

Проведено аналіз успадкування ознак насіння соняшнику у зв'язку з олійністю. В F_1 гібридів соняшнику спостерігається цитоплазматичний ефект в успадкуванні ознак “олійність”, “маса насіннини”, “маса ядра”, “маса лушпиння”. В F_2 цитоплазматичний ефект в успадкуванні цих ознак нивільюється. Обговорюються причини даного спостереження.

It has been carried on an analysis of sunflower seed traits inheritance in connection with oil content. Hybrids F_1 have cytoplasmic effect of following traits: “oil content”, “seed weight”, “kernel weight”, “pericarp weight”. In F_2 cytoplasmic effect is disappeared. Reasons of this phenomenon is discussed.

ЗЛАЦКАЯ А.В.

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,
Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: zlatska@hotmail.com*

АЛЛЕЛЬНЫЙ СОСТАВ СОРТОВ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ВОЗДЕЛЫВАЕМЫХ В УКРАИНЕ ПО ГЕНАМ ПУРОИНДОЛИНОВ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ХЛЕБОПЕКАРНЫЕ ПРИЗНАКИ

Пуруиндолины — это щелочные цистеин-богатые белки, имеющие в своем составе триптофан-содержащий гидрофобный домен, благодаря которому они осуществляют связь с липидами мембран [1, 2]. Различают два белка этой группы: пуруиндолин а и пуруиндолин б [3], ассоциирующиеся в клетках зерна пшеницы в белок фриабилин с молекулярной массой 13–15 кД [4], который опосредованно через полярные липиды образует связь с поверхностью крахмальных гранул [5]. Пуруиндолины являются продуктами экспрессии двух генов *Pina-D1* и *Pinb-D1* соответственно [3, 5], маркированные в локусе *Ha*, расположенном на коротком плече хромосомы 5D этой культуры и являющимся основным локусом контролирующим проявление признака твердозерности у мягкой пшеницы [6]. На основе анализа первичной структуры генов *Pina-D1* и *Pinb-D1* было установлено, что диким типом являются мягкозерные пшеницы, генетическую формулу по генам пуруиндолинов которых можно представить в виде *Pina-D1a Pinb-D1a* [7–9]. Мука, полученная из зерна этих пшениц, характеризуется тонкой структурой помола, обладает низкой водопоглотительной способностью и используется преимущественно в кондитерской промышленности для производства печенья, кексов и т.п. Мутации в этих генах приводят к изменениям в структуре фриабилина, что в свою очередь, нарушает связь между крахмальными гранулами и липидно-белковым матриксом эндосперма зерна пшеницы, формируя твердозерный фенотип.

Из пшениц с твердозерным фенотипом получают муку-крупчатку, обладающую повышенной водопоглотительной способностью в сравнении с мукой мягкозерных пшениц, целевое использование которой — хлебопечкарное с применением в технологии дрожжевого брожения и механического

замеса. Комбинацией аллелей генов пуриноидинов можно объяснить от 63% до 93% генетической вариации по этому признаку [9, 10]. Наиболее консервативным геном, с точки зрения обнаруженных мутаций, среди исследованных образцов мировой коллекции сортов мягкой пшеницы является ген *Pina-D1*, у которого были идентифицированы лишь две мутации (аллели *b* и *c*) с нуль-аллельной экспрессией [7–9, 11]. Аллель *Pina-D1b* наиболее распространен среди сортов мировой коллекции, тогда как аллель *Pina-D1c* был идентифицирован лишь у двух сортов Fortuna и Glenman [11], кроме того аллель *Pina-D1b* чаще встречается среди пшениц Латинской Америки, в меньшей степени у Китайских и Центрально-Восточных пшениц Европы и практически совсем не встречается у пшениц Северной Америки, Африки, Северной и Западной Европы [7]. У сортов с нуль-аллельными мутациями по гену *Pina-D1*, отсутствует белок пуриноидина *a* и наблюдается уменьшение концентрации пуриноидина *b*, а также полное отсутствие его связи с крахмальными гранулами [12] и повышение степени твердозерности эндосперма [11]. В отличие от гена *Pina-D1* у гена *Pinb-D1* при исследовании мировой коллекции сортов мягкой пшеницы идентифицировали большее число мутаций, определяющих проявление признака твердозерности. На сегодняшний день известно 6 его естественных мутаций: точковые мутации, которые привели к замене глицина на серин в 46 позиции гена пуриноидина *b* (аллель *Pinb-D1b*) [3], лейцина на пролин в 60-й позиции (*Pinb-D1c*) и триптофана на аргинин в 44 позиции (*Pinb-D1d*) [7], также 3 нуль-аллельные мутации, являющиеся следствием образования стоп-кодона, путем замены триптофана в 39 позиции (*Pinb-D1e*), триптофана в 44 позиции (*Pinb-D1f*) и цистеина в 56 позиции (*Pinb-D1g*) на стоп-кодона [9].

Наиболее распространенными оказались мутации, представленные аллелями *Pinb-D1b* и *Pinb-D1c*, хотя и встречающиеся среди сортов пшеницы всех регионов мира, тем не менее, характеризующиеся разной частотой. Было показано, что эти аллели обладали разной степенью воздействия на признак. Сорта с нуль-аллельными мутациями и носители аллеля *Pinb-D1c* имели исключительно твердозерные свойства (индекс твердозерности 70–77), а сорта-носители аллелей *Pinb-D1b* и *Pinb-D1d* были как твердозерными, так и полутвердозерными (53–83) [7,9]. На территории бывшего СССР, в том числе и на Украине, в течение последних нескольких десятилетий традиционно проводилась селекция на повышение хлебопекарных качеств у озимой мягкой пшеницы и при этом в исследованиях молекулярных основ этих хозяйственно-ценных признаков основное внимание уделяли изучению молекулярно-генетического полиморфизма запасных белков глиадинов и высокомолекулярных глютеинов [13]. Поскольку консистенция эндосперма оказывает влияние на некоторые признаки хлебопекарного качества [14], то целью данной работы было изучение аллельного состава генов *Pina-D1* и *Pinb-D1* группы сортов озимой мягкой пшеницы, допущенных к возделыванию в Украине в 2008 году и представляющих различные селекционные центры, а также некоторых сортов, исторически культивировавшихся на этой

территории, что до настоящего времени не изучалось. В случае идентификации сортов с разным аллельным составом по генам пуринодолинов, было поставлено за цель — изучить их возможное влияние на некоторые признаки хлебопекарного качества в исследованной группе пшениц.

Материалы и методы

Материал. 51 сорт озимой мягкой пшеницы: Мирхад, Мироновская 33, Фишт, Астет, Находка 4, Цыганка, Харус, Зира, Палма, Ларс, Белоцерковская полукарликовая, Мироновская 65, Ясочка, Украинка одесская, Доля, Збруч, Дальницкая, Застава одесская, Красуня одесская, Селянка, Херсонская остистая, Василина, Вдала, Зимоярка, Скарбныця, Веста, Херсонская безостая, Сирена одесская, Шестопаловка, Добирна, Дриада 1, Ремесливна, Спиванка, Куяльник, Юна, Кирия, Мироновская 61, Пивная, Свитанок 1, Знахидка одесская, Украинка полтавская, Диканька, Победа 50, Мироновская раннеспелая, Подолянка, Ятрань 60, Панна, Киевская остистая, Одесская 132, Коломак 5, Донецкая 46. А также Крымка местная, *Pinb-D1* Украинка 0248, Одесская 4, Одесская 16, Одесская 51, Одесская 162, Обрий, Одесская красноколосая. В качестве контроля использовали сорта Безостая 1 *Pina-D1a Pinb-D1b* и сорт Гленлея *Pina-D1b Pinb-D1a*.

Методы. Идентификацию аллельного состава генов *Pina-D1* и *Pinb-D1* проводили при помощи ПЦР метода по методике Гаутьер и др.[5]. Для определения аллеля *Pinb-D1b* использовали CAPS метод с применением фермента BsrBI [15], а *Pinb-D1c* — фермента PvuII [7]. Технологическую оценку сортов пшеницы проводили по методикам [16]. Обработку результатов проводили согласно методам вариационной статистики [17].

Результаты и обсуждения

На первом этапе исследования был проведен анализ аллельного состава сортов пшеницы по гену *Pina-D1* и он оказался консервативным. Все без исключения сорта были носителями аллеля *Pina-D1a* (рис. 1). На следующем

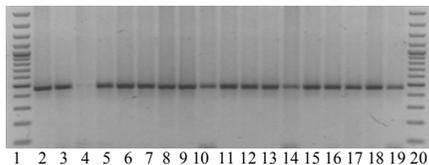


Рис. 1. Результаты ПЦР анализа аллельного состава сортов озимой мягкой пшеницы по гену *pina-D1*: 1, 20 — маркер 100 п.н., 2, 3 — Селянка; 4 — Glenlea; 5 — Безостая 1; 6, 7 — Зимоярка; 8, 9 — Скарбныця; 10, 11 — Спиванка; 12, 13 — Сирена одесская; 14, 15 — Украинка одесская; 16, 17 — Украинка полтавская; 18, 19 — Фишт

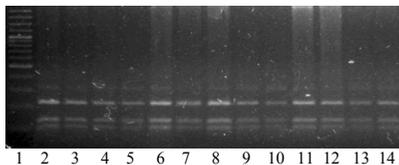


Рис. 2. Определение аллеля *Pinb-D1b*. Результаты рестрикции продукта амплификации участка гена *Pinb-D1* при помощи фермента BsrBI: 1 — Маркер 100 п.н.; 2, 3 — Безостая 1, 4, 5 — Скарбныця, 6, 7 — Спиванка, 8, 9 — Сирена одесская, 10, 11 — Украинка одесская, 12, 13 — Украинка полтавская, 14 — Фишт

этапе провели исследование по определению аллельного состава по гену *Pinb-D1*. Для четкого определения кроме ПЦП проводили рестрикцию полученного фрагмента амплификации 447 п.н. специально подобранными ферментами. При мутации *Pinb-D1b*, в следствие которой произошла замена глицина (GGC) на серин (AGC), при обработке полученного продукта амплификации при помощи фермента рестрикции *BsrBI* будут наблюдаться три фрагмента размером 223 п.н., 129 п.н. и 95 п.н., а в случае отсутствия этой мутации — два 129 п.н. и 318 п.н. В случае присутствия мутации *Pinb-D1c*, являющейся следствием замены лейцина (CTG) на пролин (CCG), при обработке полученного продукта амплификации ферментом рестрикции *PvuII* будет наблюдаться только один фрагмент, отвечающий по размерам продукту амплификации 447 п.н., а в случае отсутствия этой мутации — два 264 п.н. и 183 п.н. В результате оказалось, что большинство исследованных сортов, включая стародавние, являются носителями аллеля *Pinb-D1b* (рис. 2). Исключение составили сорта Цыганка и Зимоярка — носители *Pinb-D1c* (рис. 3). Следовательно, генетическую формулу большинства исследованных сортов по генам пуриноидинов, можно представить в виде *Pina-D1a Pinb-D1b*, а для сортов Цыганка и Зимоярка — *Pina-D1a Pinb-D1c*. Полученные результаты полностью отвечают мировым тенденциям относительно распространения мутаций генов твердозерности у сортов озимой пшеницы. Так, подавляющее большинство сортов, культивирующихся и исторически возделываемых в США, являются носителями генетической формулы *Pina-D1aPinb-D1b* и лишь несколько сортов имели нуль-аллельные мутации по этому гену [9]. У сортов Северной Европы преимущество составляли сорта-носители комбинаций аллелей *Pina-D1aPinb-D1b*, лишь некоторые имели *Pina-D1bPinb-D1a*, *Pina-D1aPinb-D1c* и *Pina-D1aPinb-D1d* [7]. На следующем этапе у всех исследованных образцов сортов были определены “сила муки” и “объем хлеба”. Полученные результаты были усреднены и на их основании, используя методы вариационной статистики, сорта были поделены на классы и произведена проверка для выяснения в какой из статистических классов попадут сорта-носители

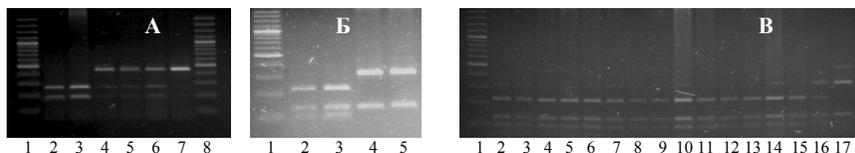
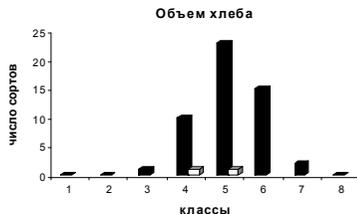
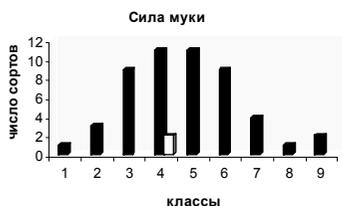


Рис. 3. Идентификации аллельного состава гена *Pinb-D1* у сортов мягкой пшеницы. А — Результаты рестрикции участка гена *Pinb-D1* при помощи фермента *PvuII*: 1, 8 — Маркер 100 п.н., 2, 3 — Безостая 1, 4, 5 — Зимоярка, 6, 7 — Цыганка; Б, В — Результаты рестрикции участка гена *Pinb-D1* при помощи фермента *BsrBI*: Б — 1 Маркер 100 п.н., 2, 3 — Безостая 1, 4, 5 — Зимоярка; В — 1 — Маркер 100 п.н., 2, 3 — Кольчуга, 4, 5 — Красуня одесская, 6, 7 — Куяльник, 8, 9 — Ларс, 10, 11 — Мироновская 33, 12, 13 — Мироновская 65, 14, 15 — Мироновская 808, 16, 17 — Цыганка



А

Б

Рис. 4. Принадлежность сортов-носителей аллелей *Pina-D1aPinb-D1c* к статистическим классам по признаку А — “сила муки” и Б — “объем хлеба” (черные столбцы — общее число сортов в каждом из классов; белые — сорта-носители аллелей *Pina-D1aPinb-D1c*)

аллельного состава *Pina-D1aPinb-D1c* (рис. 4). Несмотря на низкое содержание белка в зерне этих сортов, аллельный состав запасных белков: высокомолекулярных глютелинов (Цыганка — *sed*, Зимоярка — *аса*) и глиадинов, содержащий аллели понижающие хлебопекарное качество, Цыганка и Зимоярка характеризовались силой муки 316–364 е.а. и объемом хлеба 950–1100 мл, что свидетельствует о положительном влиянии аллельной комбинации *Pina-D1aPinb-D1c* на некоторые показатели хлебопекарного качества, наиболее вероятно путем увеличения водопоглотительной способности муки.

Выводы. Исследованные сорта озимой мягкой пшеницы показали низкий уровень полиморфизма по аллельному составу генов пуриноидолинов *Pina-D1aPinb-D1b*. Два сорта Цыганка и Зимоярка характеризовались аллельным составом *Pina-D1aPinb-D1c* и был показан позитивный эффект этой аллельной комбинации на некоторые признаки хлебопекарного качества. Этот факт открывает перспективы по дальнейшей генетической манипуляции с этим признаком у пшеницы для улучшения ее качества.

Литература

1. Dubreil L., Compoint J-P. et al. Interaction of puroindolines with wheat flour polar lipids determines their foaming properties // J. Agric. Food Chem.— 1997.— 45.— P. 108–116.
2. Wilde P.J., Clark D.C. et al. Influence of competitive adsorption of a lysopalmitoylphosphatidylcholine on the functional properties of puroindoline, a lipid-binding protein isolated from wheat flour // J. Agric. Food Chem.— 1993.— 41.— P. 1570–1576.
3. Giroux M. et al. A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low level of starch-surface friabilin // Theor.Appl.Genet.— 1997.— 95.— P. 857–864.
4. Greenwell P, Schofield J.D. The chemical basis of grain hardness and softness. In: Wheat end-use properties.— Helsinki H, Salovaara eds. University of Helsinki and Lahti Research Training Center, 1989.— P. 59–72.

5. *Gautier M. et al. T.aestivum* puroindolines, two basic cystine-rich seeds protein: cDNA sequence analysis and developmental gene expression // *Plant Mol. Biol.*— 1994.— 25.— P. 43–57.
6. *Symes K.J.* The inheritance of grain hardness in wheat as measured by the particle size index // *Austr. J. Agric. Res.*— 1965.— 16.— P. 113–123.
7. *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.— P. 1100–1107.
8. *Giroux M.J., Morris C.* Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 1998.— 95.— P. 6262–6266.
9. *Morris C., Lillemo M. et al.* Prevalence of puroindoline grain hardness genotypes among historically significant North American spring and winter wheat // *Crop. Sci.*— 2001.— 41.— P. 218–228.
10. *Lillemo M., Ringlund K.* Impact of puroindoline b alleles on the genetic variation for hardness in soft x hard wheat crosses // *Plant Breed.*— 2002.— 121.— P. 210–217.
11. *Gazza L., Nocente F. et al.* Genetic and biochemical analysis of common wheat cultivars lacking puroindoline // *Theor. Appl. Genet.*— 2005.— 110.— P. 470–478.
12. *Capparelli R., Borriello G. et al.* Puroindoline A-gene expression is involved in association of puroindolines to starch // *Theor. Appl. Genet.*— 2003.— 107.— P. 1463–1468.
13. *Созинов А.А.* Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции.— М.: Наука, 1985.— 272 с.
14. *Branlard G., Dardevet M., et al.* Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality // *Euphytica.*— 2001.— 119.— P. 59–67.
15. *Tranquilli G., Lijavetzky D. et al.* Genetic and physical characterization of grain texture-related loci in diploid wheat // *Mol. Gen. Genet.*— 1999.— 262.— P. 846–850.
16. *Методика державного сортовипробування сільськогосподарських культур. Методи визначення показників якості рослинницької продукції / Під ред. В.В. Волкова.— К.: Алефа, 2000.— 144 с.*
17. *Лакін Г.Ф.* Биометрия. М.: Высшая школа, 1980.— 296 с.

Резюме

Алельний состав большинства исследованных сортов озимой мягкой пшеницы по генам пурииндолинов оказался *Pina-D1a Pinb-D1b*. У двух сортов Цыганка и Зимоярка — *Pina-D1a Pinb-D1c*, который, вероятно, оказывает позитивный эффект на признаки хлебопекарного качества.

Алельний склад більшості досліджених сортів озимой м'якої пшениці за генами пурииндолинів виявився *Pina-D1a Pinb-D1b*. У двох сортів Циганка і Зимоярка — *Pina-D1a Pinb-D1c*, що найбільш імовірно, здійснює позитивний вплив на ознаки хлібопекарської якості.

The allele combination of the most common winter wheat varieties studied in present work appeared to be *Pina-D1a Pinb-D1b*. Two varieties Tsyganka and Zymojarcka possess *Pina-D1a Pinb-D1c*, which the most probably have positive effect on the characteristics of the end-use quality.

ЗЛАЦКАЯ А.В.

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,
Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: zlatska@hotmail.com*

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НЕКОТОРЫХ
SSR-МАРКЕРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С QTL СОДЕРЖАНИЯ
БЕЛКА В ЗЕРНЕ У МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ,
ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭТОГО ПРИЗНАКА У СОРТОВ,
КУЛЬТИВИРУЮЩИХСЯ В УКРАИНЕ**

Признак “содержание белка в зерне” (СБЗ) является одним из наиболее важных признаков, определяющих хозяйственно-ценные качества мягкой пшеницы. Известно, что он, как и преимущественное большинство количественных признаков, достаточно сложен для генетических исследований из-за значительного влияния на это экспрессию абиотических и биотических факторов [1]. Тем не менее, в последнее десятилетие, при использовании специально созданного генетического материала и при помощи молекулярно-генетических маркеров (преимущественно SSR) были идентифицированы некоторые QTL (локусы количественных признаков) признака СБЗ как у мягкой, так и у твердой пшеницы. Эти работы подтвердили сложившиеся еще в 80–90-х годах XX столетия представления о том, что на признак СБЗ не влияет аллельный состав запасных белков, а этот признак контролируется другими генами регуляторного типа, расположенными и на других хромосомах [см. обзор 1]. Одним из первых маркеров этого признака оказался микросателлитный маркер *wmc 41*, расположенный на хромосоме 2DL мягкой пшеницы и маркирующий QTL определяющий до 18,73% генетической изменчивости по этому признаку при исследовании популяции рекомбинантно-инбредных (РИЛ) и почти изогенных линий [2,3]. Следующим был идентифицирован маркер *wmc 415*, расположенный на хромосоме 5AS и определяющий 6,21% генетической изменчивости по этому признаку на популяции почти изогенных линий мягкой пшеницы, полученных в Индии [4]. В последующих исследованиях были идентифицированы и другие локусы на других хромосомах. Преимущественно это были хромосомы 2-й гомеологической группы, 3DS, 4AL, 6BS, 7AS и 7DS [3]. Причем, в разных группах линий, не все идентифицированные локусы проявляли один и тот же эффект. Чаще всего и практически во всех случаях было установлено позитивное влияние локусов, контролирующих СБЗ, расположенных на хромосомах 2-й гомеологической группы. Возможно, этот факт, связанный с тем, что на хромосомах этой гомеологической группы расположены гены азотного обмена [5]. У твердой же пшеницы локус, характеризующий высокое СБЗ, был четко маркирован на хромосоме 6BS [6]. В данном исследовании мы использовали микросателлиты, маркирующие богатые генами регионы ДНК, связанные с устойчивостью к ряду патогенов и одними из первых показавшие связь с проявлением признака СБЗ: *wmc 41* хромосома 2 DL и *wmc 415* хромосома 5A и 5B [2-4] с целью