

УДК 577.113:575.22:633.11

СУЧАСНИЙ СТАН ДОСЛІДЖЕНЬ ЗАПАСНИХ БІЛКІВ ПШЕНИЦІ

В.М. ПОЧИНОК, О.М. РАДЧЕНКО

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17*

Проаналізовано літературні дані стосовно селекційного поліпшення якості зерна пшениці. Обговорюються роботи, присвячені дослідженню генотипних особливостей ознак «вміст білка в зерні», «сила борошна». Запропоновано шляхи подальшого вивчення закономірностей формування цих ознак та можливостей їх поліпшення.

Ключові слова: озима пшениця, вміст білка в зерні, високомолекулярні глютеніни, маркери.

Українська пшениця традиційно вирізнялась дуже високим рівнем клейковини. Цьому сприяли кліматичні умови України, родючі чорноземи, культивування стародавніх сортів екстенсивного типу. За врожайності 12—16 ц/га пшениця була повністю забезпечена азотним живленням, що є визначальним у накопиченні білка і клейковини в зерні. Така картина спостерігалась до кінця 1950-х років, коли були поширені сорти Одеська 3, Одеська 16. Із 1960-х років ситуація кардинально змінилась. Врожаї пшениці зросли в 2—3 рази, що призвело до зниження вмісту клейковини в зерні. Недостатній рівень фізичних властивостей тіста в цілому і клейковини зокрема породив в Україні проблему отримання високоякісного борошна. Саме в цей час у колишньому Радянському Союзі створювалась низка лабораторій. Одночасно в Одесі й колишньому Ленінграді було сформовано дві групи дослідників з вивчення поліморфізму запасних білків пшениці. Вони займались проблемами збільшення вмісту білка в зерні, поліпшення фізичних властивостей тіста і клейковини, підвищення врожайності нових сортів. Було створено чимало сортів сильної озимої м'якої пшениці. Серед них Миронівська 808, Безоста 1, Одеська 51 тощо, створені селекціонерами В.М. Ремеслом, П.П. Лук'яненком, Ф.Г. Кириченком, О.А. Калініченком.

Епоха сортів Миронівська 808, Безоста 1, Одеська 51 та інших з потенційною продуктивністю 50 ц/га давно скінчилась. З'явилися нові сорти озимої м'якої пшениці з високим генетичним потенціалом урожайності, в яких почав діяти ефект розбавлення вмісту білка в зерні зі збільшенням його продуктивності. Однак проблема якості зерна досі залишається невирішеною. Особливо гостро вона стоїть нині, коли Україна прагне стати експортером пшениці.

У 2001 р. в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України з ініціативи академіка НАН України В.В. Моргуна суттєво розширились дослідження з проблеми генетичного поліпшення якості зерна пшениці, ним була організована лабораторія якості зерна. За цей період вивчено

генетичні системи контролю запасних білків, що стосуються формування рівня якості зерна пшениці в сортах, рекомендованих до районування в Україні, та мутантних лініях із застосуванням молекулярних методів досліджень.

Зв'язок глютенінів і гліадинів із показниками якості зерна. Білки зерна пшениці інтенсивно досліджують більш як два століття, починаючи з роботи Бекари (1745) з виділення клейковини пшениці [13]. Ці білки умовно поділяють на 4 типи за їх розчинністю: альбуміни — розчинні у воді; глобуліни — в розчинах солей; проламіни — в 70 %-му етанолі; глютеліни — в розчинах лугів. Кожна з фракцій — це складна суміш різних білків із переважанням тієї чи іншої складової. Поділ білків тільки на основі їх розчинності за Осборном — не найнадійніший критерій їх класифікації, однак він популярний і сьогодні.

Альбуміни і глобуліни в зерні пшениці становлять 15—20 % загального білка і є фракцією легкорозчинних білків. Це функціонально активні сполуки: ферменти, інгібітори, нуклеопротейди, глікопротейди, пуротіоніни, лектини, тіоніни та ін. При цьому найбільший відсоток серед ферментів належить β -амілазі та α -протеазі. Близько 20 % усіх альбумінів у зерні *Triticum aestivum* L. — це головний альбумін, бідний на фенілаланін, гістидин, без вільних SH-груп, але містить багато дисульфідних зв'язків.

Запасні білки в зерні пшениці — гліадини і глютеніни — становлять 80—85 % загального білка ендосперму, містять 50 % гліадину, 10 — високомолекулярного глютеніну і 40 % — низькомолекулярного глютеніну [8, 43]. Гліадини є сумішшю індивідуальних поліпептидів, тоді як глютеніни — не індивідуальний білок, а продукт агрегації різнорідних молекул проламіну, що включає також альбумін-глобулінові білки.

Глютеніни впливають на пружність, еластичність, в'язкість і розтяжність тіста (реологічні властивості).

Ключовим показником якості зерна є «сила» борошна (*W*). Визначення «сили» борошна на альвеографі, запатентованому компанією «Chopin» — досить тривалий та дорогий процес. Тому одразу ж після впровадження в технологічний аналіз альвеографа набула привабливості ідея знайти простий та швидкісний спосіб непрямого визначення «сили» борошна. Так з'явилися три основні методи визначення седиментації борошна: за Зелені, метод SDS-седиментації за Аксфордом та седиментація за Пумп'янським—Созіновим.

Перші два методи широко використовуються на Заході, останній — на території колишнього СРСР. Всі ці методи седиментації мають три основні недоліки: об'єм осаду седиментації значною мірою залежить від рівня твердозерності та загального вмісту білка в зерні. Через це залежність між показниками седиментації і силою борошна може суттєво варіювати від зразка до зразка зерна.

В Селекційно-генетичному інституті НААН України під керівництвом О.І. Рибалки [9] розроблено новий метод седиментації цілозмельеного зерна (шроту) або борошна (30 % або 70 % виходу) з попереднім автолізом і наступною седиментацією. Метод SDS30 значно надійніший за інші відомі методи седиментації. Він показав найвищу корелятивну залежність із «силою» тіста (*W*) та індексом еластичності тіста (*Ie*) і не корелює із загальним вмістом білка в зерні.

Запасні білки — основна складова частина білків зерна пшениці. Вони синтезуються в період його дозрівання разом із вуглеводами й

ліпідами, пізніше за інших з'являються в онтогенезі і найпершими використовуються при проростанні для росту і розвитку молоді рослини. Електрофоретичний склад запасних білків майже не змінюється в різних умовах культивування рослин, однак характеризується тканинспецифічністю.

Синтезуються запасні білки на полісомах, зв'язаних з мембранами ендоплазматичного ретикулула і відкладаються в білкових тілах [12]. У пшениці білкові тіла виявив Мортон та співавт. [42]. Закономірності їх накопичення вивчено недостатньо.

За допомогою двовимірного ПААГ-електрофорезу гліадини і глютеніни можна розділити на субодиниці [43]. При цьому гліадини фракціонуються на 40—50 індивідуальних компонентів. Більшість гліадинових фракцій — α -, β -, ω -гліадини залежно від їх рухливості в спектрі складається з поліпептидів з мол. м. 32—44 кД. Найменшу рухливість у кислому ПААГ гелі мають ω -гліадини з мол. м. 50—70 кД. Унаслідок редукції дисульфідних зв'язків під впливом 2-меркаптоетанолу утворюються дві групи поліпептидів, які класифікують як високомолекулярні глютеніни (ВМГ) з мол. м. 80—150 кД та низькомолекулярні субодиниці з мол. м. 40—70 кД.

До вільних, або мономерних, S-багатих проламінів належать α -, β -, ω -гліадини з мол. м. 27—44 кД, які містять 2,5—3,5 % цистеїну та метіоніну; ω -гліадини належать до збіднених на сірку проламінів з мол. м. 45—80 кД, що практично не містять цистеїну й метіоніну, однак мають високий відсоток глютаміну, проліну, фенілаланіну.

Принципова відмінність між вільними й агрегованими S-багатими проламінами полягає в тому, що у перших цистеїнові залишки утворюють внутрішньомолекулярні дисульфідні зшивки, тоді як у других — міжмолекулярні. Тому молекули перших вільні, других — агреговані. Агреговані S-багаті проламіни можна виділити з пшеничного борошна тільки дією 2-меркаптоетанолу, їх називають низькомолекулярними глютенінами. Високомолекулярним субодиницям глютеніну відповідають агреговані за участю зовнішніх дисульфідних зв'язків високомолекулярні проламіни.

За останні три десятиліття досягнуто значних успіхів у селекції пшениці. Разом з тим проблема якості зерна залишається відкритою і сьогодні. На думку дослідників, значний внесок у її вирішення мають зробити теоретичні розробки із застосуванням молекулярних методів дослідження генетичних систем, які контролюють якість зерна, а саме: генетично обумовленого складу гліадину і глютеніну.

У результаті досліджень Созінова та співавт. [11] виявлено зв'язок певних алейних варіантів білків із господарсько-цінними ознаками пшениці. Так, встановлено, що на початку 1950-х років у електрофоретичному спектрі гліадинів озимих пшениць Півдня України та Північного Кавказу з'явився новий алей Gli-1A4. Він позитивно впливає на силу борошна, тобто забезпечує отримання пружного тіста. В результаті селекційного добору на якість зерна в українських сортах почали переважати алей Gli-1A4 замість Gli-1A1.

У післявоєнні роки (1945—1955) в північних районах України почали домінувати сорти з блоком гліадинів Gli-1D5. Аналізом великої кількості сортів виявлено, що в найбільш зимостійких із них є алей Gli-1D5 та Gli-6A3.

У середині 1960-х років на Півдні України й Північному Кавказі, а також у деяких Балканських країнах почали поширюватись сорти з алелем Gli-1В3, який пов'язаний з високою продуктивністю, стійкістю до стеблової іржі та може бути маркером 1В/1R житньо-пшеничної транслокації [2, 5]. Цей алель вперше виявлено в сортах Кавказ, Аврора та інших.

В Україні в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України найефективніше використано житні транслокації в селекції озимої пшениці. На їх основі створено принципово нове покоління високопродуктивних сортів, стійких до несприятливих умов довкілля (Колумбія, Золотоколоса, Смуглянка, Солоха, Фаворитка та інші).

Показано, що алель Gli-1В1, який з'явився у місцевих Кримок на Півдні України, стійко передається багатьом сортам. Практично всі українські сорти містять його, незважаючи на те що в локусі Gli-1В ідентифіковано ще 11 алелів.

Певні взаємозв'язки з якістю виявлено також для локусів високомолекулярних глютенінів. В експериментах Пейна [44] встановлено, що алелі а і b локусу Glu-A1 значно впливають на якість білка. Виявлено [30], що вміст клейковини та поглинання води збільшуються у генотипів з алелем b, при цьому скорочується час утворення тіста. За наявності алеля Glu-B1c скорочується час замісу тіста, збільшуються об'єм хліба, фаринографічна абсорбція води і вміст клейковини [30]. Згідно з даними Пейна [44], алель Glu-B1b великою мірою впливає на хлібопекарські якості.

Однак найцікавіший для вивчення впливу ВМГ на ознаки хлібопекарської якості алель Glu-B1a1, продуктом експресії якого є дві субодиниці Vx7^{OE}+Vu8*, перша з них має підвищений рівень експресії Vx7 порівняно з субодиницею зі звичайним його рівнем [6]. Алель Glu-B1a1 — вкрай рідкісний серед світової популяції сортів м'якої пшениці. Його ідентифіковано серед біотипів угорського стародавнього сорту Bankuti 1201 [29], австралійських сортів Kukri, Chara і селекційної лінії CD87, аргентинських сортів Klein Universal, Sinvalocho 4339, Teranos Pintos Precoz [20], у групі канадських надсильних пшениць Glenlea, Wildcat, Bluesky, ES-4 [37], що привернуло всесвітню увагу до його детальнішого дослідження.

Іншою особливістю при вивченні цього алеля є той факт, що його складно ідентифікувати за допомогою звичайного електрофоретичного розділення в ДСН-ПААГ: субодиниця Vx7^{OE} дещо товстіша за звичайну субодиницю Vx7. У комплексі з електрофоретичним розділенням цей алель можна ідентифікувати: 1) за елюцією піка субодиниці Vu до піка субодиниці Dx за допомогою RP-HPLC; 2) за підвищеною експресією субодиниці Vx7 (мол. частка Vx > 39 %); 3) за інсерцією у 43 пари нуклеотидів у регіоні MAR (matrix-attachment region), що розміщений за промотором гена Vx7 та дуплікацією у 18 пар нуклеотидів у кодувальному регіоні гена [20].

Особливо потрібно відмітити роботи Поперелі [3], якому вдалось виявити у сорту Одеська червоноколоса алель Glt 1В5, що має великий позитивний вплив на силу борошна. На сьогодні відомо, що даний сорт має алель Glu-B1a1. Таким чином, Попереля був одним із перших, хто виявив цей алель.

Відомо, що фракція глютенінів пшеничного зерна містить не тільки високомолекулярні (мол. м. 80—120 кД), а й низькомолекулярні

глютеніни мол. м. 30—50 кД. Низькомолекулярні глютеніни кодуються генними кластерами Glu-A3, Glu-B3, Glu-D3, які знаходяться на коротких плечах хромосом 1A, 1B, 1D і тісно зчеплені з гліадинкодувальними локусами Gli A1, Gli B1, Gli D1 [27]. Технічні ускладнення, що виникали під час фракціонування й ідентифікації компонентів низькомолекулярних глютенінів в умовах SDS-ПААГ електрофорезу, обмежували розвиток досліджень генетики цих білків, вивчення впливу на ознаки якості, перешкоджали створенню уніфікованої номенклатури для алелів цих локусів. Певні сподівання у вирішенні цього питання покладають на залучення ДНК-маркерів до досліджень локусів низькомолекулярних глютенінів. За результатами вивчення впливу окремих алелів низькомолекулярних глютенінів на якість встановлено, що алель Glu-A3b позитивніше впливає на показник SDS-седиментації, ніж інші алелі локусу Glu-A3. Серед алелів локусу Glu-B3 найліпшими виявились Glu-B3g і Glu-B3b. Водночас алель Glu-B3j, асоційований з 1BL/1RS транслокацією, негативно впливає на показники якості [53].

Удосконалення сортів пшениці передбачає пошук нових генів, що значно перевершать існуючі за впливом на показники хлібопекарської якості. У пошуку таких генів найефективнішими є білкові та ДНК-маркери.

Генетичний контроль вмісту білка в зерні пшениці. Історія досліджень генетичної природи ознаки вмісту білка в зерні бере початок з 1920-х років. Залежно від досліджуваного матеріалу, способу оцінки ознаки і методу обробки отриманих результатів учені доходили різних висновків. У більшості дослідів вказується полігенний контроль цієї ознаки. Низький вміст білка успадковується як частково домінуюча ознака [22]. Відмічено, що вміст білка в зерні знаходиться під контролем регуляторних генів, а не генів, які кодують запасні білки [35].

В історичному аспекті інтерес до вивчення вмісту білка нерівномірний. Поява нового рослинного матеріалу, розробка нових методів оцінювання ознаки, нових математичних моделей для генетичного аналізу і молекулярно-генетичних методів дослідження рослин зумовили різке збільшення числа робіт цього напрямку. Розглянемо деякі етапи, які найбільше вплинули на формування уявлень щодо генетичного контролю вмісту білка в зерні.

Встановлення кореляції між вмістом білка в зерні та іншими ознаками, а також біотичними й абіотичними чинниками було одним із перших цілеспрямованих етапів вивчення цієї ознаки. Майже відразу було встановлено, що на вміст білка в зерні, як і на інші кількісні ознаки, значно впливають умови навколишнього середовища: кількість опадів, температура в період наливання зерна, умови зрошення, забезпеченість поживними речовинами [14]. Було зроблено висновок, що різноманітність ознаки лише частково обумовлена генотипом, все інше — результат дії умов вирощування або взаємодії генотип \times середовище. Виявлено різницю вмісту білка в зерні не тільки між рослинами однієї популяції, а й між різними зернами одного колоса.

Встановлено інші закономірності: за вмістом загального білка ярі пшениці перевершують озимі, а тетраплоїдні містять більше білка, ніж гексаплоїдні [50]; за однакових умов вирощування стійкі до мутагенів рослини містять більше білка в зерні, ніж нестійкі.

Проте найнеприємнішим фактом для селекціонерів було виявлення негативних кореляцій між ознакою вмісту білка в зерні та компонен-

тами структури врожаю (маса зерна, розмір зерна, урожай зерна, кількість зерен із колоса, кількість зерен із рослини) [34]. Їх наявність є свідченням того, що поліпшення сортів м'якої пшениці за вмістом білка в зерні — дуже складне завдання. Встановити причину таких кореляцій і визначити шляхи їх розриву можна лише детальним генетичним дослідженням, яке дасть чітке уявлення про генетичну структуру цієї ознаки.

У 1960—1970-ті роки моносомний аналіз відіграв найпомітнішу роль у генетичних дослідженнях пшениці. Цей етап пов'язаний із розробкою підходів до створення анеуплоїдів м'якої пшениці (моносоміки, нулісоміки, нулітетрасоміки) і початком робіт із хромосомної інженерії — створення хромосомно заміщених, чужорідно заміщених ліній. Метод моносомного аналізу успішно застосовували для встановлення хромосомної локалізації генів, які контролюють низку морфологічних і біохімічних (якісних) ознак, тому робили спроби його використання для аналізу кількісних ознак, у тім числі й ознаки вмісту білка в зерні. З 1962 по 1973 р. Моріс [41] на підставі результатів, отриманих різними дослідниками на різному матеріалі, опублікувала таблицю щодо хромосомної локалізації генів, які беруть участь у контролі кількісних ознак. Згідно з цією таблицею, лише хромосоми 2D і 4D не беруть участі в контролюванні ознаки вміст білка в зерні м'якої пшениці.

За результатами робіт з моносомного аналізу зроблено висновок про велику кількість генів, які впливають на вияв ознаки, і про те, що вона складно піддається генетичним дослідженням і виявляється переважно фізіологічно. Водночас з'явилося багато публікацій, які розкривали недоліки моносомного аналізу в разі його застосування для дослідження кількісних ознак. У зв'язку з цим в останні 15 років метод моносомного аналізу не застосовують для дослідження вмісту білка в зерні, як і інших кількісних ознак.

Набагато ціннішим надбанням цього періоду були лінії з міжсортним заміщенням хромосом. Вони характеризувались збалансованим набором хромосом ($2n = 42$) і давали змогу тестувати хромосоми сорту-донора на фоні генотипу сорту-реципієнта. За їх використання вдалося знайти хромосому локалізацію генів, що контролюють вміст білка в зерні, у високобілкового сорту Атлас 66 [11]. Під час молекулярного маркування господарсько-корисних ознак ці лінії стали цінним рослинним матеріалом для маркування і вивчення молекулярно-генетичних основ ознаки вміст білка в зерні [49].

На сьогодні найзручнішим рослинним матеріалом для генетичних досліджень кількісних ознак, у тім числі ознаки вміст білка в зерні, вважають рекомбінантно-інбредні лінії, подвоєні гаплоїди, рекомбінантно-заміщені лінії і геномно-додані форми. Велику допомогу в дослідженні цієї ознаки можуть надати майже ізогенні лінії [47].

В останні роки з використанням спеціального генетичного матеріалу, а також молекулярно-генетичних маркерів виявлено локуси кількісних ознак вмісту білка в зерні м'якої пшениці. Одним із перших був мікросателітний маркер *wmc 41*, розміщений на хромосомі 2D м'якої пшениці, який маркує QTL, що визначає 18,73 % генетичної мінливості ознаки [46]. Потім було виявлено маркер *wmc 415*, що знаходиться на хромосомі 5A і визначає 6,21 % генетичної мінливості ознаки в популяції майже ізогенних ліній [47]. У подальших дослідженнях було знайдено інші локуси на хромосомах 3D, 4A, 6B, 7A, 7D [46].

Згідно з даними останніх років, найефективнішими для виявлення локусів кількісних ознак вмісту білка в зерні пшениці є ДНК-маркери.

Пуроіндоліни та їх вплив на господарсько-цінні ознаки. Консистенція ендосперму озимої м'якої пшениці відіграє вирішальну роль у технологічному визначенні напряму використання зерна цієї культури. За ознакою консистенція ендосперму на світовому ринку сорти м'якої пшениці поділяють на твердозерні та м'якозерні [19]. На сьогодні використовують два методи визначення твердості зерна: встановлення індексу розміру часточок (particle size index, PSI) за виходом борошна, просіяного крізь сито з отворами певного розміру, та використання інфрачервоної спектроскопії в ближньому діапазоні випромінювання. Борошно твердозерної м'якої пшениці доцільно використовувати для випікання хліба, м'якозерної — для виготовлення кондитерських виробів [36].

Перші генетичні дослідження характеру успадкування текстури ендосперму виконані на гібридах від схрещування твердозерної пшениці Falcon з м'якозерною пшеницею Heron [10]. Встановлено, що відмінності сортів за цією ознакою визначаються одним локусом. Основним локусом, який контролює твердозерність пшениці, є локус *Ha* (Hardness), розміщений на короткому плечі хромосоми 5D [38]. У ньому виявлено два гени (*Pina-D1*, *Pinb-D1*), які кодують білки пуроіндолін *a* та пуроіндолін *b* [24].

Відкрито білок фріабілін, який у великій кількості міститься в м'якозерних пшеницях, у незначній кількості — у твердозерних і відсутній — у тетраплоїдній пшениці.

М'якозерні сорти характеризуються таким аельним складом, як *pina-D1* та *pinb-D1a*, що є дикою формою [26]. Будь-яка мутація в цих генах призводить до появи твердозерного генотипу. Взагалі в озимій м'якої пшениці виявлено 3 алелі гена *pina* і 6 алелів гена *pinb*.

Найпоширенішою в озимій м'якої пшениці мутацією (алель *pina-D1b*) є нуль-алельна. Інший алель — *pina-D1c* також характерний для озимої м'якої пшениці, але він рідкісний [25] і теж має нуль-алельний прояв. Це наслідок точкової мутації в кодувальному регіоні гена *pina-D1*. Алель *pina-D1b* поширений серед пшениць Латинської Америки і майже зовсім не трапляється серед пшениць Північної Америки, Африки, Північної та Західної Європи [36].

В гені *pinb-D1* сортів м'якої пшениці виявлено більше число мутацій. На сьогодні відомо шість мутацій гена *pinb*: точкові мутації гена пуроіндоліну *b*, які призводять до заміни гліцину на серин (алель *pinb-D1b*), до заміни лейцину на пролін (алель *pinb-D1c*), триптофану на аргінін (алель *pinb-D1d*), три нуль-алельні мутації (*pinb-D1e*, *pinb-D1f*, *pinb-D1g*) [40], які спричинили утворення стоп-кодонів.

Останнім часом в Україні почав розвиватись новий напрямок зі створення сортів пшениці спеціального використання. Так, на основі використання гена *Ha* (хромосома 5D) з ефектом «екстрасофт», що походить від *Aegilops tauschii* (*DD*, $2n = 14$), Рибалкою [7] створено перспективний селекційний матеріал та перший в Україні сорт бісквітної пшениці Оксана (районований у 2007 р.) — перший національний стандарт для сортів спеціального кондитерського використання.

Розпочато дослідження пшениці типу ваксі. Це пшениця, в якій поєднання трьох неактивних нуль-алелів генів *Wx-A1*, *Wx-B1* і *Wx-D1* спричинило повне блокування синтезу ферменту GBSS і амілози. Пше-

ниця ваксі — унікальний генетичний матеріал для створення сортів нового покоління, борошно яких за добавлення у певних кількостях до борошна звичайної пшениці здатне поліпшувати якість хліба за рахунок аномально високої амілолітичної активності та високої газогенеруючої здатності тіста. У чистому вигляді борошно пшениці ваксі не придатне для випікання хліба традиційних сортів [4].

Молекулярно-генетичні маркери пшениці. Успіхи в розвитку генетичних досліджень визначаються наявністю інформативних генетичних маркерів. Спочатку як генетичні маркери використовували морфологічні ознаки. За їх допомогою побудовано першу генетичну карту. Однак кількість таких маркерів обмежена. Морфологічні ознаки мають складний характер успадкування і залежать від умов навколишнього середовища [39]. Розвиток молекулярних методів дослідження уможливив аналіз генетичного поліморфізму на рівні продуктів генів (білковий поліморфізм) та на рівні генетичного матеріалу (поліморфізм ДНК).

Перші молекулярні маркери були створені на основі аналізу білкового поліморфізму, однак згодом виявились обмеження в їх використанні. Аналізом білків можна дослідити поліморфізм лише білок-кодуювальних послідовностей і лише в генах, які експресуються. Застосування білкових систем також обмежене недостатнім рівнем внутрішньовидового поліморфізму. Всі ці обмеження ініціювали розробку маркерних систем нового покоління — ДНК-маркерів. Вирішальну роль у їх становленні й розвитку відіграла розробка методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Багато ДНК-технологій ґрунтується на цьому принципі [1].

У молекулярній генетиці розроблено низку підходів, які з високою точністю дають змогу виявляти поліморфізм ДНК у рослин. Умовно можна визначити три основні групи завдань, для вирішення яких успішно застосовують фрагменти ДНК як генетичні маркери:

- 1) створення докладних генетичних і фізичних карт хромосом різних видів культурних рослин;
- 2) маркування окремих генів, які контролюють якісні ознаки, та груп генів, що детермінують кількісні ознаки (QTL);
- 3) ідентифікація й оцінювання генофонду різних видів рослин, характеристика генетично модифікованих рослин і гібридних форм, вивчення організації геномів, філогенетичний аналіз [28].

Молекулярні маркери, розроблені для багатьох важливих ознак пшениці, стали основою селекції з їх застосуванням (MAS). У селекційних програмах MAS до них поставлено такі вимоги:

- 1) ефективний скринінг великої кількості різноманітних популяцій за допомогою молекулярних маркерів;
- 2) маркери мають бути тісно зчеплені з бажаною ознакою;
- 3) техніка скринінгу має бути добре відтворюваною в лабораторіях та економічно вигідною за широкомасштабного застосування.

Вони особливо необхідні для маркування важливих ознак, які іншими способами позначити складно. Аналіз літературних даних показав, що різні маркерні системи використовують для різних цілей. Так, для характеристики геномів, ідентифікації видів і вивчення генетичного різноманіття придатні маркери RFLP, RAPD, ISSR.

Певні перспективи має метод аналізу поліморфізму ДНК — ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), який нині широко використовують на пшениці [17]. За ідентифікації сортів м'якої пшениці за допомогою ISSR-аналізу рівень виявленого поліморфізму збігався з рівнем RAPD-

поліморфізму. ISSR застосовний для маркування генів пшениці Ppd-D1a, які відповідають за чутливість до фотоперіоду. Такі маркери необхідні для добору форм, пристосованих до певних кліматичних умов, що важливо в разі створення сортів, стійких до стресових чинників. ISSR дав можливість дослідникам виявити маркер до гена Ppd, яким є нульовий алель 350(—), що відповідає відсутності продукту ампліфікації. Встановлено, що гомозиготні за Ppd-D1a генотипи можна ідентифікувати за виявленням нульового ISSR-алеля [16].

Значна частина повторюваних послідовностей ядерної ДНК складається з тандемно розмішених копій. У родинях таких тандемних повторів дослідники особливу увагу приділяли мікросателітам — повторюваним копіям завдовжки 4—6 нуклеотидів, які називають також SSR-маркерами (Simple Sequence Repeat). Висока швидкість мутацій, значна різноманітність алелів і гетерозиготність, що досягає майже 100 %, відкривають значні перспективи SSR-маркерів для індивідуальної ідентифікації.

На сьогодні мікросателітні маркери, для яких характерна локуспецифічність, поліалельність, високий рівень поліморфізму та широкий інформаційний зміст, дорогі й вирізняються складністю аналізу, що обмежує їх застосування в багатьох лабораторіях. Однак як мультиалельні маркери вони здатні виявляти генотипи з унікальними генотипними змінами.

Мікросателітні маркери знайшли застосування у створенні генетичних карт гена Fr-B1, що контролює морозостійкість, та гена яровизації Vrn-B1 пшениці. Ця оригінальна робота проведена на рекомбінантних і рекомбінантно замішених лініях пшениці сорту Chinese Spring. При цьому ген Vrn-B1 картовано на дистальній ділянці довгого плеча хромосоми 5B в районі, що межує із сегментами хромосом 5A і 5D, які несуть локуси Vrn-A1, Vrn-D1. Ген Fr-B1 картовано на довгому плечі хромосоми 5B на відстані 40 сМ від центромери [52]. Мікросателітні маркери у пшениці застосовано для маркування деяких важливих генів або QTL, включно з генами Rht 8 [48], Rht 12, Vrn-1 [51], Fr-B1, Vrn-B1 [23].

STS (Sequence-Tagged Site) — відносно невеликі послідовності ДНК (200—500 пн), які легко виявити за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Вперше вони були ідентифіковані у 1989 р. STS використовують для генетичного і фізичного картування генів. STS-маркери кодомінантні, мають певні переваги порівняно з іншими методами ПЛР.

SNP (Single Nucleotide Polymorphism) — однонуклеотидні позиції в геномній ДНК, для яких у популяції є різні варіанти послідовностей (алелів). У SNP зазвичай включають незначні зміни геномних послідовностей (інсерції, делеції, зміни кількох нуклеотидів). Вони представлені двома алельними варіантами [33], значно поширені в геномі пшениці.

Алелеспецифічна ПЛР ґрунтується на тому, що алельні варіанти розрізняють за гібридизацією 3'-нуклеотиду одного з праймерів безпосередньо з варіабельним нуклеотидом. Це обумовлює наявність або відсутність ПЛР [31]. Алелеспецифічну ПЛР широко використовують для ідентифікації окремих алелів генів або груп алелів [15].

На сьогодні в наукових і прикладних дослідженнях застосовують в основному чотири типи маркерів, отриманих на основі мікросателітного аналізу, AFLP, секвенування та SNP-аналіз. Припускають, що в найближчі роки аналіз мікросателітів як один із найінформативніших маркерів згоратиметься через складність скринінгу їх алельних варіантів, а

SNP-аналіз — поширюватиметься. Конкурувати з SNP може тільки секвенування ДНК як найінформативніший метод аналізу поліморфізму ДНК.

1. *Конарев В.Г.* Морфогенез и молекулярно-биологический анализ растений. — СПб.: ВИР, 1998. — 370 с.
2. *Попереля Ф.А., Бабаянц Л.Т.* Блок компонентов глиадинов Gld1В3 как маркер гена, обуславливающего устойчивость растений к стеблевой ржавчине // Докл. ВАСХНИЛ. — 1978. — № 6. — С. 6—8.
3. *Попереля Ф.О.* Три основні генетичні системи якості зерна озимої м'якої пшениці // 36. наук. праць СГІ — НЦ НС. — 1996. — С. 117—131.
4. *Рибалка О.І., Литвиненко М.А.* Використання пшениці ваксі для селекції сортів пшениці нового покоління // Вісн. аграр. науки. — 2008. — № 7. — С. 34—38.
5. *Рибалка О.І., Литвиненко М.А.* Використання в селекції пшениці транслокації 1RS/1BL // Там само. — 2007. — № 12. — С. 36—40.
6. *Рибалка О.І., Литвиненко М.А.* Новітні генетичні аспекти поліпшення якості пшениці // Там само. — 2009. — № 4. — С. 35—39.
7. *Рибалка О.І., Литвиненко М.А.* Створення сортів пшениці спеціального використання // Там само. — 2009. — № 6. — С. 36—41.
8. *Рибалка О.І., Червоніс М.В., Литвиненко М.А.* Генетична гетерогенність сортів пшениці одеської селекції за алейним складом Gli/Glu-локусів // Там само. — 2008. — № 2. — С. 54—59.
9. *Рибалка О.І., Червоніс М.В., Щербина З.В.* Генетичний поліморфізм клейковинних білків зерна, пов'язаних з якістю борошна пшениці: методи ідентифікації // 36. наук. праць СГІ — НЦ НС. — 2007. — Вип. 10(50). — С. 52—71.
10. *Салина Е.А., Леонова И.Р., Редер М. и др.* Микросателлиты пшеницы: перспективы использования для картирования генов и анализа реконструированных геномов // Физиология растений. — 2001. — 48, № 3. — С. 441—446.
11. *Собко Т.А., Созинов А.А.* Анализ генотипической структуры возделываемых в Украине сортов озимой мягкой пшеницы с использованием генетических маркеров // Цитология и генетика. — 1999. — 33, № 5. — С. 30—41.
12. *Соболев А.М.* Запасание белка в семенах растений. — М.: Наука, 1985. — 112 с.
13. *Созинов А.А.* Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. — М.: Наука, 1985. — 272 с.
14. *Суркова Л.И., Климашевский Э.Л., Чевжик А.Л. и др.* Реакция сортов озимой пшеницы на удобрение и наследование признака отзывчивости в системных скрещиваниях // Агротехника. — 1992. — № 3. — С. 41—52.
15. *Удина И.Г., Карамышева Е.Е., Туркова С.О. и др.* Генетические механизмы устойчивости и чувствительности к лейкозу у айрширской и чистопородной пород крупного рогатого скота, установленные на основе распределения аллелей BoLA DBR3 // Генетика. — 2003. — 39, № 3. — С. 383.
16. *Файт В.И.* Проблемы генетического анализа зимо-морозостойкости // Физиология и биохимия культ. растений. — 2004. — 36, № 5. — С. 371—382.
17. *Хавкин Э.Е.* Молекулярные маркеры в растениеводстве // С.-х. биология. — 1997. — № 5. — С. 3—21.
18. *Bhat S.R., Goud J.V.* Aneuploid analysis for protein content and tyrosinase activity in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) // Euphytica. — 1978. — 27. — P. 805—810.
19. *Borner A.* Intrachromosomal mapping of genes for dwarfing (*Rht12*) and vernalization response (*Vrn 1*) in wheat by using RFLP and microsatellite markers // Plant Breed. — 1997. — 116. — P. 227—232.
20. *Butow B.J., Gale K.R., Iken J. et al.* Dissemination of the highly expressed Bx7 glutenin subunit (*Glu-B1a1* allele) in wheat as revealed by novel PCR markers and RP-HPLC // Theor. Appl. Genet. — 2004. — 109. — P. 1525—1535.
21. *Devos K.M., Bryan G.J., Collins A.J. et al.* Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers // Ibid. — 1995. — 90. — P. 247—252.
22. *Dubcovsky J.B., Lijavetzky D., Appendino L. et al.* RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement // Ibid. — 1998. — 97. — P. 968—975.
23. *Galiba G., Quarrie S.A., Sutka J. et al.* RFLP mapping of the vernalization (*Vrn1*) and frost resistance (*Fr1*) genes on chromosome 5A of wheat // Ibid. — 1995. — 90. — P. 1174—1179.
24. *Gautier M.F., Aleman M.E., Guirao A. et al.* *T. aestivum* puroindolines, two basic cysteine-rich seeds protein: cDNA sequence analysis and developmental gene expression // Plant Mol. Biol. — 1994. — 25. — P. 43—57.
25. *Gazza L., Nocente F., Ng P.K.W., Pogna N.E.* Genetic and biochemical analysis of common wheat cultivars lacking puroindoline a // Theor. Appl. Genet. — 2005. — 110. — P. 470—478.

26. *Giroux M.J., Morris C.F.* 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.
27. *Gupta R.B., Shepherd K.W.* Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutenin. I. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid wheats // *Theor. Appl. Genet.* — 1990. — **80.** — P. 65–74.
28. *Gupta P.K., Varshney R.K., Sharma P.C.* Molecular markers and their applications in wheat breeding // *Plant Breed.* — 1999. — **118.** — P. 369–390.
29. *Juhász A., Larroque O.R., Tamas L. et al.* Bankuti 1201 — an old Hungarian wheat variety with special storage protein composition // *Theor. Appl. Genet.* — 2003. — **107.** — P. 697–704.
30. *Khan K., Tanmingo G., Luka O.* The effect of wheat blair proteins on mixing and baking correlations with protein fraction and high molecular weight subunit composition by gel electrophoresis // *Cereal Chem.* — 1989. — **66.** — P. 391–396.
31. *Kwok S., Kellogg D.E., McKinney N. et al.* Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies // *Nucleic Acids Res.* — 1990. — **18.** — P. 999.
32. *Lafiandra D., Masci S., Blumental C., Wrigley C.W.* The formation of glutenin polymer in practice // *Cereal Foods World.* — 1999. — **44.** — P. 572–578.
33. *Lai E.* Application of SNP technologies in medicine: lessons learned and future challenges // *Genome Res.* — 2001. — **11.** — P. 927–929.
34. *Levy A.A., Feldman M.* Increase in grain protein percentage in high-yielding common wheat breeding lines by genes from wild tetraploid wheat // *Euphytica.* — 1987. — **36,** N 2. — P. 353–359.
35. *Levy A.A., Galili G., Feldman M.* The effect of addition of *Aegilops longissima* chromosomes on grain protein in common wheat // *Theor. Appl. Genet.* — 1985. — **69,** N 4. — P. 429–435.
36. *Lillemo M., Ringlund K.* Impact of puroindoline b alleles on the genetic variation for hardness in soft × hard wheat crosses // *Plant Breed.* — 2002. — **121.** — P. 210–217.
37. *Lukow O.M., Forsyth S.A., Payne P.I.* Over-production of HMW glutenin subunits coded on chromosome 1B in common wheat, *Triticum aestivum* // *J. Genet. Breed.* — 1992. — **46.** — P. 187–192.
38. *Mattern P.J., Morris R., Schmidt J.W., Johnson V.A.* Location of genes for kernel properties in the wheat variety «Cheyenne» using chromosome substitution lines // *Proc. 4th Int. Wheat. Genet. Symp.* — Univ. of Missouri, Columbia. — 1973. — P. 703–707.
39. *Mohan M., Nair S., Bhagwat A. et al.* Genome mapping, molecular marker and marker-assisted selection in crop plants // *Mol. Breed.* — 1997. — **3.** — P. 87–103.
40. *Morris C.F., Lillemo M., Simeon G.M. et al.* Prevalence of puroindoline grain hardness genotypes among historically significant North American spring and winter wheats // *Crop. Sci.* — 2001. — **41.** — P. 218–228.
41. *Morris R., Schmidt J.W., Mattern P.J., Johnson V.A.* Chromosomal locations of genes for high protein in the wheat cultivar Atlas 66 // *Proc. 4th Int. Wheat. Genet. Symp.* — Univ. of Missouri, Columbia. — 1973. — P. 715–718.
42. *Morton R.* Intracellular components associated with protein synthesis in developing wheat endosperm // *Biochem. J.* — 1964. — **91.** — P. 522–528.
43. *Payne P.J., Jackson E.A., Holf C.M.* Genetic linkage between endosperm storage proteins on each of the short arms of chromosomes 1A and 1B in wheat // *Theor. Appl. Genet.* — 1984. — **67.** — P. 235–243.
44. *Payne P.I., Lawrence G.J.* Catalogue of alleles for the complex gene loci Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1 which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat // *Cereal Res. Communic.* — 1983. — **11,** N 1. — P. 29–34.
45. *Plaschke J., Voss H., Hahn M. et al.* Doublex sequencing in molecular diagnosis of hereditary diseases // *Biotechniques.* — 1998. — **24,** N 5. — P. 838.
46. *Prasad M., Kumar N., Kulwal P.L. et al.* QTL analysis for grain protein content using SSR markers and validation studies using NILs in bread wheat // *Theor. Appl. Genet.* — 2003. — **106.** — P. 659–667.
47. *Prasad M., Varshney R.K., Kumar A. et al.* A microsatellite marker associated with a QTL for grain protein content on chromosome arm 2DL of bread wheat // *Ibid.* — 1999. — **99,** N 2. — P. 341–345.
48. *Roder M.S., Korzun V., Wendehake K. et al.* A microsatellite map of wheat // *Genetics.* — 1998. — **149.** — P. 2007–2023.
49. *Rousset M., Brabant P., Kota R.S. et al.* Use of recombinant substitution lines for gene mapping and QTL analysis of bread making quality in wheat // *Materials 6th Int. Wheat Conf.* (5–9 June, 2000, Budapest, Hungary). — Budapest, 2000. — P. 39.
50. *Shewry P.R., Faulks A.J., Jones J.T.* The genetic analysis of barley storage proteins // *Heredity.* — 1980. — **44,** N 3. — P. 383–389.

51. *Stephenson P., Bryan G., Kirby J. et al.* Fifty new microsatellite loci for the wheat genetic map // *Theor. Appl. Genet.* — 1998. — **97**. — P. 946–949.
52. *Toth B., Galiba G., Feher E. et al.* Mapping genes affecting flowering time and frost resistance on chromosome 5B of wheat // *Ibid.* — 2007. — **114**. — P. 430–451.
53. *Zhao X., Zhao X., Xia Z.* Novel DNA variations to characterise low molecular weight glutenin Glu-D3 genes and develop STS markers in common wheat // *Theor. Appl. Genetics.* — 2007. — **114**. — P. 451–460.

Отримано 29.11.2010

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ ПШЕНИЦЫ

В.М. Починок, А.Н. Радченко

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Проанализированы литературные данные относительно селекционного улучшения качества зерна пшеницы. Обсуждаются работы, посвященные исследованию генотипических особенностей признаков «содержание белка в зерне», «сила муки». Предложены пути дальнейшего изучения закономерностей формирования этих признаков и возможностей их улучшения.

CURRENT STATUS OF INVESTIGATIONS OF WHEAT STORAGE PROTEINS

V.M. Pochinok, A.N. Radchenko

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

Literature data regarding breeding to improve wheat grain quality are analyzed. The results of studies of genotypic peculiarities of traits «grain protein content», «flour power» are discussed. The ways of further investigation of these traits formation mechanisms and their possible improvement are proposed.

Key words: winter wheat, grain protein content, high molecular glutenin, markers.