pinb-D1t*, *Pina-D1n*, *Pina-D1l* [14]. У північноєвропейських сортів з достатньо високою частотою зустрічався алель *Pinb-D1c* [9].

Залежність фенотипу від генотипу. Слова «твердість» чи «твердозерність» не зовсім точно передають суть поняття «hardness». Твердість як сумарний опір атакуючим зусиллям є інтегральною характеристикою, на яку впливають скловидність, геометрія зерна та інші фактори переважно негенетичної природи. Разом з тим такі атрибути, як гранулометричний склад борошна, тип висівок, вихід вільних крохмальних гранул та ступінь їхнього пошкодження, демонструють більш чітку генетичну компоненту [18].

Фенотипово генотип з мутацією *Pina-D1b/Pinb-D1a* проявляється відсутністю фракції пуруіндоліну *a* за ідентифікації цих білків на гель-електрофорезі, *Pina-D1a/Pinb-D1c* та *Pina-D1b/Pinb-D1h(t)* мутації спричиняють повну відсутність пуруіндоліну *b* [7]. По-іншому проявляється мутація *Pina-D1a/Pinb-D1b*. Амінокислотна заміна призводить не до повної відсутності пуруіндоліну *b*, а до значного зменшення його кількості [7]. Зазначають, що присутність нормального пуруіндоліну *a* та мутантного пуруіндоліну *b* разом трохи більше пом'якшують текстуру ендосперму зерна, ніж наявність нормального пуруіндоліну *b* при відсутності пуруіндоліну *a* [1]. Різниця у кількості пуруіндоліну *b* ймовірно обумовлена посттрансляційною деградацією цього білка. Можливо, мутація *Pinb-D1i(t)*, що обумовлює втрату ліпідозв'язуючої активності, призводить до дестабілізації та деградації білка PINB [7].

Раніше втрату здатності зв'язувати ліпіди у сортів з мутацією в гені *Pinb-D1* пояснювали амінокислотною заміною у триптофан-богатому домені білка PINB або повною відсутністю PINA (мутація *Pina-D1b*) [13, 19]. Але Айкеда зі співавт. [7] за допомогою електрофоретичного аналізу показали,

що кількість пуруіндолінов *a* та *b* у ендоспермі пшениці безпосередньо впливає на твердість зерна. У твердої пшениці *T. durum* фракції пуруіндолінів взагалі не виявлено [7].

Як зазначив Хохлов [18], з внесенням у геном м'якозерних сортів пшениці додаткових доз пуруіндолінових генів найбільш сильним є ефект першої дози (різниця $\approx 75\%$), на другій та третій дозах він зменшується (10 та 15% відповідно). Це згасання може відображати поступове конкурентне насичування поверхні амілопластів пуруіндолінами. З цієї точки зору цікавим є аналіз існуючих форм зі значно посиленими показниками м'якозерності – «extra soft» чи «super soft» (наприклад, сорти Yu Mai 18, Оксана та ін.). Існування таких сортів може мати кілька пояснень. Або вони є результатом впливу інших сильних факторів (наприклад, кількості та складу жирів), або серед пуруіндолінів існують не зареєстровано до цього часу варіанти з посиленою дією. Можливо також, що у цих сортах значно посилено синтез функціонально активних пуруіндолінів. Останнє легко можна було б пояснити наявністю локусів «soft» не тільки у 5D, а також і в гомеологічних 5A та 5B хромосомах. На появу таких форм можна очікувати у схрещуваннях між собою споріднених диплоїдних видів, які не втратили зазначених локусів у геномах А та, можливо, В [20]. Відомо також, що деякі диплоїдні форми характеризуються як дуже м'якозерні, вочевидь тому, що пропорція активних локусів «soft» у них в три рази вища, ніж у *T. aestivum*: принаймні 2 на 7 хромосом на відміну від 2:21 відповідно [18].

Роль окремих генів у формуванні текстури ендосперму. Ряд дослідників [11] вважають, що текстура зерна залежить не стільки від загальної кількості пуруіндолінів, скільки від присутності обох білків дикого типу PINA та PINB. Хогг зі співавт. [11] дійшли такого висновку на підставі аналізу створених шести трансгенних ліній, які містили додатковий ген дикого типу *Pina-D1a* чи *Pinb-D1a*, або обидва цих гени. Контрольні лінії мали генотип *Pina-D1a/Pinb-D1b*. З борошна грубого розмолу екстраговані білки PINA та PINB. Кількість пуруіндоліну *a* у контрольних лініях була умовно прийнята рівною 1,0, а пуруіндоліну *b* – 0,0. У трансгенних лініях отримано нас-

тупні результати: збільшення кількості пуроіндоліну *a* в 4,5–8 разів у лініях з привнесеним *Pina-D1a* дикого типу, збільшення PINB у 4 рази в лініях з привнесеним геном *Pinb-D1a*, а також у 7–8 та у 4–5 разів більшою була кількість PINA та PINB відповідно у лініях, трансгенних за обома генами пуроіндолінів [11].

З поверхні крохмальних гранул було екстраговано фріабілін, який потім фракціонували, використовуючи спеціальну методику. Кількість його зменшувалась у ряду: лінії, трансгенні за обома генами – лінії з додатковим *Pinb-D1a* – лінії з додатковим *Pina-D1a* – контрольні лінії [11].

Аналіз показав, що хоча зниження твердозерності спостерігалось у всіх трансгенних ліній, найбільш м'якими та з найменшим розміром часток виявились лінії з привнесеним геном *Pinb-D1a*, менш м'якозерними були лінії, трансгенні за обома генами, у *Pina-D1a* трансгенних ліній також спостерігалось зменшення твердозерності у порівнянні з контрольними лініями, але менше, ніж для вказаних вище досліджених трансгенних ліній. Слід зазначити, що трансгенні лінії *Pinb* виявились більш м'якозерними, аніж нетрансформовані сорти дикого «м'якого» типу [11].

Таким чином, це доводить, що м'якість зерна залежить від присутності обох білків, пуроіндолінів *a* та *b*, а не від загальної кількості пуроіндолінів.

Пізніше були проведені дослідження зі схрещування трансгенних ліній, що створені Хоггом, з м'якозерним сортом Heron, які показали, що незважаючи на лімітування м'якозерності обома пуроіндолінами, PINB більшою мірою відіграє лімітуючу роль у зв'язуванні пуроіндоліну *a* з крохмальними гранулами в порівнянні з PINA. Але індивідуальну роль пуроіндолінів PINA та PINB у твердості зерна та асоціації з крохмальними зернами показати не вдалося внаслідок того, що генотипи з додаванням пуроіндолінів створені на основі м'якозерного генотипу сорту Heron [21].

Щоб оминати недоліки попередніх досліджень Хогга та ін. [11] і Свана та ін. [21], провели схрещування трансгенних ліній,

створених Хоггом, з генотипами, що не мали пуроіндоліну *b* (сорт Canadian Red з генотипом *Pina-D1a/Pinb-D1e*) чи пуроіндоліну *a* (сорт McNeal з генотипом *Pina-D1b/Pinb-D1a*) [22]. Нашадки були диференційовані за наявністю чи відсутністю трансгена та *Ha* локусу. З чотирьох гомозиготних класів (*Pina-D1a/Pinb-D1e*, *Pina-D1a/Pinb-D1b*, *Pina-D1b/Pinb-D1a*, *Pina-D1b/Pinb-D1b*) у випадковому порядку відібрали нащадків від схрещування, які потім дослідили на твердозерність, масу зерен та вміст білка. Дослідження Уанджуджи та ін. [22] показали, що пуроіндоліни *a* та *b* можуть діяти незалежно за відсутності іншого білка, призводячи до проміжної текстури ендосперму, чи разом з утворенням м'якозерного ендосперму дикого типу. Результати Свана та ін. [21] підтвердили, що додавання *Pinb-D1a* обумовлює більш м'якозерну текстуру, ніж додавання *Pina-D1a*, та що білок PINB, таким чином, більше лімітує м'якозерність, ніж PINA.

PINA чи PINB можуть незалежно, проте досить слабо, асоціюватись з крохмальними гранулами, але біохімічні засади цього процесу поки що невідомі. Капареллі та ін. [5] і Газза та ін. [23] припустили, що за відсутності білка PINA менша кількість білка PINB асоціюється з поверхнею крохмальних гранул. Уанджуджи та ін. [22], навпаки, показують, що зверхекспресований пуроіндолін *b* ефективніше зв'язується з поверхнею гранул, ніж пуроіндолін *a*.

Надекспресія PINA чи PINB за відсутності іншого пуроіндоліну, асоційованого з крохмальними гранулами, призводить до проміжного фенотипу. Це підтвержує гіпотезу про те, що не загальна кількість пуроіндолінів обумовлює м'якозерність, а наявність обох функціональних пуроіндолінових білків. Це призводить до великої кількості фріабіліну на поверхні крохмальних гранул і, відповідно, м'якозерного фенотипу [22].

Мета нашої роботи – дослідити серед колекції сортів м'якої пшениці переважно української селекції розподіл за групами (твердозерні та м'якозерні), визначити характер розподілу в межах кожної групи та оцінити кореляційну залежність між показниками твердозерності і вміст білка.

Дані відносного показника твердозерності та вмісту білка для досліджених сортів
(тип за класифікацією Williams, 1998)

Сорт/лінія	Алелі		Білок, %	Твердозерність
	<i>Pina</i>	<i>Pinb</i>		
Very soft				
Фарандоль	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>	11,1	20
Soft				
Б16pp	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>	12,0	33,6
Миронівська 33	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>	12,0	38,6
Medium hard				
Дальницька	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	8,1	51,0
Знахідка	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	12,8	56,7
Володарка	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	10,5	56,8
Порада	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	11,4	57,0
Вдала	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	8,7	57,1
Застава	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	11,5	58,7
Світанок	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	14,7	59,7
Вимпел	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	11,0	60,2
Федорівка	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	12,4	61,0
Струмок	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	12,9	61,3
Батько	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	8,1	61,7
Сирена	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	11,8	61,8
Фантазія	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	11,2	62,7
Василина	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1 b</i>	12,7	62,8
Диканька	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1 b</i>	14,0	63,2
Ніконія	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1 b</i>	12,0	63,4
Селянка	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1 b</i>	10,4	63,9
Вікторія одеська	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1 b</i>	13,0	64,2
Лея	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1 b</i>	12,2	64,2
Веснянка	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1 b</i>	11,7	64,4
Hard				
Б16gg	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	13,3	64,6
Одеська 51	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	10,4	64,9
Лада	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	12,6	65,1
Либідь	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	8,4	65,5
Українка полтавська			13,7	65,5
Білосніжка	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	11,8	66,0
Київська 8			12,2	66,4
Красуня	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	11,4	66,7
Одеська 132	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	11,4	66,9
Коломак 3			12,6	66,9
Тіра	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	11,2	67,1
Херсонська остиста	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	10,9	67,3
Ятрань 60			11,3	67,6
Апогей луганський	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	13,1	67,7
Одеська 133	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	13,0	67,8
Донецька 46	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	12,6	67,9
Писанка	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	11,9	68,4
Любава	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	12,3	68,5

Продовження табл.

Сорт/лінія	Алелі		Білок, %	Твердозерність
	<i>Pina</i>	<i>Pinb</i>		
Одеська 265	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	12,8	68,5
Находка 4			11,8	68,5
Ренан	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	13,8	68,6
Землячка одеська	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	8,5	68,7
Одеська 162			11,5	68,9
Харківська 96	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	10,8	69,1
Обрій			12,8	69,4
Українка одеська	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	11,5	69,4
Київська 7	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	11,9	69,4
Іванівська остиста			14,6	69,5
Миронівська остиста			12,0	69,8
Альбатрос одеський	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	12,0	70,0
Олеся			12,8	70,1
Донецька 48			13,3	70,2
Дончанка 3	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	12,7	70,4
Супутниця	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	13,6	70,5
Краснодарська 99	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	8,4	71,0
Фаворитка	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	10,0	71,6
Ясочка	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	12,4	71,7
Победа 50	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	12,9	72,4
Коломак 5			13,2	72,6
Золотоколаса	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	9,5	72,8
Миронівська 28			11,8	73,2
Лютесценс 7			13,1	73,5
Донська напівкарликова			14,0	73,8
Херсонська 86			11,8	74,8
Поліська 90			12,8	74,9
Станична	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	14,8	75,1
Білоцерківська напівкарликова	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	13,5	75,5
Пріма	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	9,5	75,5
Скіфянка			12,8	75,6
Зустріч	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	9,8	76,1
Very hard				
Юна			13,0	78,8
Київська остиста			13,4	78,8
Донський сюрприз	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	12,7	78,9
Збруч			14,0	79,6
Лузанівка одеська	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	8,5	80,6
Кияна			13,2	81,0
Мирхад	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	13,0	81,5
Веселка			13,8	83,7
Миронівська 27	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	11,7	84,3
Мирич	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	14,0	84,4
Циганка	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1c</i>	13,0	88,9
Extra hard				
Миронівська 65			14,1	93,6
НСР_05			1,3	8,1
НСР_01			1,8	10,7
НСР_001			2,3	13,9

Матеріали та методи. В роботі досліджували фізичний показник твердозерності для 85 сортів та ліній м'якої озимої пшениці переважно української селекції. Зерно розмелювали на електричному лабораторному млині QT-114 («Labor MIM», Угорщина), відносні показники твердозерності (при калібруванні згідно зі стандартним аналізатором ADP-1) та вмісту білка (у відсотках згідно із калібруванням за К'ельдалем) у зерні пшениці визначали методом NIR (інфрачервоний коефіцієнт відбиття) на приладі Infrapid 61 (комп'ютеризована версія; «Labor MIM», Угорщина), а також на приладі Спектран-119М («ЛОМО Фотоніка», РФ). Отримали середні значення даних для двох приладів та здійснили лінійну перебудову шкали твердозерності до 100-бальної за двома точками (Альбатрос – 70, Фарандоль – 20).

Результати досліджень та їх обговорення. В результаті виконаних досліджень визначили показники твердозерності та вмісту білка для 85 сортів і ліній пшениці (таблиця). Отримані дані порівняли з попередніми нашими даними для більшості досліджених сортів, де за допомогою ПЛР-маркерів був визначений алельний стан генів (*Pina-D1* та *Pinb-D1*), що контролюють показник твердозерності [24, 25]. В результаті зазначено, що всередині груп м'якозерних та твердозерних сортів спостерігається значна різниця у твердозерності при однаковому алельному стані генів, визнаних такими, що детермінують показник твердозерності [13, 26].

За отриманими даними м'якозерні м'які пшениці з алелями *Pina-D1a* та *Pinb-D1a* (сорт Миронівська 33, Фарандоль, а також лінія Б16pp) показали вміст білка у діапазоні від 11,1 до 12,00 % та твердозерність у діапазоні від 20 до 38,6 одиниць (менший показник відповідає м'якішій текстурі ендосперму зерна пшениці). Твердозерні м'які пшениці (інші 82 сорти та форми) показали вміст білка у діапазоні від 8,1 до 14,8 % з медіаною у 12,3 %, твердозерність у діапазоні від 51 до 93,6 одиниць з медіаною 69. З них 56 сортів з алелями *Pina-D1a* та *Pinb-D1b* ([24], Чеботар, неопуб. дані) показали вміст білка у діапазоні від 8,1 до 14,8 % з медіаною у 11,9 % та твердозерність у діапазоні від 51 до 84,4 одиниць з медіаною 68.

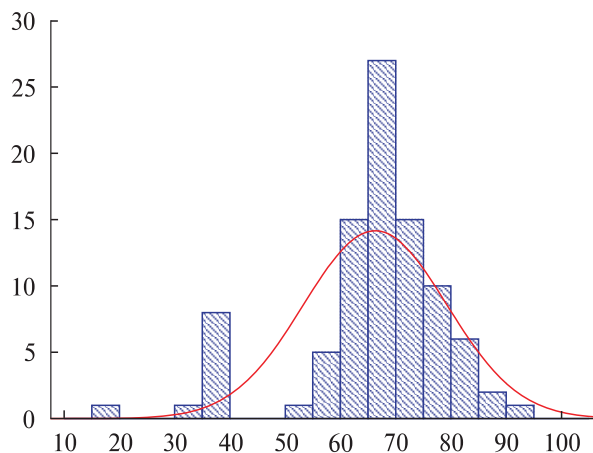


Рис. 1. Розподіл за показником твердозерності (середнє для двох приладів): по вертикалі – кількість сортів; по горизонталі – твердозерність, одиниць; $\chi^2 = 24,52$, $df = 6$, $p = 0,00042$

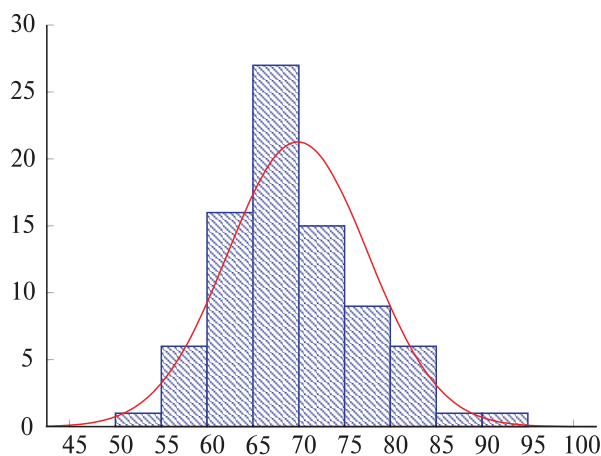


Рис. 2. Розподіл за показником твердозерності для твердозерних сортів: по вертикалі – кількість сортів; по горизонталі – твердозерність, одиниць; $\chi^2 = 5,59$, $df = 3$, $p = 0,13343$. Асиметрія графіка становить 0,53 одиниці, ексцес – 0,85

Слід також звернути увагу, що сорт Циганка, який має вміст білка 13,0 % та показник твердозерності 88,9 одиниць, був охарактеризований Злацькою [27] як такий, що має алелі *Pina-D1a* та *Pinb-D1c*.

Згідно з графіком розподілу даних за показником твердозерності (рис. 1) чітко виділяються дві групи сортів: умовно виділена група значень до 45 одиниць відповідає групі м'якозерних сортів пшениці, група значень

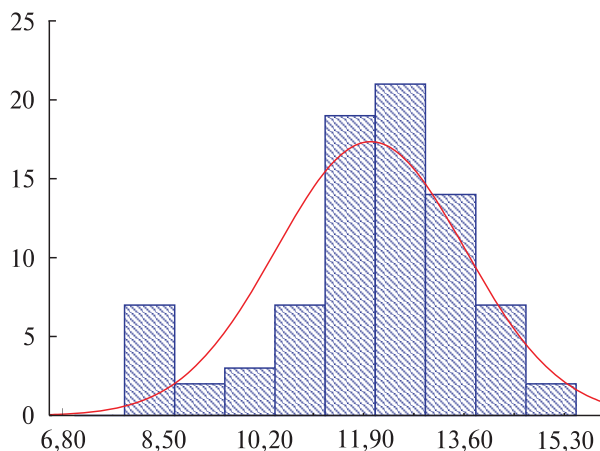


Рис. 3. Розподіл за відносним показником вмісту білка (середнє для двох приладів): по вертикалі – кількість сортів; по горизонталі – вміст білка, %; $\chi^2 = 18,31$, $df = 7$, $p = 0,01066$. Асиметрія графіка становить 0,83 одиниць, ексцес – 0,29

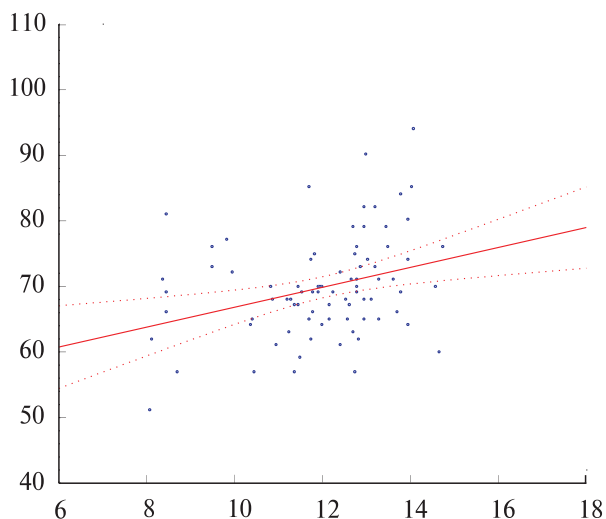


Рис. 4. Кореляція між показником твердозерності (по вертикалі) та вмістом білка (по горизонталі, %), середнє для двох приладів, $r = 0,32$

від 51,0 одиниць і вище – групі твердозерних сортів пшениці. Показник χ^2 свідчить про те, що розподіл за показником твердозерності відрізняється від нормального (через очевидну бімодальність).

Аналіз групи м'якозерних сортів окремо не дає можливості судити про нормальність розподілу через невелику кількість даних у виборці.

Більш численна група твердозерних сортів показує відповідність нормальному розподілу даних за показником твердозерності (рис. 2).

Розподіл за показником вмісту білка у твердозерних сортів відрізняється від нормального (рис. 3). Складний характер даних за цим показником обумовлений генетичними відмінностями сортів, а також різними умовами вирощування та станом ґрунту. В цілому розмах показника вмісту білка у межах від 9 до 15 % є нормальним для більшості сортів м'якої пшениці в типових для України умовах вирощування.

В межах більш численної групи твердозерних сортів виявлена помірна позитивна кореляція між твердозерністю та вмістом білка (рис. 4), яка, очевидно, відображає приріст скловидності і пов'язаної з нею механічної твердості зерна при підвищенні вмісту білка.

Висновки. Досліджено характер розподілу показника твердозерності («hardness»), а також білковості зерна 85 сортів м'якої пшениці і проведено порівняння з даними попередніх генетичних досліджень. Виявлено, що показник твердозерності для сортів з однаковим алельним станом генів пуроіндолінів, які за світовими даними детермінують показник твердозерності, значною мірою варіює. Незначна різниця у твердозерності для сортів з однаковим алельним станом генів пуроіндолінів *a* і *b* може пояснюватися різними умовами вирощування та станом ґрунту. Значна різниця даних за показником твердозерності у групі твердозерних сортів з визначеним алельним станом генів пуроіндолінів може пояснюватися впливом інших генів [28], у тому числі таких, які досі у повній мірі не визначені. Так, Вейгтман зі співавт. [12] показали наявність додаткових локусів, що впливають на показник твердозерності та розташовані на хромосомах 2A, 2D, 3A і 6D. Нами зазначено помірну корелятивну залежність твердозерності від білковості зерна у групі твердозерних сортів, що можна пояснити більшою зцементованістю високобілкового скловидного зерна. Очевидно, що варіація показника твердозерності в залежності від генетичних та інших факторів потребує подальшого вивчення.

S.V. Chebotar, K.O. Kurakina,
O.M. Khokhlov, G.O. Chebotar, Yu.M. Sivolar

PHENOTYPIC EFFECTS
OF PUROINDOLINE GENE ALLELES
OF BREAD WHEAT

85 winter bread wheat varieties and lines that have been developed mostly in Ukraine were analyzed with NIR for parameters of hardness and protein content. The hardness data were compared with the data of puroindoline gene alleles analysis done earlier and the published data. Significant variation of parameters of hardness was revealed when there was low polymorphism of puroindoline genes indicating the presence of additional genes that influence the hardness parameters.

С.В. Чеботарь, Е.А. Куракина,
А.Н. Хохлов, Г.А. Чеботарь, Ю.М. Сиволап

ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ
АЛЛЕЛЕЙ ПУРОИНДОЛИНОВЫХ ГЕНОВ
МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Методом NIR исследованы 85 сортов и линий озимой мягкой пшеницы преимущественно украинской селекции для определения относительного показателя твердозерности и содержания белка. Фактические данные по твердозерности сравнены с результатами предыдущих генетических исследований и данными литературы. Значительное варьирование показателя твердозерности при одинаковом аллельном составе генов пуринодолинов указывает на присутствие дополнительных генов, которые влияют на проявление этого признака.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Morris C.F. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness // *Plant Mol. Biol.* – 2002. – **48**, № 5/6. – P. 633–647.
2. Cutler G.H., Brinson G.A. The granulation of whole wheat meal and a method of expressing it numerically // *Cereal Chem.* – 1935. – № 12. – P. 120–129.
3. Devaux M.-F., Deschaux de Monderon F.L. et al. Particle size distribution of break, sizing and middling wheat flours by laser diffraction // *J. Sci. Food Agric.* – 1998. – **78**, № 12. – P. 237–244.
4. Беркутова Н.С. Микроструктура зерна и муки из твердозерных и мягкозерных сортов пшеницы // *С.-х. биология.* – 1975. – **10**, № 6. – С. 812–819.
5. Capparelli R., Boriello G., Giroux M.J. et al. Puroindoline A-gene expression is involved in association of puroindolines to starch // *Theor. Appl. Genet.* – 2003. – **107**, № 8. – P. 1463–1468.
6. Turner M., Mukai Y., Leroy P. et al. The *Ha* locus of wheat: identification of a polymorphic region for tracing grain hardness in crosses // *Genome.* – 1999. – **42**, № 6. – P. 1242–1250.
7. Ikeda T.M., Ohnishi N., Nagamine T. et al. Identification of new puroindoline genotypes and their relationship to flour texture among wheat cultivars // *J. Cereal Sci.* – 2005. – **41**, № 1. – P. 1–6.
8. Greenwell P., Schofield J.D. A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat // *Cereal Chem.* – 1986. – **63**, № 4. – P. 379–380.
9. Хакимова А.Г., Митрофанова О.П. Пуринодолины в связи с перспективами селекции мягкой пшеницы на качество и устойчивость // *С.-х. биология.* – 2009. – № 1. – С. 3–15.
10. Chantret N., Salse J., Sabot F. et al. Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*) // *Plant Cell.* – 2005. – **17**, № 4. – P. 1033–1045.
11. Hogg A.C., Stripo T., Beecher B. et al. Wheat puroindolines interact to form friabilin and control wheat grain hardness // *Theor. Appl. Genet.* – 2004. – **108**, № 6. – P. 1089–1097.
12. Weightman R.M., Millar S., Alava J. et al. Effects of drought and the presence of the 1BL/1RS translocation on grain vitreosity, hardness and protein content in winter wheat // *J. Cereal Sci.* – 2008. – **47**, № 3. – P. 457–468.
13. Giroux M.J., Morris C.F. A glycine to serine change in puroindoline *b* is associated with great hardness and low levels of starch-surface friabilin // *Theor. Appl. Genet.* – 1997. – **95**, № 11. – P. 857–864.
14. 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**, № 3. – P. 400–409.
15. Chen F., He Z.H., Xia X.C. et al. A new puroindoline mutation present in Chinese winter wheat cultivar Jingdong 11 // *J. Cereal Sci.* – 2005. – **42**, № 2. – P. 267–269.
16. Ram S., Jain N., Shoran J. et al. New frame shift mutation in puroindoline *b* in Indian wheat cultivars Hyb65 and NI5439 // *J. Plant Biochem. Biotech.* – 2005. – № 14. – P. 45–48.
17. Xia L.Q., Chen F., He Z.H. et al. Occurrence of puroindoline alleles in Chinese winter wheats // *Cereal Chem.* – 2005. – **82**, № 1. – P. 38–43.
18. Хохлов О.М. Генетично обумовлена твердість зерна м'якої пшениці (*T. aestivum*): стан та перспективи досліджень в Україні // *Зб. наук. пр. СГП.* – Одеса, 2002. – Вип. 2 (42). – С. 9–29.
19. Lillemo M., Morris C.F. A leucine to praline mu-

- tation in puroindoline *b* is frequently present in hard wheats from Northern Europe // *Theor. Appl. Genet.* – 2000. – **100**, № 7. – P. 1100–1107.
20. *Gautier M.F., Aleman M.E., Guirao A. et al. Triticum aestivum* puroindolines, two basic cysteine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression // *Plant Mol. Biol.* – 1994. – **25**, № 1. – P. 43–57.
 21. *Swan C.G., Meyer F.D., Hogg A.C. et al.* Puroindoline *b* limits binding of puroindoline *a* to starch and grain softness // *Crop Sci.* – 2006. – **46**, № 4. – P. 1656–1665.
 22. *Wanjugi H., Hogg A., Martin J. et al.* The role of puroindoline *a* and *b* individually and in combination on grain hardness and starch association // *Crop Sci.* – 2007. – **47**, № 1. – P. 67–76.
 23. *Gazza L., Nocente F., Ng P.K.W. et al.* Genetic and biochemical analysis of common wheat cultivar lacking puroindoline *a* // *Theor. Appl. Genet.* – 2005. – **110**, № 3. – P. 470–478.
 24. *Чеботарь С.В.* Молекулярно-генетический анализ генофонда озимой мягкой пшеницы Украины : Дис... д-ра биол. наук. 03.00.22. – Одесса, 2009. – 400 с.
 25. *Чеботар С.В., Хохлов О.М., Куракіна К.О. та ін.* Аналіз алельного стану генів *Pina-D1* та *Pinb-D1* в генотипах українських сортів пшениці // Фактори експериментальної еволюції організмів : Зб. наук. пр. – 2008. – **5**. – С. 207–212.
 26. *Jolly C.J., Glenn G.M., Rahman S.* GSP-1 genes are linked to the grain hardness locus (*Ha*) on wheat chromosome 5D // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1996. – **93**, № 6. – P. 2408–2413.
 27. *Zlatska A.V.* Allele composition of *Pina* and *Pinb* loci of eastern European common wheat varieties and their impact on the bread-making quality characteristics // *Plant genetics, genomics, and biotechnology : Int. conf.* – Novosibirsk, 2010. – P. 90.
 28. *Bhave M., Morris C.F.* Molecular genetics of puroindolines and related genes: allelic diversity in wheat and other grasses // *Plant Mol. Biol.* – 2008. – **66**, № 3. – P. 205–219.

Надійшла 17.03.11