

А.М. ПОЛІЩУК¹, С.В. ЧЕБОТАР¹,
О.М. БЛАГОДАРОВА², Н.О. КОЗУБ^{3,4},
І.О. СОЗІНОВ⁴, Ю.М. СИВОЛАП¹

¹ Південний біотехнологічний центр в рослинництві НААН, Одеса
E-mail: sabina-chebotar@rambler.ru

² Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насінництва
та сортовивчення НААН України, Одеса

³ Інститут захисту рослин НААН України, Київ

⁴ ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ

АНАЛІЗ СОРТІВ ТА МАЙЖЕ-ІЗОГЕННИХ ЛІНІЙ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ДОПОМОГОЮ ПЛР З АЛЕЛЬ-СПЕЦИФІЧНИМИ ПРАЙМЕРАМИ ДО *Gli-1* ТА *Glu-3* ЛОКУСІВ



За допомогою ПЛР-аналізу γ -гліадинових генів встановлено алейний стан в локусах *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* та *Glu-A3* 14 сортів м'якої пшениці та шести майже-ізогенних ліній, отриманих на основі сорту Безоста 1. Виявлено відповідність молекулярно-генетичних даних та даних електрофорезу запасних білків: алейним варіантам блоків гліадинів *Gli-A1 α* та *Gli-A1 τ* відповідає ПЛР-алель *GliA1.2*, варіантам гліадинів *Gli-A1 β* , *Gli-A1 ϵ* відповідає ПЛР-алель *GliA1.1*, алейним варіантам *Gli-B1 β* , *Gli-B1 δ* – ПЛР-алель *GliB1.1*, варіантам *Gli-B1 ϵ* , *Gli-B1 γ* , *Gli-B1 ϵ* – ПЛР-алель *GliB1.2*. Детектовано новий алель за ПЛР з праймерами до маркера *GliB1.1* локусу *Gli-B1* у лінії *GLI-B1-12* (з блоком гліадинів *Gli-B1 α*), отриманої від схрещування Безостої 1 з сортом Левент.

© А.М. ПОЛІЩУК, С.В. ЧЕБОТАР, О.М. БЛАГОДАРОВА,
Н.А. КОЗУБ, І.А. СОЗІНОВ, Ю.М. СИВОЛАП, 2010

Вступ. Створення сортів пшениці з високими хлібопекарськими властивостями є одним з важливих завдань генетико-селекційних досліджень. Було встановлено зв'язки алейних варіантів блоків запасних білків зерна – гліадинів та глютенінів – з показниками якості зерна і борошна [1–4]. Численними дослідженнями доведено, що хлібопекарські властивості сортів пшениці визначаються насамперед фізичними властивостями клейковинного комплексу зерна, який утворюють білки–мономерні гліадини та високополімерні глютеніни. Генетичний контроль білків клейковини пшениці здійснюється кластерами мультиалельних генів, що розташовані в *Gli*- та *Glu*-локусах. Локуси високомолекулярних субодиниць глютенінів *Glu-A1*, *Glu-B1* та *Glu-D1* розміщені на довгих плечах хромосом 1A, 1B, 1D м'якої пшениці; локуси низькомолекулярних субодиниць глютенінів *Glu-A3*, *Glu-B3*, *Glu-D3* – на коротких плечах хромосом 1A, 1B, 1D відповідно; *Glu-B2* і *Glu-B4* – на хромосомі 1B; *Glu-D4* – на 1D; *Glu-D5* на хромосомі 7D [5]. Гліадинові локуси *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1* розташовані на коротких плечах хромосом 1A, 1B, 1D; локуси *Gli-A2*, *Gli-B2* та *Gli-D2* – на коротких плечах хромосом 6A, 6B, 6D; локуси *Gli-1* тісно зчеплені з відповідними локусами *Glu-3* [1]. Алелі генів кожного з перелічених локусів вносять певний позитивний чи негативний вклад в ознаки технологічної та хлібопекарської якості борошна [6].

Огляд світових літературних даних свідчить про можливість ефективного використання молекулярних маркерів для встановлення алейного стану *Gli*- і *Glu*-локусів, які контролюють хлібопекарські якості зерна [7–15]. Так, Zhang et al. [14] на основі аналізу поліморфізму одичних нуклеотидів (SNPs) γ -гліадинових генів локусів *Gli-A1*, *Gli-B1* і *Gli-D1* розробили праймери до алелів (домінантних ДНК-маркерів) *GliA1.1*, *GliA1.2*, *GliB1.1*, *GliB1.2*, *GliD1.1*, *GliD1.2*. Показано, що алельні варіанти за цими ПЛР-маркерами корелюють з певними аелями низькомолекулярних (LMW) субодиниць глютенінів, локуси яких є тісно зчепленими з *Gli-1* локусами, а саме: присутність ПЛР-алея *GliA1.2* визначає наявність алелів *Glu-A3 δ* і *Glu-A3 ϵ* ; *GliA1.1* – *Glu-A3 α* , *Glu-A3 β* , *Glu-A3 γ* ; *GliB1.1* – *Glu-B3 β* , *Glu-B3 γ* , *Glu-B3 δ* , *Glu-B3 ϵ* ; *GliB1.2* – *Glu-B3 α* , *Glu-B3 γ* , *Glu-B3 δ* ; *GliD1.1* – *Glu-D3 α* , *Glu-D3 β* , *Glu-D3 ϵ* ; *GliD1.2* – *Glu-D3 γ* за локусами низькомолекулярних субодиниць глютенінів

нів *Glu-3* [14]; комбінація алелів *Glu-A3d*, *Glu-B3b*, *Glu-D3b* у генотипі м'якої пшениці обумовлює високі технологічні, смакові і хлібопекарські властивості пшеничного борошна. У 2004 р. Zhang et al. [15] розробили праймери до алелів локусу *Glu-A3*: *Glu-A3a*, *Glu-A3abc*, *Glu-A3ac*, *Glu-A3d*, *Glu-A3e*, *Glu-A3f* та *Glu-A3g*. У роботі цих авторів зареєстровано вплив поєднання алелів LMW субодиниць глютенінів на силу, розтяжність і стійкість тіста, а також показано, що властивості тіста значно залежать від поєднання алелів *Glu-3* і *Glu-1* локусів. Алелі *Glu-3* локусів авторами розподілено відповідно до їхнього впливу на якість борошна: алелі $b > d > e$, c для локусу *Glu-A3*; $i > b = a > e = f = g = h > c$ для *Glu-B3*; $e > b > a > c > d$ для *Glu-D3* [14].

Вирішення питання якості пшеничного борошна значною мірою залежить від ефективності оцінок і добору селекційного матеріалу. Незважаючи на те, що запасні білки (гліадини і глютеніни) вивчені досить повно і використовуються для безпосереднього встановлення зв'язку білків ендосперму з якістю борошна, зростаюча вимога до якості зерна нових сортів пшениці викликає необхідність, з одного боку, удосконалення існуючої системи оцінок селекційного матеріалу на рівні генотипів, а з іншого — глибшого вивчення зв'язку показників якості зерна, а саме технологічних, з алелями генів *Glu*- (глютенінів) і *Gli*- (гліадинів) в кластерах. В цьому напрямку заслуговує на увагу добір за даними електрофорезу клейковинних білків, який широко використовується для визначення технологічних властивостей зерна м'якої пшениці на генетичному рівні [2]. Однак білкові спектри гліадинів та низькомолекулярних субодиниць глютенінів є складними: електрофореграми гліадинів містять продукти експресії генів принаймні семи локусів, електрофореграми низькомолекулярних субодиниць глютенінів — трьох, причому зони знаходження компонентів алелів різних локусів перекриваються [1]. Тому ідентифікація алелів гліадинів та низькомолекулярних субодиниць глютенінів на електрофореграмах білків вимагає значного досвіду та кваліфікації. Автоматизувати цей процес навряд чи вдасться. Альтернативою для підвищення точності визначення алелів локусів запасних білків та переводу їх ідентифікації в автоматичний режим є розробка

та використання алель-специфічних праймерів до генів запасних білків.

Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) вже сьогодні дозволяє підійти до аналізу генетичного поліморфізму на рівні нуклеотидних послідовностей генів, що кодують запасні білки, та в найближчому майбутньому розширить можливості щодо прискорення селекції сортів м'якої пшениці з певними технологічними ознаками. Інформація про алельний стан генів, які кодують запасні білки, може бути отримана за допомогою ПЛР на ранніх етапах розвитку до цвітіння рослини, що дозволить відібрати потрібні генотипи, не очікуючи на аналіз зерна. Таким чином, значно прискориться селекційний процес.

Сорти кожної кліматичної зони мають свій склад алелів локусів запасних білків, що обумовлено існуванням певного зв'язку між набором алелів та адаптивністю (тобто врожайністю, стійкістю до хвороб та абіотичних факторів) [4]. Більшість кращих сортів, наприклад Селекційно-генетичного інституту (м. Одеса) (СГІ), мають формулу гліадинів, що близька до формули сорту Альбатрос одеський. Поліморфізм культурних сортів за локусами HMW субодиниць глютенінів, взагалі, низький. Сорти України мають по три алеля локусів *Glu-A1* і *Glu-B1* і, окрім 1–2 %, не відрізняються за локусом *Glu-D1* (мають субодиниці 5+10 (алель d), за класифікацією Payne, Lawrence [16]). Не виключено, що при аналізі генів запасних білків на рівні ДНК буде знайдено відмінності між алелями, які за допомогою електрофорезу білків не відрізняються. Є декілька причин, що дозволяють зробити таке припущення: 1) електрофорез глютенінів у SDS розподіляє білки за масою і не враховує їх заряд; 2) електрофорез гліадинів і глютенінів в кислому середовищі, наприклад, за методикою Поперелі [3], що використовується в СГІ, розподіляє молекули за інтегральним значенням маса + заряд, тобто менші молекули з більшим зарядом можуть мати ту ж саму рухомість, що і більші молекули із меншим зарядом. Інколи їх можливо відрізнити за допомогою двомірного електрофорезу, але ПЛР-аналіз може надати нові можливості і нову інформацію про різні алельні стани таких білків; 3) можливо розрізнити алелі, що відрізняються кількістю копій генів; дове-

дено існування таких алелів [17], більш того, їх може бути більше, ніж алелів, що виникли через заміну або делецію нуклеотиду.

Мета роботи полягає у порівнянні результатів ідентифікації алельних станів генних кластерів *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* та *Glu-A3* у сортів та майже-ізогенних ліній м'якої пшениці із застосуванням електрофорезу у ПААГ продуктів ампліфікації при залученні алель-специфічних праймерів до генів локусів *Gli-1* і *Glu-3* та електрофорезу у ПААГ гліадинів.

Матеріали та методи. У роботі використано сорти м'якої пшениці: Лузанівка одеська, Зустріч одеська, Струмок, Одеська 267, Знахідка одеська, Любава одеська, Фантазія одеська, Прима одеська, Лада одеська, Застава одеська, Вікторія, Альбатрос одеський. Проведено також дослідження шести майже-ізогенних ліній м'якої пшениці (*GLI-D1-5*, *GLI-B1-3*, *GLI-B1-4*, *GLI-A1-1*, *GLI-D1-4*, *GLI-B1-12*), що відрізняються за певними алелями гліадинових локусів. Ці лінії створено Копусем [18] на основі сорту Безоста 1 в результаті шести беккросів та добору за допомогою гліадинових маркерів. Донорами алельних варіантів локусів запасних білків при схрещуванні з сортом Безоста 1 (генетична формула *Gli-A1b Gli-B1b Gli-D1b*) є сорти Кримка місцева (алелі *Gli-D1j*, *Gli-A1m*), Левент (*Gli-B1o*), Zg2689/74 (*Gli-B1g*), Триумф (*Gli-B1g*), Аврора (*Gli-B1l*). В дослідженні використано вихідний сорт Безоста 1, а також сорт Одеська червоноколоса та лінію Б-16, яка несе транслокацію 1RS.1BL.

ДНК виділяли з 3–5-денних етиологованих проростків відповідно з методичними рекомендаціями [19]. Ампліфікацію проводили за допомогою алель-специфічних праймерів до γ -гліадинових генів локусів *Gli-A1*, *Gli-B1* і *Gli-D1* – *GliA1.1*, *GliA1.2*, *GliB1.1*, *GliB1.2*, *GliD1.1*, *GliD1.2* [14] та алель-специфічних праймерів *Glu-A3a*, *Glu-A3e*, *Glu-A3ac*, *Glu-A3d*, *Glu-A3f* і *Glu-A3g* [15]. Реакційна суміш для ПЛР об'ємом 10 мкл містила 0,5 о.д. ThermoStar polymerase, 500 мМ KCl, 100 мМ Tris-HCl рН 8,3, 25 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTP, 20 нг ДНК, 5 пмоль кожного праймера. Умови ПЛР: перша денатурація – 95 °С 3 хв, потім 38 циклів з температурним режимом: 95 °С 30 с, 56 °С 30 с, 72 °С 1 хв. Продукти ампліфікації розділяли у 8 % неденатуруючому ПААГ. Для візуалізації продуктів ампліфікації

використовували забарвлення за допомогою AgNO₃ [20].

Зернівки досліджуваних сортів було поділено на дві частини. Ту, що із зародком, використовували для пророщування і виділення ДНК, а другу – для електрофорезу запасних білків. Електрофорез запасних білків проводили у відділі теоретичних основ селекції СГІ за методикою Поперелі [3]. Для аналізу брали по три зернини кожного сорту. Алелі гліадинів позначено за каталогом Метаковського [21].

Результати досліджень та їх обговорення. ПЛР-аналіз з алель-специфічними праймерами, запропонованими Zhang et al. [14], дозволив розподілити проаналізовані сорти м'якої пшениці на чотири групи. До першої групи увійшли сорти з алелями *GliA1.1*, *GliB1.1*, *GliD1.2* – Лузанівка одеська, Зустріч одеська, Знахідка одеська, Любава одеська, Фантазія одеська, Альбатрос одеський, до другої групи – сорти з алелями *GliA1.1*, *GliB1.1*, *GliD1.1* – Одеська 267, Вікторія. До третьої групи увійшли сорти з алелями *GliA1.1*, *GliB1.2*, *GliD1.1* – Прима одеська і Застава одеська, до четвертої – Струмок і Лада одеська з алелями *GliA1.2*, *GliB1.1*, *GliD1.2* (табл. 1). При дослідженні локусу *Glu-A3* за допомогою ПЛР в генотипах м'якої пшениці встановлено такий алельний склад: Зустріч одеська – *Glu-A3f*, Застава одеська – *Glu-A3a*, Струмок, Лада одеська – *Glu-A3d*, решта сортів мали алель *Glu-A3c* (табл. 2). Порівняльний аналіз молекулярно-генетичних даних за праймерами до γ -гліадинових генів з даними електрофорезу запасних білків показав, що за допомогою електрофорезу гліадинів виявлено більшу різноманітність в досліджуваній групі сортів. Але якщо проаналізувати наведений в [1, 21] каталог алелів за даними блоків компонентів гліадинів, що виявляються при електрофорезі в ПААГ, то можливо з'ясувати, що по кожному локусу відокремлюються декілька груп алельних варіантів блоків компонентів, які відрізняються між собою лише одним-двома компонентами. Наприклад, такими групами за локусом *Gli-A1* (*GliA1* за номенклатурою, запропонованою [1]) є подібні алельні варіанти блоків компонентів гліадинів *Gli-A1b* та *Gli-A1c*, окрема група – *Gli-A1f* та *Gli-A1g*, за локусом *Gli-B1* – *Gli-B1e* та *Gli-B1c*, за локусом *Gli-D1* – група подібних алельних варіан-

Таблиця 1

Алельний стан локусів *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* в генотипах сортів пшениці за даними алель-специфічної ПЛР та електрофорезу запасних білків

№ групи	Сорт	Алелі					
		ПЛР-аналіз			Електрофорез запасних білків		
		<i>Gli-A1</i>	<i>Gli-B1</i>	<i>Gli-D1</i>	<i>Gli-A1</i>	<i>Gli-B1</i>	<i>Gli-D1</i>
1	Лузанівка одеська	1	1	2	<i>b</i>	<i>d</i>	<i>g</i>
	Зустріч одеська	1	1	2	<i>f</i>	<i>b</i>	<i>x</i> (10)
	Знахідка одеська	1	1	2	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>j</i>
	Любава одеська	1	1	2	<i>b</i>	<i>b, d</i>	<i>b, j</i>
	Фантазія одеська	1	1	2	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>j</i>
	Альбатрос одеський	1	1	2	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>j</i>
2	Одеська 267	1	1	1	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>g</i>
	Вікторія	1	1	1	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>j</i>
3	Прима одеська	1	2	1	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>f</i>
	Застава одеська	1	2	1	<i>b</i>	<i>e</i>	<i>j</i>
4	Струмок	2	1	2	<i>o</i>	<i>d</i>	<i>b</i>
	Лада одеська	2	1	2	<i>o</i>	<i>b</i>	<i>j</i>

Таблиця 2

Алелі локусу *Glu-A3* в генотипах м'якої пшениці за даними ПЛР

Сорт	Алелі локусу <i>Glu-A3</i>	Наявність продуктів ампліфікації з алель-специфічними праймерами до локусу <i>Glu-A3</i>						
		<i>a</i>	<i>abc</i>	<i>ac</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>
Лузанівка одеська	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
Зустріч одеська	<i>f</i>	–	–	–	–	–	+	–
Струмок	<i>d</i>	–	–	–	+	–	–	–
Одеська 267	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
Знахідка одеська	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
Любава одеська	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
Фантазія одеська	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
Прима одеська	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
Лада одеська	<i>d</i>	–	–	–	+	–	–	–
Застава одеська	<i>a</i>	+	+	+	–	–	–	–
Вікторія	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
Альбатрос одеський	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–

тів *Gli-D1b*, *Gli-D1f*, *Gli-D1a*, та інша група – *Gli-D1j*, *Gli-D1g*, *Gli-D1x* (*Gld1D10* за [1]). На нашу думку, чим менше відрізняються алельні варіанти блоків компонентів за кількістю та рухомістю смуг білків на електрофорезі, тим ближче вони один до одного генетично – за нуклеотидною послідовністю та походженням.

Для досліджених сортів, наведених у табл. 1, за локусом *Gli-A1* визначено чотири алеля гліа-

дину, їм відповідали два варіанти за ПЛР-аналізом. Так, алельним варіантам блоків гліадинів *Gli-A1f*, *b*, *c* відповідав алель *GliA1.1* за ПЛР, а *Gli-A1o* – ПЛР-алель *GliA1.2*.

Алельні варіанти *Gli-A1b* та *Gli-A1c* представлені блоками білкових компонентів, що близькі за рухливістю при електрофорезі в ПААГ. Алельні варіанти блоків гліадинів *Gli-A1f* та *Gli-A1o* дуже відрізняються один від одного та від *Gli-A1b* та *Gli-A1c*. Тобто, у цієї групи сортів



Рис. 1. Розподіл продуктів ампліфікації генотипів ліній м'якої пшениці у 8 % неденатуруючому ПААГ, отриманих з використанням алель-специфічних праймерів *GliA1.1* (A1) та *GliA1.2* (A2): 1/1, 1/2 – Б-16; 2/1, 2/2 – Одеська червоноколоса; 3/1, 3/2 – Безоста 1; 4/1, 4/2 – GLI-D1-5; 5/1, 5/2 – GLI-B1-3

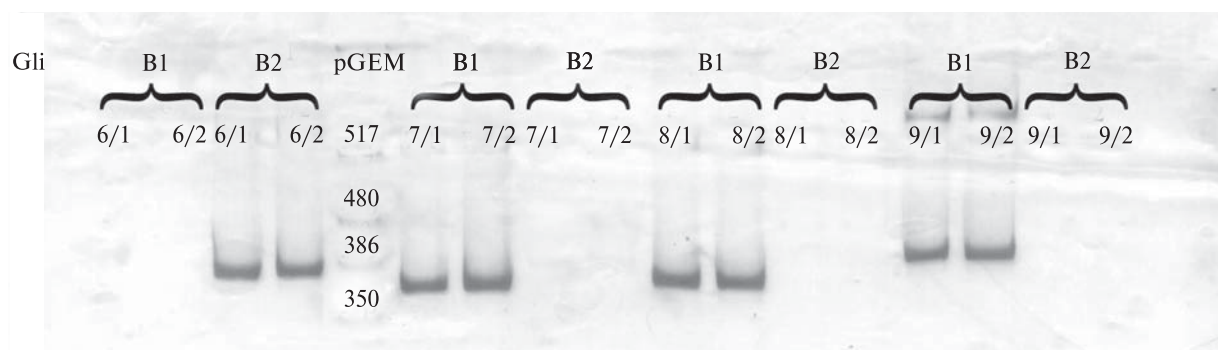


Рис. 2. Розподіл продуктів ампліфікації генотипів ліній м'якої пшениці у 8 % неденатуруючому ПААГ, отриманих з використанням алель-специфічних праймерів *GliB1.1* (B1) та *GliB1.2* (B2): 6/1, 6/2 – GLI-B1-4; 7/1, 7/2 – GLI-A1-1; 8/1, 8/2 – GLI-D1-4; 9/1, 9/2 – GLI-B1-12

можливо диференціювати за допомогою ПЛР генотипи з варіантом блоку гліадинів *Gli-A1o*. Вони мали ПЛР-алель *GliA1.2*, а генотипи, що мали алельні варіанти блоків гліадинів *Gli-A1f*, *Gli-A1b*, *Gli-A1c*, відповідали єдиному алелю *GliA1.1* за ПЛР.

Результати ПЛР-аналізу з праймерами до локусу *Glu-A3* для генотипів сортів, що аналізувались вище, наведено в табл. 2. За локусом *Glu-A3* варіанти *a*, *c* відповідають ПЛР-алелю *GliA1.1*. Вони знаходяться у сортів, що мають алельні варіанти блоків гліадинів *Gli-A1b* та *Gli-A1c*. Алель *Glu-A3d* чітко збігається з присутністю варіанта блоку компонентів гліадину *Gli-A1o* і ПЛР-алеля *GliA1.2*, що дає можливість ідентифікувати алель *Gli-A1o*. Алель *Glu-A3f* представлений тільки у сорту Зустріч одеська, що має алельний варіант блоку гліадинів *Gli-A1f*, але не відрізняється від усіх інших сортів, крім Струмка і Лади одеської, за ПЛР-аналізом γ -гліадинового гена локусу *Gli-A1*. Мож-

ливо, цей алельний варіант можна ідентифікувати ПЛР-аналізом за допомогою алель-специфічних праймерів *Glu-A3f*. При аналізі електрофореграм з блоками компонентів гліадинів, що кодуються локусом *Gli-B1*, у досліджених сортів визначено три алельних варіанти – *Gli-B1b*, *Gli-B1d*, *Gli-B1e*. Всі вони відрізняються за рухливістю при електрофорезі в ПААГ. Але за даними ПЛР-аналізу першим двом відповідає алель *GliB1.1*, а варіанту гліадину *Gli-B1e* – *GliB1.2*. Алельний варіант гліадину *Gli-B1e* значно впливає на якість борошна, тому можливість його ідентифікації ПЛР-аналізом треба підтвердити на більш широкому наборі сортів.

Локус *Gli-D1* є складним і представлений двома тісно зчепленими кластерами генів, один з яких кодує групу білків, а другий кодує один поліпептид або його відсутність (нуль-алель) [22, 23]. Алельні варіанти блоків компонентів гліадинових білків *Gli-D1b* та *Gli-D1f* належать до групи схожих за білковими компо-

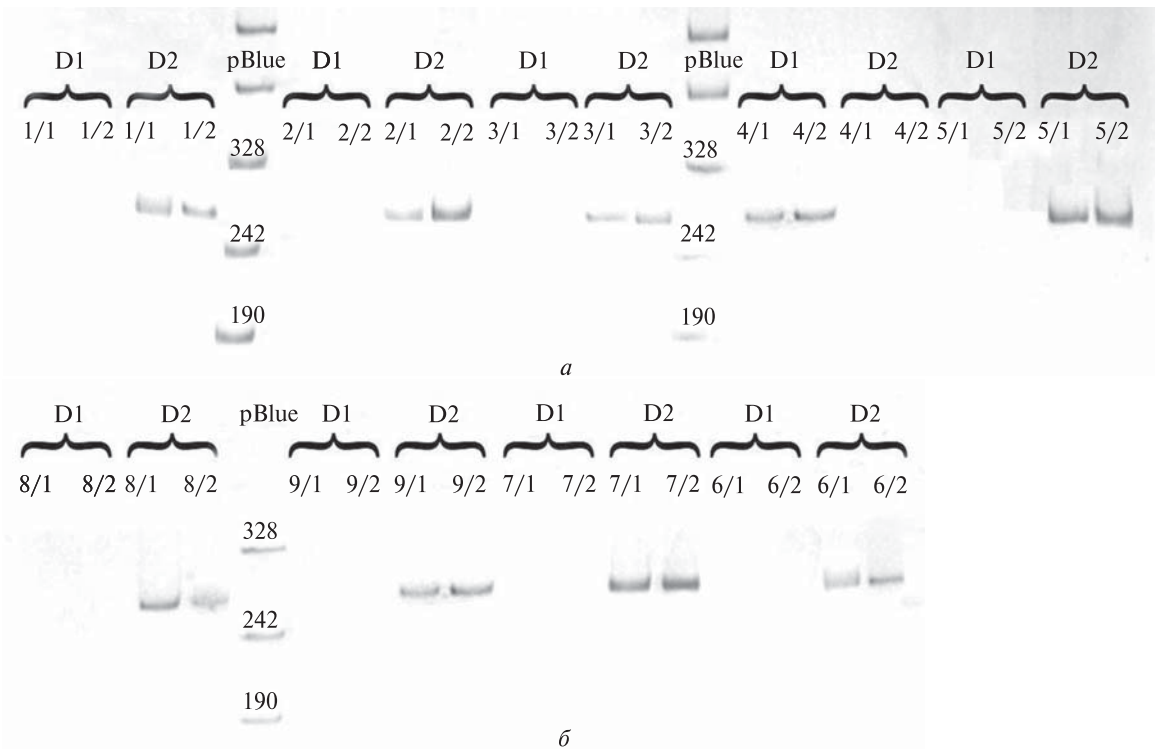


Рис. 3. Розподіл продуктів ампліфікації генотипів ліній м'якої пшениці у 8 % неденатуруючому ПААГ, отриманих з використанням алель-специфічних праймерів *GliD1.1* (D1) та *GliD1.2* (D2): а – 1/1, 1/2 – Б-16; 2/1, 2/2 – Одеська червоноколоса; 3/1, 3/2 – Безоста; 4/1, 4/2 – GLI-D1-5; 5/1, 5/2 – GLI-B1-3; б – 6/1, 6/2 – лінія GLI-B1-4; 7/1, 7/2 – GLI-A1-1; 8/1, 8/2 – GLI-D1-4; 9/1, 9/2 – GLI-B1-12

Таблиця 3
Алельний стан *Gli*-локусів за даними алель-специфічної ПЛР та алельних варіантів блоків гліадинів в генотипах майже-ізогенних ліній м'якої пшениці

Сорт, лінія	<i>Gli-A1</i>		<i>Gli-B1</i>		<i>Gli-D1</i>	
	ПЛР-аналіз	Електрофорез білків	ПЛР-аналіз	Електрофорез білків	ПЛР-аналіз	Електрофорез білків
Б-16	<i>GliA1.1</i>	<i>x</i>	–	<i>l</i>	<i>GliD1.2</i>	<i>j</i>
Одеська червоноколоса	<i>GliA1.1</i>	<i>g</i>	<i>GliB1.2</i>	<i>c</i>	<i>GliD1.2</i>	<i>f</i>
Безоста 1	<i>GliA1.1</i>	<i>b</i>	<i>GliB1.1</i>	<i>b</i>	<i>GliD1.2</i>	<i>b</i>
GLI-D1-5	<i>GliA1.1</i>	<i>b</i>	<i>GliB1.1</i>	<i>b</i>	<i>GliD1.1</i>	<i>g</i>
GLI-B1-3	<i>GliA1.1</i>	<i>b</i>	–	<i>l</i>	<i>GliD1.2</i>	<i>b</i>
GLI-B1-4	<i>GliA1.1</i>	<i>b</i>	<i>GliB1.2</i>	<i>g</i>	<i>GliD1.2</i>	<i>b</i>
GLI-A1-1	<i>GliA1.2</i>	<i>m</i>	<i>GliB1.1</i>	<i>b</i>	<i>GliD1.2</i>	<i>b</i>
GLI-D1-4	<i>GliA1.1</i>	<i>b</i>	<i>GliB1.1</i>	<i>b</i>	<i>GliD1.2</i>	<i>j</i>
GLI-B1-12	<i>GliA1.1</i>	<i>b</i>	Новий алель	<i>o</i>	<i>GliD1.2</i>	<i>b</i>

нентами алельних варіантів, що відрізняються одним мінорним білковим компонентом, а алельні варіанти *Gli-D1j*, *Gli-D1g* та *Gli-D1x* (10) – до другої групи також схожих між собою алелів.

За даними ПЛР-аналізу виявлено алель *GliD1.1* у сортів Одеська 267, Вікторія, Прима одеська, Застава одеська. У решти сортів з наведених у табл. 1 детектовано ПЛР-алель *GliD1.2*. Нам не

Таблиця 4

Алельний стан локусу *Glu-A3* в генотипах майже-ізогенних ліній м'якої пшениці за ПЛР-аналізом

Сорт/лінія	Алелі локусу <i>Glu-A3</i>	Наявність продуктів ампліфікації з алель-специфічними праймерами до локусу <i>Glu-A3</i>						
		<i>a</i>	<i>abc</i>	<i>ac</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>
Б-16	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
Одеська червоноко- лоса	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
Безоста 1	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
GLI-D1-5	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
GLI-B1-3	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
GLI-B1-4	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
GLI-A1-1	<i>e</i>	–	–	–	–	+	–	–
GLI-D1-4	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
GLI-B1-12	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–

вдалося встановити зв'язок між алелями, що виявлені за ПЛР та електрофорезом гліадинів у ПААГ. Слід зазначити, що всі вказані гліадинові алелі локусу *Gli-D1* не відрізняються за рухомістю γ -гліадинового компонента на електрофореграмах гліадинів. Можливо, використання ПЛР-аналізу γ -гліадинового гена дозволить виявити додаткову різноманітність алелів у сортів з однаковими блоками гліадинів за локусом *Gli-D1* за даними електрофорезу білків.

В результаті молекулярно-генетичного аналізу встановлено алельний стан в локусах *Gli-A1*, *Gli-B1* і *Gli-D1* у майже-ізогенних ліній, створених на основі сорту Безоста 1, а також у лінії Б-16 та сорту Одеська червоноколоса (рис. 1–3). Майже-ізогенні лінії розрізнялись за поєднаннями алелів гліадинових локусів (табл. 3). За допомогою ПЛР нами виявлено новий алель, до цього часу не описаний в літературі, з праймерами до маркера *GliB1.1* локусу *Gli-B1* у лінії GLI-B1-12 (з гліадиновим алелем *Gli-B1o*). Він відповідав продукту ампліфікації, який отриманий з парою праймерів *Gli-gAF1/Gli-gAR1*, розміром 399 п.н., тоді як дані праймери здатні виявляти продукти ампліфікації розміром 369 п.н. у генотипах з ПЛР-алелем *GliB1.1* і не давати продукти ампліфікації з ДНК із генотипів з ПЛР-алелем *GliB1.2*. При аналізі локусу *Gli-B1* за допомогою алель-специфічної ПЛР у ліній Б-16 і GLI-B1-3 продуктів ампліфікації не виявлено, що узгоджується з раніше встановленими даними за електрофо-

резом запасних білків [24] про присутність транслокації короткого плеча 1R хромосоми жита у цьому сорті і даними про наявність 1RS.1BL транслокації у лінії GLI-B1-3.

В результаті молекулярно-генетичного аналізу за допомогою спрямованих праймерів до алелів локусу *Glu-A3* майже у всіх ліній визначено наявність алеля *Glu-A3c*, окрім лінії GLI-A1-1, у якої детектовано алель *Glu-A3e* (табл. 4). Отримані результати збігаються з даними про наявність ПЛР-алеля *GliA1.2* у цій лінії. Згідно з дослідженнями, проведеними Zhang et al. [14, 15], присутність ПЛР-алеля *GliA1.2* збігається з наявністю алелів *Glu-A3d* і *Glu-A3e* в локусі *Glu-A3*. Але також слід звернути увагу, що у лінії GLI-A1-1 поряд з ПЛР-алелем *GliA1.2* встановлено присутність алельного варіанту блоку гліадинів *Gli-A1m* за електрофорезом в ПААГ.

Отже, за допомогою ПЛР-маркерів встановлено алельний стан в локусах *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* та *Glu-A3* 14 сортів м'якої пшениці та шести майже-ізогенних ліній. Виявлено новий ПЛР-алель з праймерами до маркера *GliB1.1* локусу *Gli-B1* у лінії GLI-B1-12, отриманої від схрещування Безостої 1 з сортом Левент. У лінії GLI-A1-1 (з алелем *Gli-A1m*) за локусом *Glu-A3* детектовано алель *Glu-A3e*, що збігається з наявністю ПЛР-алеля *GliA1.2* в цій лінії. При дослідженні сортів м'якої пшениці встановлено пов'язаність присутності алельного варіанту блоку гліадинів *Gli-A1o* у сортів Струмок та Лада одеська з ПЛР-алелем *GliA1.2*.

Присутність алеля *Glu-A3f* пов'язана з наявністю алельного варіанта блоку гліадинів *Gli-A1f* у сорту Зустріч одеська. Присутність алеля *Glu-A3d* у сортах Струмок і Лада одеська чітко збігається з ідентифікацією алельного варіанту блоку гліадинів *Gli-A1o* і ПЛР-алелем *GliA1.2*. При аналізі з даною групою сортів це дає змогу висунути тезу про можливість диференціювати алельний варіант блоку гліадинів *Gli-A1o*, що пов'язаний з погіршенням якості і з підвищенням врожайності [3, 4], порівняно з найпоширенішим алельним варіантом *Gli-A1b*, за допомогою ПЛР-методу. Але слід звернути увагу, що ПЛР-алель *GliA1.2* також збігається з присутністю варіанту блоку гліадинів *Gli-A1m* та з алелем *Glu-A3e*, що показано на майже-ізогенній лінії GLI-A1-1.

Наявність у сортів пшениці алельних варіантів блоків гліадинів *Gli-B1e* (Прима, Застава) і *Gli-B1c* (Одеська червоноколоса) збігається з детекцією ПЛР-алеля *GliB1.2*. Це свідчить про можливість диференціації цих алелів ПЛР-методом від поширеного алеля *Gli-B1b*.

В цілому у даній роботі визначено нижчий рівень генетичного поліморфізму за допомогою алель-специфічної ПЛР з праймерами, розробленими Zhang et al. [14, 15], у порівнянні з усім комплексом генетичного поліморфізму, що визначається при електрофорезі запасних білків. Це закономірно, оскільки дані праймери детектують ділянки лише одного γ -гліадинового гена локусів *Gli-1*, тоді як алелі, ідентифіковані за допомогою електрофорезу гліадинів, мають до восьми компонентів і відображають експресію до восьми генів. Однак слід звернути увагу та глибше вивчити можливості праймерів до γ -гліадинового гена локусу *Gli-D1* відрізнити більшу різноманітність алелів за цим локусом. Дослідження локусів запасних білків за допомогою ДНК маркерів є перспективним. По-перше, можливість використання маркерів до інших ділянок нуклеотидних послідовностей генів запасних білків може розширити спектр ПЛР-поліморфізму. По-друге, в світі з'явилися і інтенсивно поширюються трансгенні форми м'якої пшениці, геном яких додатково несе до десятка копій генів запасних білків. Зокрема лінії, що мають мультипліковані субодиниці HMW-глютенінів локусу *Glu-D1*, Vutow et al. [24] ідентифікують за допомогою ПЛР.

Розвиток молекулярно-генетичних технологій уже сьогодні дозволяє використовувати мультиплексні ПЛР, що об'єднують аналіз одразу декількох локусів. Крім цього використання різних за кольором флуоресцентних міток, що додаються до продуктів ПЛР, дозволяє проводити одночасно, в одному електрофорезі, аналіз понад шести локусів на ДНК-аналізаторах. Виконані дослідження є першим кроком у напрямку залучення сучасних ДНК-технологій до вивчення у вітчизняних сортів генетичного поліморфізму генів, що кодують запасні білки пшениці.

Висновки. За допомогою алель-специфічних праймерів ПЛР-аналізом встановлено алельний стан локусів *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* та *Glu-A3* 14 сортів та шести майже-ізогенних за гліадиновими локусами ліній м'якої пшениці, отриманих на основі сорту Безоста 1. Визначено новий алель розміром 399 п.н. за локусом *Gli-B1* у лінії GLI-B1-12, який відповідає продукту ампліфікації, отриманому з парою праймерів Gli-gAF1/Gli-gAR1.

Показано можливість диференціювати ПЛР-методом генотипи м'якої пшениці, які належать до різних груп за алельними варіантами блоків компонентів гліадинів, а саме: *Gli-A1m* та *Gli-A1o*, що мають ПЛР-алель *GliA1.2*, від генотипів, для яких є характерними алельні варіанти блоків компонентів гліадинів *Gli-A1f*, *Gli-A1b*, *Gli-A1c*, *Gli-A1x*, *Gli-A1g*; генотипи з варіантами гліадинів *Gli-B1e*, *Gli-B1g* та *Gli-B1c*, що характеризуються ПЛР-алелем *GliB1.2*, від генотипів з алельними варіантами блоків гліадинів *Gli-B1b* та *Gli-B1d*, які мають ПЛР-алель *GliB1.1*; генотипи з алельним варіантом *Gli-B1l* не дають продуктів ампліфікації з праймерами, які розроблені [14] до *Gli-B1*, генотипи з варіантом блоку гліадинів *Gli-B1o* визначаються продуктом ампліфікації 399 п.н. з праймерами Gli-gAF1/Gli-gAR1.

A.M. Polishchuk, S.V. Chebotar, E.M. Blagodarova,
N.A. Kozub, I.A. Sozinov, Yu.M. Sivolap

ANALYSIS OF COMMON WHEAT VARIETIES
AND NEAR-ISOGENIC LINES BY PCR
WITH ALLELE-SPECIFIC PRIMERS
FOR *Gli-1* AND *Glu-3* LOCI

The allelic characteristics of the *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* and *Glu-A3* loci of 14 bread wheat varieties and 6 near-isogenic lines derived from Bezostaya 1 have been detected by PCR analysis. The conformity of molecular-genetic

data and electrophoresis of storage proteins has been determined: the allelic variants of gliadins *Gli-A1o* and *Gli-A1m* correspond to the PCR-allele *GliA1.2*, the gliadin variants *Gli-A1f*, *Gli-A1b*, *Gli-A1c* correspond to the PCR-allele *GliA1.1*, the allelic variants *Gli-B1b*, *Gli-B1d* – to the PCR-allele *GliB1.1* and the variants *Gli-B1e*, *Gli-B1g*, *Gli-B1c* – to the PCR-allele *GliB1.2*. A new PCR-allele at the *Gli-B1* locus in the line Gli-B1-12 (with the gliadin block *Gli-B1o* from Levent) was identified.

А.М. Полищук, С.В. Чеботарь,
Е.М. Благодарова, Н.А. Козуб,
И.А. Созинов, Ю.М. Сиволап

АНАЛИЗ СОРТОВ И ПОЧТИ-ИЗОГЕННЫХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ПОМОЩЬЮ ПЦР С АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКИМИ ПРАЙМЕРАМИ К *Gli-1* И *Glu-3* ЛОКУСАМ

С помощью ПЦР-анализа γ -глиадиновых генов установлено аллельное состояние локусов *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* и *Glu-A3* 14 сортов мягкой пшеницы и шести почти-изогенных линий, полученных на основе сорта Безостая 1. Установлено соответствие молекулярно-генетических данных и данных электрофореза запасных белков: аллельным вариантам блоков глиадинов *Gli-A1o* и *Gli-A1m* соответствует ПЦР-аллель *GliA1.2*, вариантам глиадинов *Gli-A1f*, *Gli-A1b*, *Gli-A1c* соответствует ПЦР-аллель *GliA1.1*, аллельным вариантам *Gli-B1b*, *Gli-B1d* – ПЦР-аллель *GliB1.1*, а вариантам *Gli-B1e*, *Gli-B1g*, *Gli-B1c* – ПЦР-аллель *GliB1.2*. Детектирован новый аллель локуса *Gli-B1* у линии Gli-B1-12 (с блоком глиадинов *Gli-B1o*), полученной от скрещивания Безостой 1 с сортом Левент.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его использование в генетике и селекции. – М.: Наука, 1985. – 272 с.
2. Попереля Ф.О. Наукові дослідження і розробки відділу генетичних основ селекції // Зб. наук. пр. Селекц.-генет. ін.-ту – Національного центру насінництва та сортівивчення. Ювілейний випуск. – Одеса, 2002. – С. 130–147.
3. Попереля Ф.А. Полиморфизм глиадинов и его связь с качеством зерна, продуктивностью и адаптивными свойствами сортов мягкой озимой пшеницы // Селекция, семеноводство и интенсивная технология возделывания озимой пшеницы. – М.: Агропромиздат, 1989. – С. 138–150.
4. Благодарова О.М., Литвиненко М.А., Голуб Є.А. Генногеографія алелів гліадин- і глютенінкодуєчих локусів українських сортів озимої м'якої пшениці і їх зв'язок з агрономічними ознаками // Зб. наук. пр. Селекц.-генет. ін.-ту. – 2004. – 6. – С. 124–137.
5. Ma W., Anderson O., Kuchel H. et al. Genomics of quality traits // Plant genetics and genomics: crops and models. Genetics and genomics of the *Triticeae* / Eds C. Feuillet, G.J. Muehlbauer. – Springer Science + Business Media, LLC, 2009. – P. 611–652.
6. Рибалка О.І., Червоніс М.В., Литвиненко М.А. Генетична гетерогенність сортів пшениці одеської селекції за алельним складом *Gli-/Glu*-локусів // Вісн. аграр. науки. – 2008. – 2. – С. 54–59.
7. De Bustos A., Rubio P., Jouve N. Molecular characterization of the inactive allele of the gene *Glu-A1* and the development of a set of AS-PSR markers for HMW glutenins of wheat // Theor. Appl. Genet. – 2000. – 100. – P. 1085–1094.
8. Ahmad M. Molecular marker-assisted selection of HMW glutenin alleles related to wheat bread quality by PCR-generated DNA markers // Theor. Appl. Genet. – 2000. – 101. – P. 892–896.
9. Ma W., Zhang W., Gale K.R. Multiplex-PCR typing of the high molecular weight glutenin alleles in wheat // Euphytica. – 2003. – 134. – P. 51–60.
10. Lei Z.S., Gale K.R., He Z.H. et al. Y-type gene specific markers for enhanced discrimination of high-molecular weight glutenin alleles at the *Glu-B1* locus in hexaploid wheat // J. Cereal. Sci. – 2006. – 43. – P. 94–101.
11. Butow B.J., Ma W., Gale K.R. et al. Molecular discrimination of Bx7 alleles demonstrates that a highly expressed high-molecular weight glutenin allele has a major impact on wheat flour strength // Theor. Appl. Genet. – 2003. – 107. – P. 1524–1532.
12. Zhao X.L., Xia X.C., He Z.H. et al. Characterization of three low-molecular weight *Glu-D3* subunit genes in common wheat // Theor. Appl. Genet. – 2006. – 113. – P. 1247–1259.
13. Zhao X.L., Xia X.C., He Z.H. et al. Novel DNA variations to characterize low molecular weight glutenin *Glu-D3* genes and develop STS markers in common wheat // Theor. Appl. Genet. – 2007. – 114. – P. 451–460.
14. Zhang W., Gianibelli M.C., Ma W., Rampling L., Gale K.R. Identification of SNPs and development of allele-specific PCR markers for γ -gliadin alleles in *Triticum aestivum* // Theor. Appl. Genet. – 2003. – 107. – P. 130–138.
15. Zhang W., Gianibelli M.C., Rampling L.R. Characterization and marker development for low molecular weight glutenin genes from *Glu-A3* alleles of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. – 2004. – 108. – P. 1409–1419.
16. Payne P.I., Lawrence G.J. Catalogue of alleles for the complex gene loci *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* which code for high-molecular weight subunits of glutenin in hexaploid wheat // Cereal Res. Commun. – 1983. – 11. – P. 29–35.
17. D'Ovido R., Masci S., Porceddu E., Kazarda P. Duplication

- tion of the Bx7 high-molecular weight glutenin subunit gene in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar Red River 68 // *Plant Breed.* – 1997. – **116**. – P. 525–531.
18. *Копусь М.М.* О естественной геногеографии глиадиновых аллелей у озимой мягкой пшеницы // *Селекция и семеноводство.* – 1994. – **5**. – С. 9–14.
19. *Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях* / Под ред. Ю.М. Сиволапа. – К.: Аграр. наука, 1998. – С. 34–40.
20. *GenePrint STR Systems (Silver Stain Detection). Technical Manual.* Promega, 2001. – D004 – P. 1–47.
21. *Metakovsky E.V.* Gliadin allele identification in common wheat. 2. Catalogue of gliadin alleles in common wheat // *J. Genet. Breed.* – 1991. – **45**. – P. 325–344.
22. *Попереля Ф.О.* Три основні генетичні системи якості зерна озимої м'якої пшениці // Реалізація потенційних можливостей сортів та гібридів Селекційно-генетичного інституту в умовах України // *Зб. наук. пр. СГІ.* – Одеса, 1996. – С. 117–132.
23. *Попереля Ф.А., Собко Т.А.* Генетика гліади́на озимої м'якої пшениці // *Вопросы генетики и селекции зерновых культур.* – Одесса, 1987. – С. 231–242.
24. *Козуб Н.А., Созинов И.А.* Особенность расщепления по аллелям гліадинкодирующего локуса *Gli-B1* у гибридов озимой мягкой пшеницы // *Цитология и генетика.* – 2000. – **34**. – С. 69–76.
25. *Butow B., Gale K., Ikey J. et al.* Dissemination of highly expressed 13x7 glutenin subunit (*Glu-B1a1* allele) in wheat as revealed by novel PCR markers and RP-NPLC // *Theor. Appl. Genet.* – 2004. – **109**. – P. 1525–1535.

Надійшла 10.08.09