

УДК 633.111.1:575.113.2:577.217.5

GPC-B1 (NAM-B1) ГЕН ЯК НОВИЙ ГЕНЕТИЧНИЙ РЕСУРС У СЕЛЕКЦІЇ ПШЕНИЦІ НА ПІДВИЩЕННЯ ВМІСТУ БІЛКА В ЗЕРНІ ТА МІКРОЕЛЕМЕНТІВ

О.І. РИБАЛКА^{1,2}, Б.В. МОРГУН^{2,3}, С.С. ПОЛІЩУК¹

¹Селекційно-генетичний інститут—Національний центр насіннезнавства та сортовивчення Національної академії аграрних наук України
65036 Одеса, Овідіопольська дорога, 3

²Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

³Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України
03680 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148
e-mail: molgen@icbge.org.ua

Підвищення вмісту білка в зерні пшениці залишається одним із стратегічних завдань сучасної селекції. Однак вміст білка в зерні є складною полігенно детермінованою ознакою, значною мірою залежною від агрокліматичних умов вирощування і, як наслідок, складно контролюваною і керованою в процесі селекції. У дикорослої пшениці двозернянки *T. turgidum* ssp. *dicocoides* із національних фондів зародкової плазми Ізраїлю у хромосомі 6В ідентифіковано ген дикого типу *Gpc-B1* (grain protein concentration), який значно підвищує вміст протеїну в зерні і водночас кількох ключових мікроелементів унаслідок пришвидшення фізіологічного старіння рослин та ефективнішої ремобілізації азоту з вегетативних органів у зерно. Ген *Gpc-B1* чинить мінорні негативні ефекти на деякі структурні елементи врожаю (маса зернівки і натура), не знижуючи при цьому врожаю зерна *per se*. Ген *Gpc-B1* клонований і детально досліджений як за молекулярною структурою, так і за функціональністю. У процесі серії експериментів, виконаних у різних країнах світу на різному генетичному фоні та за контрастних умов вирощування, доведено високу ефективність використання гена *Gpc-B1* у селекційних програмах з метою підвищення вмісту білка і ключових мікроелементів у зерні, поліпшення його технологічної і споживчої цінності.

Ключові слова: пшениця, вміст білка, мінералів, хромосома 6В, ген *Gpc-B1* (*NAM-B1*), фізіологічне старіння, ремобілізація азоту, *T. turgidum* ssp. *dicocoides*.

Згідно з прогнозом ООН, населення Землі від 2000 р. протягом наступного півстоліття зросте на 50 % і до 2050 р. становитиме близько 9,5 млрд осіб. Щоб прогодувати таку масу населення, виробництво сільгосппродукції має зрости на 60 % [1]. Серед харчових факторів рослинний протеїн є нині і матиме в майбутньому стратегічне біологічне значення. На сьогодні частка загального споживаного населенням Землі рослинного протеїну становить 57 %. М'ясо

постачає 18 %, молоко — 10, риба і морепродукти — 6, решта тваринного протеїну 9 %. Щонайменше половину від усієї кількості рослинного протеїну протягом останніх десятиліть населенню Землі стабільно постачає пшениця [2]. Тому питання підвищення як кількості пшеничного білка (вмісту в зерні), так і його якості (технологічної і біологічної цінності) будуть пріоритетними в генетичних наукових дослідженнях культури пшениці на найближчу перспективу.

Вміст протеїну в товарному зерні пшениці варіює в межах 8—15 %. Серед комерційних класів пшениці найвищий вміст протеїну в зерні твердих і твердозерних (*hard*) ярих сортів пшениці, тоді як в м'якозерних червоно- і білозерних (*soft*) озимих сортів пшениці він нижчий.

Найвідоміші фундаментальні дослідження, спрямовані на підвищення вмісту в зерні пшениці протеїну, були ініційовані Департаментом сільського господарства США (USDA ARS) спільно з Університетом штату Небраска ще в 1954 р. Протягом більш як 30 років (1954—1985) було досліджено генетичну варіабельність за вмістом протеїну в зерні 12 600 сортів пшениці, яка загалом становила аж 5 %.

У результаті цих та інших численних досліджень було встановлено, що вміст протеїну в зерні пшениці є досить складною кількісною ознакою з чітко вираженою оберненою залежністю від рівня врожаю зерна, яка значно більшою мірою залежить від середовища та умов вирощування, ніж від генотипу, контролюється комплексом генів з адитивними й неадитивними ефектами та є складнодосяжною для істотного поліпшення методами традиційної селекції [3—8]. Майже в кожній із 21 хромосоми пшениці локалізовані гени з помітним або міноним впливом на загальний вміст білка в зерні пшениці [9].

Разом із протеїном вкрай важливими у харчуванні людства є мікронутрієнти (синоніми: мікроелементи, мінерали), від дефіциту яких у повсякденній їжі страждає більш як половина населення Землі [10]. Так, через нестачу в їжі лише заліза в світі потерпає 2,7 млрд осіб, серед яких близько 160 млн дітей віком до п'яти років мають вади фізичного розвитку через хронічну нестачу в харчовому раціоні цього елемента [11, 12].

У світових колекціях зародкової плазми пшениці, особливо дикорослих, із різним рівнем плідності знайдено досить багато джерел із вмістом білка в зерні 23—27 % [13]. Однак жодне з цих джерел не стало донором високого вмісту білка в зерні для сортів культурної пшениці, оскільки поняття «джерело» і «донор» високого вмісту білка в зерні є докорінно різними за своєю суттю, а саме, можливістю спадкової передачі ознаки «високий вміст білка» від джерела в культурний високопродуктивний сорт.

І от у колекції дикорослої пшениці національних фондів зародкової плазми Ізраїлю було виявлено високобілкові, з великим зерном зразки дикорослої двозернянки *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* (Körn. ex Asch. and Graebn.) Thell. ($2n = 4x = 28$) з геномною формулою $A^u A^u BB$ [14]. Серед цього матеріалу знайдено один високобілковий зразок під назвою FA-15-3, який був схрещений із сортом твердої пшениці Langdon з метою отримання чужорідних хромосомно-заміщених ліній та ідентифікації хромосом, критичних щодо контролю ознаки високого вмісту білка в зерні [15]. В одній лінії із заміщенням пари

хромосом 6В культурного сорту Langdon на хромосомну пару 6В від *T. dicoccoides* достовірно зростав вміст білка в зерні (38 % відносно контролю) порівняно з іншими хромосомно-заміщеними лініями. Крім білка в зерні цієї лінії водночас підвищувався вміст заліза (18 %), мангану (29 %) і цинку (12 %) [25].

Отже, було ідентифіковано й локалізовано на короткому плечі хромосоми 6В QTL-фактор, відповідальний за високий вміст білка в зерні дикорослої *T. dicoccoides*. Цей QTL-фактор був картований як менделюючий регіон розміром 2,7 сМ і отримав назву *Gpc-B1* (GPC — grain protein concentration) [16]. Порівнянням колінеарності цього регіону пшениці з геномом рису локус *Gpc-B1* було обмежено інтервалом у 0,3 сМ (250 тпн), він містив п'ять генів-кандидатів [18]. За допомогою бактеріальної штучної хромосоми *T. dicoccoides* (BAC-бібліотеки) було складено фізичну карту цього регіону та ідентифіковано один окремий ген *NO APICAL MERISTEM-B1 (NAM-1)*, Genbank id: DQ869673) [17].

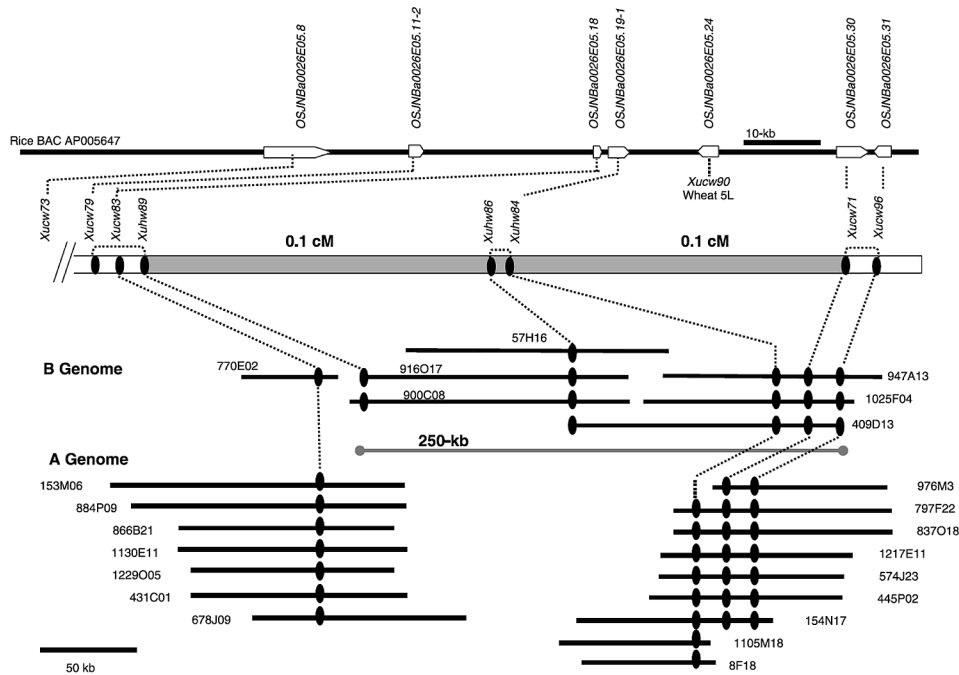
Детальне дослідження гена *Gpc-B1* як фактора, що кодує NAC-доменний білок, дало можливість чітко визначити його позицію на хромосомі 6В, ідентифіковану як послідовність розміром 7400 пн, розміщену між маркерними локусами *Xucw 109* та *Xuhw 106*. Маркерний локус *Xuhw 84*, ортологічний гену рису *OSJNBa002E05.19-1*, виявився тісно зчепленим з *Gpc-B1*, його можна використовувати як достатньо надійний маркер для детекції *Gpc-B1* у селекційних популяціях (рисунок) [17, 18]. Для контролю гена *Gpc-B1* у селекційних популяціях придатні також маркерні локуси *Xucw67*, *Xucw71*, *Xucw79*, *Xcdo365* та інші, дистанційовані від *Gpc-B1* на відстані 0,3—1,5 сМ, або локус *Xuhw 89*, розміщений від *Gpc-B1* на відстані 0,1 сМ [9, 18].

Ген *NAM-1* більше відомий у літературі як *Gpc-B1*, тому далі ми використовуватимемо саме це позначення. Згодом було встановлено, що ген *Gpc-B1* кодує NAC-доменний фактор транскрипції, білок, який належить до родини протеїнів, які виконують у різних видів рослин роль регуляторів процесів розвитку, включно з таким явищем, як старіння і захист від стресових чинників [19].

Важливо наголосити, що на відміну від інших, ідентифікованих раніше генів, які впливають на вміст білка в зерні, *Gpc-B1 (NAM-B1)* є унікальним геном, по-перше, через його сильний позитивний вплив як на вміст білка, так і водночас на вміст ключових мікроелементів у зерні пшениці, по-друге, у сенсі механізму його експресії, що виявляється морфологічно у вигляді добре відомого фізіологам явища фізіологічного старіння рослин.

Явище старіння спостерігається на останній стадії розвитку рослинних клітин, тканин чи органів і є стратегічно важливим фізіологічним станом для монокарпічних рослин (до яких належать також злаки), які цвітуть і плодоносять лише один раз упродовж свого життя. Характерним прикладом прояву явища старіння є зміна протягом кількох тижнів зеленого поля пшениці на жовте. З початком старіння настає масова ремобілізація мобільних продуктів метаболізму із вегетативних органів фізіологічно старіючої рослини в зерно.

Азотовмісні метаболіти у процесі старіння займають особливу позицію, оскільки вони кількісно домінують серед інших органічних



Мікролінеарність між *Gpc-B1* регіоном хромосоми 6В пшениці і хромосоми 2 рис. Позиції генів у геномних послідовностях рису (вгорі) порівняно з генетичною і фізичною картами колінеарного регіону пшениці (внизу). Ділянка сірого кольору репрезентує регіон розміром 0,2 сМ генетичної карти включно з локусом *Gpc-B1* [18]

сполук. Перед тим як надійти у флоему органічні макромолекули, такі як протеїни і нуклеїнові кислоти, в результаті гідролітичного розщеплення конвертуються до глутаміну, глутамату та інших амінокислот і транспортуються у зернівку. Рання чи ефективніша ремобілізація азотомісних сполук тісно пов'язана з високим вмістом білка в зерні та асоційованих із ним мікроелементів, таких як залізо і цинк [20–22].

Причетність гена *Gpc-B1* до явища старіння вивчали у спеціальному досліді порівнянням вмісту розчинного білка в листках верхнього ярусу та вмісту загального азоту в колосі, зерні і стеблах у майже ізогенних рекомбінантних заміщених ліній з функціональним і нефункціональним алелями *Gpc-B1* та вихідного сорту Langdon. Лінії з функціональним алелем *Gpc-B1* порівняно з лініями з нефункціональним алелем накопичували більше білка в зерні внаслідок підвищеної активності ремобілізації азоту з листків у колос і зерно у фазу наливання зерна. Крім того, у ліній з активним *Gpc-B1* алелем явище старіння наставало раніше порівняно з лініями з нефункціональним алелем [24, 25].

Грунтуючись на даних доступної літератури, можна стверджувати, що *Gpc-B1* (*NAM-B1*) — це перший ген у пшениці, відповідальний за варіабельність ознаки GPS «вміст білка в зерні», який був клонований на основі генетичної карти. Порівнянням послідовностей *Gpc-B1* дикорослої *T. dicoccoides* та альтернативного функціонально неактивного алеля (що не підвищує вмісту протеїну в зерні) сучасних сортів пшениці виявлено, що в переважній більшості сучасних сортів твердої і м'якої пшениці має місце інсерція розміром 1 пн у коду-

вальному регіоні *Gpc-B1*. Ця інсерція була знайдена спочатку в сорту Langdon між першим інтроном і залишком тиміну в позиції 11 (або повна делеція), яка руйнує відкриту рамку зчитування гена, що призводить до трансляції нефункціонального протеїну (327 амінокислот порівняно з 405 амінокислотами у функціональному) і, як наслідок, відсутності позитивного впливу на вміст білка в зерні сучасних сортів пшениці та час настання старіння [17, 20].

Ген *Gpc-B1* у гексаплоїдній пшениці має ще дві функціональні ортологічні копії в хромосомах 6A (*Gpc-A1*) та 6D (*Gpc-D1*) і дві паралогічні *Gpc-2* копії в хромосомах 2B (*Gpc-B2*) і 2D (*Gpc-D2*). За даними секвенування ДНК, подібність послідовностей локусів *Gpc-1* і *Gpc-2* становить 91 %, що свідчить про відносно недавню дуплікацію локусу *Gpc-2*. У тетраплоїдній пшениці для *Gpc-B1* знайдено функціональну ортологічну копію в хромосомі 6A (*Gpc-A1*) і паралогічну копію в хромосомі 2B, позначену як *Gpc-B2* [17]. Про безпосередній зв'язок копій *Gpc* із явищем старіння свідчить також той факт, що штучне блокування експресії всіх копій *Gpc* методом РНК інтерференції (RNAi gene silencing) у сорту гексаплоїдній пшениці Bobwhite призводило до запізнення настання старіння на 24–30 діб (stay green) і зниження порівняно з вихідними рослинами цього сорту на 30 % вмісту в зерні протеїну, заліза і цинку [17].

Згідно з даними визначення послідовності, функціональний алель *Gpc-B1* (алель дикого типу) налічує 1452 пн і містить два інтрони і три ексони. Функціональний білок, що його кодує цей локус, містить 405 амінокислотних залишків, має консервативну N-термінальну послідовність або NAC-домен із п'ятьма субдоменами A, B, C, D, E в позиціях 34–55, 66–80, 88–124, 139–166, 193–205 амінокислот і дуже варіабельну C-термінальну послідовність активації транскрипції [17, 23].

У результаті філогенетичних досліджень встановлено, що ген *Gpc-B1* пшениці має ортологічні гени також у геномах рису, арабідопсису, егілопсів, кукурудзи, ячменю [17, 26, 27]. У дослідженнях RIL (рекомбінантно-інбредних ліній) ячменю, отриманих від схрещування високобілкового сорту Lewis із низькобілковим сортом Karl, ідентифіковано QTL, подібний за функцією до пшеничного *Gpc-B1* на хромосомі 6H [28, 29]. Високобілкові лінії з *Gpc*-локусом від сорту Lewis були бекросовані на сорт Karl, отримано майже ізогенні лінії з локусом *Gpc* і без нього. Лінії з *Gpc*-локусом від сорту Lewis характеризувалися пришвидшеним настанням старіння порівняно з лініями без цього локусу та вихідним сортом Karl і підвищеним вмістом білка в зерні до рівня високобілкового сорту Lewis [30]. Більше того, в геномі ячменю було ідентифіковано два гени, позначені *HvNAM-1*, *HvNAM-2*, з послідовністю, на 98 % подібною до послідовності пшеничного *Gpc-B1*, локалізовані в хромосомах 6H і 2H ячменю відповідно [17]. Саме ген *HvNAM-1* ячменю виявився ортологом пшеничному *Gpc-B1* з подібною до пшеничного *Gpc-B1* експресією і характером прояву старіння та позитивним впливом на вміст білка в зерні [26, 31].

Оскільки функціональний алель дикого типу *Gpc-B1* вперше був ідентифікований спочатку лише в одного дикорослого емера *T. dicoccoides*, природно постало запитання про можливість поширення цього алеля як серед інших дикорослих видів пшениці, так і її куль-

турних сортів. Згідно з результатами досліджень, функціональний алель *Grc-B1* досить поширений серед дикорослих видів пшениці і рідко трапляється серед сучасних сортів комерційної пшениці (табл. 1).

В одному з оглядів було показано, що в усіх 42 досліджених дикорослих емерів і в 17 із 19 одомашнених емерів був наявний алель *Grc-B1* дикого типу. Однак, з іншого боку, у 57 культурних сортів твердої пшениці й у 34 сортів хлібопекарської пшениці був ідентифікований нефункціональний алель *Grc-B1*, характерний саме для культурного сорту твердої пшениці Langdon, або ж фіксувалась повна відсутність (делеція) цього гена [17]. За результатами іншої роботи, алель дикого типу *Grc-B1* виявлено лише у 2 із 62 досліджених історичних (старих) сортів хлібопекарської пшениці й у 2 зразках спельти, що були представлені у 1862 р. на Міжнародній виставці в Лондоні [33]. І лише 5 сортів із 367, досліджених у роботі французьких учених із Національного інституту сільськогосподарських досліджень (INRA), було знайдено із функціональним алелем *Grc-B1* серед світової колекції пшениці (Росія, Канада, Монголія, Японія, країни Феноскандії), причому функціональний алель дикого типу *Grc-B1* значно частіше (46 зразків зі 138 досліджених) траплявся серед колекції сортів ярої пшениці у північних регіонах вирощування походженням із регіону Феноскандії [20]. Подібна ситуація помічена й серед 22 досліджених зразків спельти з INRA та Північного центру генетич-

ТАБЛИЦЯ 1. Поширення функціонального алеля *Grc-B1* дикого типу і нефункціонального алеля серед дикорослих видів і культурних сортів пшениці [32]

Літературне джерело	Вид	Алель <i>Grc-B1</i>		Примітка
		дикий тип	нефункціональний*	
[17]	<i>T. tu. var. dicoccoides</i>	42	0	Дикорослий емер
	<i>T. tu. ssp. dicoccum</i>	17	2	Одомашнений емер
	<i>T. tu. ssp. durum</i>	0	57	Культурні сорти
	<i>T. ae. ssp. aestivum</i>	0	34	Культурні сорти
[18]	<i>T. tu. ssp. durum</i>	0	39	
	<i>T. ae. ssp. aestivum</i>	0	78	
[33]	<i>T. ae. ssp. aestivum</i>	2	47	Старі сорти пшениці з виставки у Лондоні (1862)
	<i>T. ae. ssp. spelta</i>	2	5	
	<i>T. ae. ssp. compactum</i>	0	1	
	<i>T. tu. ssp. durum</i>	0	2	
	<i>T. tu. ssp. turgidum</i>	0	2	
[20]	<i>T. ae. ssp. aestivum</i>	5	362	Сорти пшениці світової колекції, створені у XIX і XX ст. (Росія, Канада, Японія, Монголія)
	<i>T. ae. ssp. aestivum</i>	46	92	
	<i>T. ae. ssp. spelta</i>	5	17	

* Нефункціональний в результаті зсуву рамки зчитування або часткової/повної делеції.

них ресурсів, де п'ять зразків містили функціональний алель *Gpc-B1* дикого типу [34].

Узагальнення даних поширення алелів локусу *Gpc-B1* свідчить про те, що наявність нефункціонального алеля цього локусу — доволі рідкісне явище для пшениць історичних і древніх популяцій, і водночас нефункціональний алель *Gpc-B1* домінує (за винятком кількох сортів північного регіону) серед сучасних сортів пшениці. Це може свідчити про досить швидке закріплення нефункціонального алеля в сучасних сортах пшениці у процесі їх одомашнення і селекції на урожайність. З іншого боку, можливо, що нефункціональний алель *Gpc-B1* вже був наявний в одомашненої пшениці тетраплоїдного емера, яка дала початок гексаплоїдній хлібопекарській пшениці. Остання гіпотеза узгоджується з тим фактом, що функціональний алель *Gpc-B1* дикого типу доволі поширений серед пшениць Феноскандії, що мають спільне походження [32].

З тих пір як ген *Gpc-B1* був клонований, у різних країнах світу в польових умовах і в умовах штучного клімату протягом більш як 10 років проведені численні дослідження з вивчення ефектів цього гена як на вміст у зерні протеїну і мінералів, так і його зв'язок із зерновою продуктивністю, фізіологічними й агрономічними характеристиками рослин, технологічними характеристиками зерна. Найбільш вдалою спробою узагальнення результатів цих досліджень можна вважати огляд дослідників із двох університетів Аргентини та відділу рослинництва і ґрунтів Університету Колорадо, США [32].

Вміст білка в зерні пшениці, як уже наголошувалося, є класичною кількісною ознакою, яка хоча й детермінується генотипом, та все ж значною мірою залежить від впливу на рослину кліматичних чинників, таких як час відновлення весняної вегетації (в озимій пшениці), оптимальне забезпечення рослини компонентами мінерального живлення, доступна для рослини волога, температура ґрунту і повітря тощо. Тому ефект гена *Gpc-B1* на вміст у зерні пшениці білка і мінералів, хоча і є доволі сильним, істотно маскується кліматичними чинниками і є складним для дослідження [35, 36].

Підсумувавши результати 25 досліджень ($n = 127$), Таббіта і співавт. [32] наголосили, що серед аналізованого загалу 91 % досліджених ліній пшениці з функціональним алелем *Gpc-B1* дикого типу мали в середньому вміст білка в зерні на 21,8 % вищий порівняно з лініями з нефункціональним алелем. У решти 9 % досліджених ліній різниця за вмістом білка між порівнюваними варіантами дослідів була неістотною, причому різниця між варіантами за впливом на вміст білка в зерні функціонального алеля проти нефункціонального була більшою серед генотипів гексаплоїдної м'якої пшениці, ніж серед тетраплоїдної твердої пшениці. Автори також підкреслили, що найістотніший ефект функціонального *Gpc-B1* алеля порівняно з нефункціональним (різниця в середньому 31,2 %, $n = 61$) спостерігався у досліді з індійськими сортами пшениці, частка яких становила до 48 % усіх цитованих досліджень [37–39].

В іншій роботі індійських авторів двох університетів та офісу СІММУТ у Непалі було застосовано метод маркер-допоміжного бекросування для поліпшення популярного сорту пшениці HUW468 за

вмістом білка в зерні з використанням у схрещуваннях Glu269 як сорту-донора алеля *Gpc-B1* [40]. Для контролю перенесення в геном сорту-реципієнта мінімального регіону хромосоми сорту-донора розміром у 10 сМ, який включав безпосередньо сам алель *Gpc-B1*, у популяціях було використано сім зчеплених із ним маркерів: *Xuhw89*, *QGpc.ccsu-2D.1/2DL*, *CAPS/ASA/XNor-B2*, *Xwmc415*, *Xucw108*, *Xucw109*. Серед них SSR маркер *Xucw108* виявився найефективнішим. Крім того, 86 поліморфних SSR маркерів, розміщених по всьому геному пшениці, було обрано для якомога повнішого відновлення при бекросуванні геному сорту-реципієнта HUW468. Реконституція (відтворення) отриманого аналога, що містив алель *Gpc-B1* від сорту-донора Glu269, відбулась на 88,4—92,3 % відносно вихідного сорту HUW468 протягом 2,5 року і п'яти послідовних генерацій. Отриманий аналог сорту HUW468 з алелем *Gpc-B1* не відрізнявся від вихідного сорту за урожаєм зерна, але мав вірогідно підвищений вміст білка в зерні більш як 14 % порівняно з 10 % білка в зерні рекурентного сорту.

Спільними зусиллями чотирьох науково-дослідних установ Аргентини шляхом маркер-допоміжної селекції (MAS) було створено дві серії майже ізогенних ліній (NIL's) на базі двох сортів ярої пшениці й використання в схрещуваннях джерела *Gpc-B1* сорту Gluro [41]. Для контролю гена *Gpc-B1* у популяціях застосовували кілька мікросателітних маркерів: *Xgwm508*, *Xgwm644*, *Xgwm193*, *Xuhw89*. Матеріал NIL's досліджували за комплексом агрономічно важливих характеристик упродовж трьох років (2005—2007). У результаті цих досліджень встановлено, що NIL's, з детектованою наявністю *Gpc-B1* істотно ($p = 0,01$) і стабільно протягом трьох років перевищували NIL's без *Gpc-B1* за вмістом білка в зерні (у середньому за три роки 12,7 % проти 11,9 %), а також вірогідно ($p = 0,001$) поступалися перед NIL's без *Gpc-B1* за масою 1000 зернин (27,6 г проти 30,1 г). Разом з тим різниця за урожаєм зерна між цими двома групами NIL's була неістотною ($p = 0,49$). У середньому за три роки NIL's із *Gpc-B1* вірогідно ($p = 0,02$) перевищували лінії без *Gpc-B1* за показником збиральний індекс азоту, істотно ($p = 0,02$) поступалися останнім за вмістом азоту в соломі. Крім того, наявність *Gpc-B1* позитивно і вірогідно впливала на різницю між досліджуваними NIL's за такими складовими урожаю зерна, як кількість зернин і кількість колосів на 1 м² та маса зерна з колоса. Автори дійшли висновку, що інтрогресія *Gpc-B1* алеля в сорти пшениці аргентинської селекції є цінним генетичним ресурсом для їх поліпшення за вмістом білка в зерні без істотного негативного впливу на урожай зерна [41].

Оскільки багато ґрунтовних досліджень вказують на неістотний негативний вплив функціонального алеля *Gpc-B1* на зернову продуктивність пшениці, були зроблені спроби визначити у генотипів з алелем *Gpc-B1* дикого типу таку характеристику, як «збір білка з гектара» посіву, який є добутком показників вмісту білка в зерні на урожай зерна. Результати сімох подібних досліджень ($n = 37$) підтвердили, що алель дикого типу *Gpc-B1* справді сприяв підвищенню збору білка з гектара в межах 229—1440 кг/га. Водночас серед 68 % інших досліджень істотного підвищення збору білка з гектара не спостерігали. Найістотніше його підвищення (1440 кг/га) зафіксовано в

дослідженнях Каліфорнійського університету (м. Дейвіс) у ліній із функціональним алелем *Gpc-B1* твердої пшениці сорту UC1113 та сорту м'якої пшениці RS15 (830 кг/га) [42]. Ці ж автори повідомили, що алель *Gpc-B1* дикого типу порівняно з контролем підвищував також і збір білка на 0,4 г у перерахунку на 1000 зернин.

У зв'язку з тим що функціональний алель *Gpc-B1* має безпосереднє відношення до фізіологічного старіння рослин пшениці, у генотипів із функціональним алелем *Gpc-B1* слід очікувати активнішої ремобілізації азоту в період наливання зерна з вегетативної маси в зерно. Ця гіпотеза була чітко підтверджена у спеціальних фізіологічних дослідках із транскриптомним аналізом трансгенних рослин, отриманих методом РНК інтерференції (RNAi), та мутантів, індукованих методом *TILLING*, які показали, що алель *Gpc-B1* впливає на експресію генів, які мають відношення до метаболізму азоту, заліза і цинку. В ліній обох типів (із функціональним *Gpc-B1* і нефункціональним алелем) відмінностей у загальному накопиченні в листках таких мінералів, як Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, S, Zn, N не виявлено. Однак вміст Fe, Zn та N у зерні *TILLING* мутантів був знижений, а ремобілізація цих мінералів із листової маси у RNAi ліній була також сповільненою порівняно з лініями із функціональним *Gpc-B1* [21, 43, 44].

Алель *Gpc-B1* також досить помітно впливав на відносний розподіл азоту в тканинах зерна і соломи дозрілих рослин пшениці. Лінії з функціональним *Gpc-B1* і нефункціональним алелем не відрізнялися між собою ні за листостебловою біомасою, ні за збиральним індексом (частка маси зерна у загальній надземній біомасі). Разом з тим вміст азоту в соломі був істотно знижений, а збиральний індекс азоту — підвищений у ліній з *Gpc-B1* алелем дикого типу відносно ліній із нефункціональним алелем. Результати цього дослідження підтвердили факт активнішої ремобілізації азоту з вегетативної маси в зерно у ліній із функціональним *Gpc-B1* алелем [24, 45–47]. Автори цитованих робіт зазначили, що активніша ремобілізація азоту з листостеблової маси в зерно не лише підвищує вміст азоту в зерні, а й може слугувати важливим екологічним чинником, оскільки сприяє зниженню потреби використання азотних добрив на посівах пшениці [45].

Асоційоване підвищення вмісту азоту і цинку в зерні ліній пшениці з функціональним *Gpc-B1* не є випадковим, а швидше пояснюється загальною тісною кореляцією між накопиченням цих елементів у зерні як пшениці, так і інших зернових, наприклад, тритикале і кукурудзи [48–50]. Позитивна залежність між накопиченням у зерні азоту, заліза і цинку пояснюється існуванням загальних транспортних механізмів, що регулюють транслокацію цих елементів у зерні [44].

Крім підвищення вмісту в зерні азоту, заліза і цинку, алель дикого типу *Gpc-B1* у низці досліджень був асоційований також зі збільшенням вмісту в зерні пшениці таких мікронутрієнтів, як манган [25], кальцій [46], магній, фосфор і сірка [51].

Функціональний алель дикого типу *Gpc-B1* є нетиповим генетичним фактором для культурної пшениці, що позитивно впливає на вміст у зерні білка і ключових мінералів. Разом з тим існуюча загальна тенденція оберненого зв'язку між вмістом білка в зерні пшениці й зерновою продуктивністю культури є підставою для ретельного дослід-

ження зв'язку функціонального алеля *Grc-B1* з урожаєм зерна пшениці. В огляді [32] автори узагальнили дані 15 досліджень ($n = 98$) з вивчення інтрогресії функціонального алеля *Grc-B1* у геном культурної хлібопекарської пшениці у зв'язку з його впливом на урожай зерна. Серед цих досліджень у 79 % випадків не спостерігали негативного впливу *Grc-B1* на урожай зерна, 17 % досліджень вказували на позитивну кореляцію між *Grc-B1* і зерною продуктивністю, де максимальний приріст урожаю зерна в результаті інтрогресії *Grc-B1* становив 6,34 ц/га. У зовсім незначній частці досліджень (4 %) вказувалось на зниження урожаю зерна до 3,63 ц/га. Інтрогресія функціонального алеля *Grc-B1* у геном культурної твердої пшениці у семи різних дослідках ($n = 25$) не призводила до зниження зернової продуктивності [24, 25]. Результати цих та інших досліджень вказують на те, що значна варіабельність урожаю зерна спостерігалась залежно від генотипу і середовища вирощування та взаємодії між ними, в той час як вплив *Grc-B1* на урожай зерна був практично непомітним [45].

Одним із важливих елементів зернової продуктивності є маса 1000 зернин. Цю ознаку досліджували у зв'язку з інтрогресією *Grc-B1* в культуру у 18 роботах ($n = 111$) і в 36 % із них негативного впливу *Grc-B1* на масу 1000 зернин не виявлено. У 23 % досліджень *Grc-B1* істотно (на 2,2 г) знижував масу 1000 зернин, результати решти (41 %) досліджень вказували на істотне збільшення (4,4 г) маси 1000 зернин, де вплив алеля дикого типу *Grc-B1* у 43 із 45 ліній було помічено через збільшення маси 1000 зернин. Поряд з масою 1000 зернин важливою технологічною ознакою є натура зерна (маса певного його об'єму), від якої значною мірою залежать борошномельні характеристики пшениці. Серед відомих досліджень ($n = 32$) у 63 % випадків функціональний алель *Grc-B1* не впливав негативно на натуру зерна, тоді як у решті досліджень негативну залежність спостерігали [32].

Що стосується зв'язку функціонального алеля *Grc-B1* з елементами продуктивності рослин, у двох дослідженнях повідомлялось, що цей алель асоційований зі збільшенням кількості колосків на колосі [39, 40]. В інших шести роботах було досліджено всього 53 лінії з функціональним алелем *Grc-B1* і без нього. У 38 % випадків повідомлялось про істотне збільшення кількості продуктивних стебел на рослину в ліній з алелем *Grc-B1*, тоді як в інших 62 % досліджень ці спостереження не підтверджені [47]. Такою же неоднозначною була картина і в дослідженнях зв'язку функціонального алеля *Grc-B1* з кількістю колосків на колос: одні автори вказували на збільшення (до 4,5) кількості колосків на колос, інші — констатували зменшення цього показника або відсутність різниці [39, 40]. Подібна до попередньої ситуація описана і в дослідженнях кількості зернин на колос у 32 ліній із функціональним алелем *Grc-B1* і без нього: різниця була або відсутня (72 % ліній), або алель *Grc-B1* був пов'язаний із незначним збільшенням озерненості колоса в решті робіт [38]. Загалом ситуація з вивченням залежності елементів структури урожаю від алеля дикого типу *Grc-B1* така, що його вплив на елементи структури урожаю швидше є нейтральним, пов'язаним із незначним зменшенням маси 1000 зернин, компенсованим кількістю продуктивних стебел на рослину [32].

Оскільки ефект алеля дикого типу *Gpc-B1* тісно пов'язаний із фізіологічним старінням рослин пшениці, численні спостереження були спрямовані саме на вивчення зв'язку *Gpc-B1* з фенологією і фізіологією рослин. За результатами 11 досліджень ($n = 51$) з вивчення зв'язку алельної варіації за геном *Gpc-B1* з тривалістю періоду до цвітіння зроблено висновок про відсутність істотного впливу гена *Gpc-B1* на тривалість періоду від сходів до цвітіння рослин пшениці [17].

Як уже зазначалося, досліди з використанням GPC::RNAi трансгенних ліній та GPC1 TILLING мутацій чітко продемонстрували, що ген *Gpc-B1* відіграє ключову роль у явищі старіння, і з втратою функції гена *Gpc-B1* воно відбувається зі значним запізненням [17, 44, 52]. Дослідження з експресії *Gpc-B1* також прямо вказують на те, що ген *Gpc-B1* експресується після цвітіння [43, 44, 52]. Отже, зв'язок алельної варіації за геном *Gpc-B1* із такими ознаками, як загальна і продуктивна кушистість, є неочікуваним [53]. Для об'єктивного визначення початку фізіологічного старіння пшениці важливо використовувати характерні ознаки ініціації цього фізіологічного процесу, наприклад такі, як жовкнення стебла під колосом.

Важливим висновком із досліджень активності функціонального гена *Gpc-B1* в GPC::RNAi рослинах є встановлення залежності вмісту крохмалю в зерні від тривалості фотосинтезу. Ці рослини, як уже згадувалось, мають триваліший період вегетації (stay green), але накопичують крохмалю в зерні стільки ж, як і контрольні рослини з коротшим вегетаційним періодом. Автори цих досліджень дійшли висновку, що активність накопичення крохмалю в період наливання зерна є важливішою за власне тривалість процесу фотосинтезу [54].

Підвищення вмісту білка в зерні як результат експресії алеля дикого типу *Gpc-B1* імовірно має впливати на хлібопекарські характеристики гексаплоїдної пшениці та якості продуктів із твердої тетраплоїдної пшениці. Ці питання детально досліджені у роботах [45, 55–58]. Як приклад найгрунтовнішого дослідження впливу *Gpc-B1* на технологічні ознаки м'якої і твердої пшениці наведемо спільну працю групи Дубковського з Університету штату Каліфорнія (Davis, USA) із фахівцями Західної лабораторії якості пшениці Університету Вашингтона (Pullman, USA) та Департаменту рослинництва Університету Північна Дакота (Fargo, USA) [58].

У цій роботі в польових умовах вивчали 6 майже ізогенних ліній (NIL's) гексаплоїдної і 2 лінії твердої пшениці (BC6F3), що на 99 % були подібними до рекурентних сортів, які використовували як контроль.

У досліді з хлібопекарською пшеницею вивчали зв'язок гена *Gpc-B1* з такими технологічними ознаками, як натура і маса зерна, твердість зерна, вміст білка в зерні і борошні, вихід борошна при помелі зерна, зольність борошна, водовбирна здатність (ВВЗ) борошна, стійкість тіста до замісу, об'єм хліба. Технологічні показники майже ізогенних ліній носіїв гена *Gpc-B1* хлібопекарської пшениці порівняно з контролем наведено у табл. 2. Тут подані середні характеристики якості зерна і борошна досліджуваного матеріалу, вирощеного в двох різних точках штату Каліфорнія у 2006 і 2007 рр. В окремих варіантах досліді залежно від рекурентного сорту, місця і року урожаю різниця за вмістом білка в зерні між дослідними варіантами

майже ізогенних ліній і контролем становила від 0,4 до 1,2 %. Паралельно з підвищенням вмісту білка в зерні і борошні істотно зростає рівень показника ВВЗ, який, як відомо, доволі тісно пов'язаний з вмістом білка в зерні. Впливу гена *Gpc-B1* на ознаку твердості зерна не виявлено [59].

З геном *Gpc-B1* також тісно пов'язаний об'єм хліба. В середньому майже ізогенні лінії з геном *Gpc-B1* показали за об'ємом хліба приріст порівняно з контролем на 79,1 см³, що становило 9,3 %. Найбільша різниця за об'ємом хліба між окремими дослідними варіантами з геном *Gpc-B1* і контролем була на рівні 126–143 см³, що становило більш як 15 % відносно контролю. Лінії з інтрогресією гена *Gpc-B1* характеризувалися значно тривалішою порівняно з контролем стійкістю тіста до замісу [58].

Разом із позитивним впливом гена *Gpc-B1* на вміст білка в зерні та хлібопекарські характеристики у дослідях групи Дубковського [58] виявлено низку негативних асоціацій цього гена з натурою і масою зерна та, як наслідок, зі зниженим виходом борошна при помелі зерна. Однак, незважаючи на зниження виходу борошна при помелі на 1 %, вихід борошна в дослідних майже ізогенних ліній перевищував 70 %, що економічно цілком доцільно. Незважаючи на зниження натурі і маси зерна в середньому не було помічено істотної різниці між дослідними варіантами і контролем за ознакою зольності борошна, хоча в окремих парах порівняння зольність борошна була підвищеною в ліній з геном *Gpc-B1*. Оскільки показники виходу борошна при помелі зерна та його зольність є складовими загальної борошномельної оцінки, то й очікувано, що загальна борошномельна оцінка була нижчою у ліній з геном *Gpc-B1* порівняно з контролем без нього.

Подібні дослідження асоціацій гена *Gpc-B1* із технологічними характеристиками зерна і продуктів його переробки проведені на культурі твердої тетраплоїдної пшениці. Досліджували ті ж самі, що і в попередньому випадку, загальні технологічні ознаки та додатково технологічні характеристики кінцевого продукту — пасти (табл. 3).

ТАБЛИЦЯ 2. Вплив інтрогресії гена *Gpc-B1* у геном хлібопекарської пшениці на характеристики її борошномельної та хлібопекарської якості [58]

Ознака	Середнє ±SEM		Δ ^a , %	p
	Контроль	<i>Gpc-B1</i>		
Маса зернівки, мг	2,9±0,01	2,8±0,01	-1,4	0,008
Натура зерна, кг/гектолітр	82,0±0,1	81,0±0,1	-1,1	0,0001
Вміст білка в зерні, %	13,08±0,07	13,74±0,06	+5,0	0,012
Вміст білка в борошні, %	11,4±0,06	11,9±0,08	+4,9	0,14
Вихід борошна, г/кг	718,4±0,1	711,4±0,1	-1,0	0,009
Борошномельна оцінка	85,3±0,2	85,4±0,2	-1,0	0,007
ВВЗ, %	61,4±0,19	62,9±0,17	+2,5	0,009
Тривалість замісу тіста, хв	2,58±0,08	3,27±0,09	+27,1	0,002
Об'єм хліба, см ³	849,5±7,9	928,6±6,7	+9,3	0,03

Подібно до даних, отриманих у дослідях із м'якою пшеницею, вміст протеїну в зерні і крупці майже ізогенних ліній твердої пшениці з інтрогресією гена *Gpc-B1* був істотно вищий порівняно з контрольним варіантом (див. табл. 3), причому ефект гена *Gpc-B1* на вміст білка в зерні серед зразків твердої пшениці загалом був значно помітнішим, ніж у дослідях із хлібопекарською пшеницею. Значний приріст вмісту білка в зерні ліній із геном *Gpc-B1* порівняно з контрольним варіантом істотно позначався на більшості інших ознак технологічної якості твердої пшениці. Приріст вмісту сирої клейковини в зерні становив 18,9 %. Реологічні характеристики тіста, такі як висота піка, кінцеві висота й ширина мікрограми, тривалість замісу тіста, у ліній із геном *Gpc-B1* також були значно поліпшені порівняно з контролем. Спагеті, виготовлені з крупки ліній із геном *Gpc-B1*, порівняно з контрольними також мали вищу твердість і характеризувалися значно меншими втратами продукту при варінні. Однак, як і з м'якою пшеницею, у досліді з твердою пшеницею лінії з геном *Gpc-B1* істотно поступалися контрольному варіанту без гена *Gpc-B1* як за масою, так і натурою зерна. Унаслідок зміни фізичних характеристик зерна зольність крупки з ліній з інтрогресією гена *Gpc-B1* також була істотно підвищеною.

Сильний ефект інтрогресії гена *Gpc-B1* на технологічні характеристики якості зерна твердої пшениці порівняно з м'якою пшеницею автори дослідження пояснили різницею у кількості функціональних *Gpc* копій у м'якої і твердої пшениці. Так, м'яка пшениця містить чотири функціональних *Gpc* копії (*Gpc-A1*, *Gpc-D1*, *Gpc-B2*, *Gpc-D2*), тоді як більшість сортів тетраплоїдної твердої пшениці — лише дві *Gpc* копії (*Gpc-A1*, *Gpc-B2*). Отже, додавання однієї функціональної *Gpc-B1* копії чинить сильніший дозовий ефект у тетраплоїдної (два функціональні гени у контрольному сорту порівняно з трьома дозами у майже ізогенних ліній з інтрогресією *Gpc-B1*), ніж це має місце на

ТАБЛИЦЯ 3. Вплив інтрогресії гена *Gpc-B1* на технологічні характеристики твердої пшениці [58]

Ознака	Середнє \pm SEM		Δ^a , %	<i>p</i>
	Контроль	<i>Gpc-B1</i>		
Маса зернівки, мг	50,1 \pm 0,6	48,2 \pm 0,5	-3,8	0,10
Натура зерна, кг/гектолітр	81,7 \pm 0,2	79,9 \pm 0,3	-2,2	0,019
Вміст білка в зерні, %	12,9 \pm 0,14	14,5 \pm 0,15	+12,4	0,005
Вміст білка в крупці, %	11,4 \pm 0,13	13,0 \pm 0,6	+14,3	0,007
Зольність крупки, %	0,65 \pm 0,01	0,68 \pm 0,01	+5,2	0,018
Вміст сирої клейковини, %	30,6 \pm 0,5	36,4 \pm 0,7	+18,9	0,023
Індекс якості клейковини	59,4 \pm 5,3	71,9 \pm 3,1	+21,1	0,15
Тривалість замісу тіста, хв	2,67 \pm 0,11	2,98 \pm 0,13	+11,6	0,0012
Висота піка, см	5,86 \pm 0,15	6,60 \pm 0,11	+12,6	0,016
Твердість пасти, г/см	5,10 \pm 0,11	6,04 \pm 0,12	+18,4	0,023
Втрати спагеті під час варіння, %	6,94 \pm 0,06	6,38 \pm 0,07	-8,1	0,006

рівні гексаплоїдної м'якої пшениці (чотири у нормі проти п'яти функціональних генів у ліній з *Gpc-B1* додатковою копією) [17].

Чимало авторів, які досліджували варіабельність технологічних характеристик якості зерна пшениці залежно від агрономічного і кліматичного середовища, зазначали досить сильний фоновий вплив на ці кількісні ознаки умов вирощування, що істотно ускладнює також і виявлення власне ефектів гена *Gpc-B1* як такого на технологічні ознаки пшениці [59–61].

У процесі селекційного використання гена *Gpc-B1* селекціонер має враховувати також його негативні плеiotропні ефекти на фізичні параметри зерна, такі як маса і натура зерна, що пов'язані з виходом борошна при помелі та зольністю борошна. У селекційних програмах важливо використовувати MAS технології не лише для контролю самого гена *Gpc-B1*, а й додатково ретельно контролювати ознаки, пов'язані з елементами структури урожаю зерна, що дає змогу значно підвищити вміст білка в зерні та ключових мінералів без втрати урожаю зерна [37]. Сучасні технології MAS забезпечують ефективне використання гена *Gpc-B1* у комбінації з контролем QTL, пов'язаних з елементами зернової продуктивності рослин пшениці. Ефективність такої технології чітко продемонстрована в одній із недавніх робіт, у результаті якої було отримано 15 елітних ліній пшениці з інтрогресією *Gpc-B1* зі значно підвищеним вмістом у зерні білка, заліза і цинку, причому 12 із них мали водночас значно підвищену масу 1000 зернин порівняно з лініями без *Gpc-B1* [39].

Стосовно перспектив фортифікації зерна пшениці за вмістом мікроелементів сучасна генетична інженерія, як наголошується в огляді [32], також містить у технологічному арсеналі ефективні інструменти маніпуляції з генами, що мають безпосереднє відношення до транспорту метаболітів, особливо мікроелементів у рослинах злаків [32]. Так, отримано генетично модифіковані лінії рису з екстраекспресією генів, що контролюють біосинтез фітосидерофорів, які водночас накопичують у зерні значно більше мікроелементів цинку і заліза [62–65]. Фітосидерофори, як відомо, є хелаторами іонів заліза і цинку та водночас факторами, що впливають на їх транспорт, оскільки фітосидерофори утримують ці іони в розчинному стані у лужному середовищі тканин флоєми [66, 67]. З цієї причини гени біосинтезу фітосидерофорів є досить перспективними цільовими генами в генетичній стратегії біофортифікації пшениці [68]. Крім того, екстраекспресія мембранозв'язаних транспортерів, таких як *OsYSL15*, *OsYSL2*, *HvZIP7*, та генів, що кодують зв'язаний із залізом білок феритин *SoyferH1*, *SoyferH2+*, *OsFer2* та *OsFerC*, також приводить до підвищення в зерні злаків вмісту заліза і цинку [69–75]. У зерні мутантів рису, в яких блоковані гени *OsVIT1* та *OsVIT2*, також істотно підвищений вміст заліза і цинку [76]. Пшеничні гени-ортологи багатьох із цих транспортерів включно з *TaFRO*, *TaHMA*, *TaNRRAMP*, *TaZIFL*, теж ідентифіковані і є привабливими цільовими генами для поліпшення біологічної цінності зерна пшениці [44, 77].

Отже, в результаті майже 12 років досліджень генів *Gpc* у тетраплоїдної і гексаплоїдної пшениці встановлено, що в культурних сор-

ТАБЛИЦЯ 4. *Gpc* гени у сучасних сортів гексаплоїдної і тетраплоїдної пшениці [45]

Геном	Тетраплоїд AABB		Гексаплоїд AABBDD	
	Хромосома 2 <i>Gpc-2</i>	Хромосома 6 <i>Gpc-1</i>	Хромосома 2 <i>Gpc-2</i>	Хромосома 6 <i>Gpc-1</i>
A	—	Функціональна	—	Функціональна
B	Функціональна	+1-bp	Функціональна	del/+1-bp
D	—	—	Функціональна	Функціональна

тах пшениці цих видів міститься кілька функціональних і нефункціональних копій *Gpc* генів (табл. 4).

У табл. 4 символом +1-bp позначено мутацію зі зсувом рамки зчитування, символом del/+1-bp — делецію або мутацію зі зсувом рамки зчитування (див. пояснення у тексті вище). Серед досліджених сортів пшениці *Gpc-B1* делеція була найчастішою (85 %), у решти 15 % ідентифіковано +1-bp мутацію зі зсувом рамки зчитування [45].

Інтрогресія функціонального *Gpc-B1* алеля в геном культурних сортів як тетраплоїдної, так і гексаплоїдної пшениці внаслідок активнішої ремобілізації азоту з вегетативних органів у зерно приводить до істотного підвищення вмісту білка і ключових мінералів у зерні, поліпшення збирального індексу по азоту, збільшення збору білка з одиниці посівної площі, без відчутного зниження врожаю зерна пшениці. Інкorporацію алеля *Gpc-B1* у сучасні сорти пшениці можна розглядати як стратегію, спрямовану на зменшення використання дорогих азотних добрив під посіви пшениці, зниження вартості урожаю та зменшення забруднення навколишнього середовища. Незважаючи на мінорні негативні ефекти інтрогресії *Gpc-B1* на деякі компоненти структури врожаю зерна, вплив цього алеля на урожай зерна *per se*, досліджуваний за різних агрокліматичних умов і на різних генетичних фонах, можна вважати мізерним. Оскільки функціональний алель дикого типу *Gpc-B1* практично не трапляється серед відомих культурних сортів пшениці, інтрогресія в сучасні сорти пшениці за допомогою селекції містить значний потенціал поліпшення пшениці за якістю зерна в широкому діапазоні генетичної плазми. Особливо важливо дослідити ефекти гена *Gpc-B1* на якість зерна пшениці за різних агрокліматичних умов її вирощування [32].

REFERENCES

- Alexandratos, N. & Bruinsma, J. (2012). World Agriculture: towards 2030/2050. The 2012 revision. ESA working paper No. 12-03 (Food Agric Org, Rome).
- Henchion, M., Hayes, M., Mullen, A., Fenelon, M. & Tiwari, B. (2017). Future protein supply and demand: strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. A review. Foods, pp. 1-21.
- Johnson, V., Mattern, P., Peterson, C. & Kuhr, S. (1985). Improvement of wheat protein by traditional breeding and genetic techniques. Cereal Chemistry, 62(5), p. 350-355.
- Simmonds, N. (1995). The relation between yield and protein in cereal grain. J. Sci. Food Agric., 67, pp. 309-315.
- Levy, A. & Feldman, M. (1989). Location of genes for high grain protein percentage and other quantitative traits in wild wheat, *T. turgidum* var. *dicoccoides*. Euphytica, 41, pp. 113-122.

6. Snape, J., Hyne, V. & Aitken, K. (1995). Targeting genes in wheat using marker-mediated approaches. In: ZS Li, Xin ZY (eds) Proc. 8th Int. wheat genetics symposium, Beijing, 20–25 July 1993. China Agric Sciencetech Press, Beijing, China, pp. 749-759.
7. Joppa, L., Du, C., Hart, G. & Hareland, G. (1997). Mapping genes for grain protein in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) using a population of recombinant inbred chromosome lines. *Crop Sci.*, 37, pp. 1586-1589.
8. Terasawa, Y., Ito, M., Tabiki, T., Nagasawa, K., Hatta, K. & Nishio, Z. (2016). Mapping of major QTL associated with protein content on chromosome 2B in hard red winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Breed. Sci.*, 66, pp. 471-480.
9. McIntosh, R.A., Dubcovsky, J., Rogers, W.J., Rogers, W.J., Morris, C., Appels, R. & Xia, X.C. (2013). Catalogue of Gene Symbols for Wheat. 12th Int. Wheat Genet. Symp. 8–13 Sept., Yokohama, Japan.
10. Zhao, F. & McGrath, S. (2009). Biofortification and phytoremediation. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12, pp. 373-380.
11. FAO, WHO, Rome declaration on nutrition. In: Second Int. Conference on Nutrition. Rome, Italy, 2014.
12. Hirschi, K.D. (2009). Nutrient biofortification of food crops. *Annu. Rev. Nutr.*, 29, pp. 401-421.
13. Mitrofanova, O.P. & Khakimova, A.G. (2016). New genetic resources in wheat breeding for an increased grain protein content. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii*, 20, No. 4, pp. 545-554. doi: <https://doi:10.18699/VJ16.177> [in Russian].
14. Avivi, L. (1978). High protein content in wild tetraploid *Triticum dicoccoides* Korn. Proc. 5th Int. Wheat Genet. Symp. Ed. S. Ramanujam. Indian Soc. of Genet. and Plant Breed., New Delhi, India, pp. 372-380.
15. Joppa, L. & Cantrell, R. (1990). Chromosomal location of genes for grain protein content of wild tetraploid wheat. *Crop Sci.*, 30, pp. 1059-1064.
16. Chee, P., Elias, E., Anderson, J. & Kianian, S. (2001). Evaluation of a high grain protein QTL from *Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides* in an adapted durum wheat background. *Crop Sci.*, 41, pp. 295-301.
17. Uauy, C., Distelfeld, A., Fahima, T., Blechl, A. & Dubcovsky, J. (2006). A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc and iron content in wheat. *Science*, 314, pp. 1298-1301.
18. Distelfeld, A., Uauy, C., Fahima, T. & Dubcovsky, J. (2006). Physical map of the wheat high-grain protein content gene *Gpc-B1* and development of a high-throughput molecular marker. *New Phytol.*, 169, pp. 753-763.
19. Guo, Y. & Gan, S. (2006). AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *Plant J.*, 46, pp. 601-612.
20. Hagenblad, J., Asplund, L., Balfourier, F., Ravel, C. & Leino, M. (2012). Strong presence of the high grain protein content allele of *NAM-B1* in Fennoscandian wheat. *Theor. and Appl. Genet.*, 125, pp. 1677-1686.
21. Waters, B., Uauy, C., Dubcovsky, J. & Grusak, M. (2009). Wheat (*Triticum aestivum*) *NAM* proteins regulate the translocation of iron, zinc, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain. *J. Expt. Bot.*, 60, pp. 4263-4274.
22. Distelfeld, A., Avni, R. & Fischer, A. (2014). Senescence, nutrient remobilization, and yield in wheat and barley. *J. Expt. Bot.*, 65, No. 14, pp. 3783-3798. doi: <https://doi:10.1093/jxb/ert477>
23. Dubcovsky, J., Fahima, T., Uauy, C. & Distelfeld, A. (2010). NAC from wheat for increasing grain protein content. United States Patent No.: US 7820882B2. Oct. 26.
24. Kade, M., Barneix, J., Olmos, S. & Dubcovsky, J. (2005). Nitrogen uptake and remobilization in tetraploid Langdon durum wheat and a recombinant substitution line with the high grain protein gene *Gpc-B1*. *Plant Breed.*, 124, pp. 343-349.
25. Distelfeld, A., Cakmak, I., Peleg, Z., Ozturk, L., Yazici, A.M., Budak, H., Saranga, Y. & Fahima, T. (2007). Multiple QTL-effects of wheat *Gpc-B1* locus on grain protein and micronutrient concentrations. *Physiol. Plantarum*, 129, pp. 635-643.
26. Distelfeld, A., Korol, A., Dubcovsky, J., Uauy, C., Blake, T. & Fahima, T. (2008). Colinearity between the barley grain protein content (GPC) QTL on chromosome arm 6HS and the wheat *Gpc-B1* region. *Mol. Breed.*, 22, pp. 25-38.

27. Distelfeld, A., Pearce, S., Avni, R., Scherer, B., Uauy, C., Piston, F., Slade, A., Zhao, R. & Dubcovsky, J. (2012). Divergent functions of orthologous NAC transcription factors in wheat and rice. *Plant Mol. Biol.*, 78, pp. 515-524.
28. Mickelson, S., See, D., Meyer, F., Garner, J., Foster, C., Blake, T. & Fischer, A. (2003). Mapping of QTL associated with nitrogen storage and remobilization in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *J. Expt. Bot.*, 54, pp. 801-812.
29. See, D., Kanazin, V., Kephart, K. & Blake, T. (2002). Mapping genes controlling variation in barley grain protein concentration. *Crop Sci.*, 42, pp. 680-685.
30. Jukanti, A. & Fischer, A. (2008). A high-grain protein content locus on barley (*Hordeum vulgare*) chromosome 6 is associated with increased flag leaf proteolysis and nitrogen remobilization. *Physiol. Plantarum*, 132, pp. 426-439.
31. Jamar, C., Loffet, F., Frettinger, P., Ramsay, L., Fauconnier, M.-L. & du Jardin, P. (2010). NAM-1 gene polymorphism and grain protein content in *Hordeum*. *J. Plant Physiol.*, 167, pp. 497-501.
32. Tabbita, F., Pearce, S. & Barneix, A. (2017). Breeding for increased grain protein and micronutrient content in wheat: Ten years of the GPC-B1 gene. *J. Cereal Sci.*, 73, pp. 183-191.
33. Asplund, L., Hagenblad, J. & Leino, M. (2010). Re-evaluating the history of the wheat domestication gene NAM-B1 using historical plant material. *J. Archaeol. Sci.*, 37, pp. 2303-2307.
34. Leino, M., Hagenblad, J., Edqvist, J. & Strese, E. (2009). DNA preservation and utility of a historic seed collection. *Seed Sci. Res.*, 19, pp. 125-135.
35. Abedi, T., Alemzadeh, A. & Kazemeini, S. (2011). Wheat yield and grain protein response to nitrogen amount and timing. *Aust. J. Crop Sci.*, 5, pp. 330-336.
36. Tea, I., Genter, T., Naulet, N., Boyer, V., Lummerzheim, M. & Kleiber, D. (2004). Effect of foliar sulfur and nitrogen fertilization on wheat storage protein composition and dough mixing properties. *Cereal Chem.*, 81, pp. 759-766.
37. Kumar, J., Jaiswal, V., Kumar, A., Kumar, N., Mir, R., Kumar, S., Dhariwal, R., Tyagi, S., Khandelwal, M., Prabhu, K., Prasad, R., Balyan, H. & Gupta, P. (2011). Introgression of a major gene for high grain protein content in some Indian bread wheat cultivars. *Crop. Res.*, 123, pp. 226-233.
38. Mishra, V., Pushpendra, K., Balasubramaniam, A., Ramesh, C., Neeraj, K., Manish, K., Punam, S. & Arun, K. (2015). Introgression of a gene for high grain protein content (Gpc-B1) into two leading cultivars of wheat in Eastern Gangetic Plains of India through marker assisted backcross breeding. *J. Plant Breed. Crop Sci.*, 7, pp. 292-300.
39. Vishwakarma, M., Arun, B., Mishra, V., Yadav, P., Kumar, H. & Joshi, A. (2016). Marker-assisted improvement of grain protein content and grain weight in Indian bread wheat. *Euphytica*, 208, pp. 313-321.
40. Vishwakarma, M., Mishra, V., Gupta, P., Yadav, P., Kumar, H. & Joshi, A. (2014). Introgression of the high grain protein gene Gpc-B1 in an elite wheat variety of Indo-Gangetic Plains through marker assisted backcross breeding. *Current Plant Biol.*, 1, pp. 60-67.
41. Tabbita, F., Lewis, S., Vouilloz, J., Ortega, M., Kade, M., Abbate, P. & Barneix, A. (2012). Effect of the Gpc-B1 locus on high grain protein content introgressed into Argentinean wheat germplasm. *Plant Breed.*, 132, pp. 48-52.
42. Uauy, C., Brevis, J. & Dubcovsky, J. (2006). The high grain protein content gene Gpc-B1 accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat. *J. Exp. Bot.*, 57, pp. 2785-2794.
43. Cantu, D., Pearce, S., Distelfeld, A., Christiansen, M., Uauy, C., Akhunov, E., Fahima, T. & Dubcovsky, J. (2011). Effect of the down-regulation of the high Grain Protein Content (GPC) genes on the wheat transcriptome during monocarpic senescence. *BMC Genomics*, 12, pp. 2-17.
44. Pearce, S., Tabbita, F., Cantu, D., Buffalo, V., Avni, R., Vazquez-Gross, H., Zhao, R., Conley, C., Distelfeld, A. & Dubcovsky, J. (2014). Regulation of Zn and Fe transporters by the GPC1 gene during early wheat monocarpic senescence. *BMC Plant Biol.*, 14, pp. 2-23.
45. Brevis, J. & Dubcovsky, J. (2010). Effects of the chromosome region including the Gpc-B1 locus on wheat grain and protein yield. *Crop Sci.*, 50, pp. 93-104.
46. Carter, A., Santra, D. & Kidwell, K. (2012). Assessment of the effects of the Gpc-B1 allele on senescence rate, grain protein concentration and mineral content in hard red spring wheat (*Triticum aestivum* L.) from the Pacific Northwest Region of the USA. *Plant Breed.*, 131, pp. 62-68.

47. Tabbita, F., Lewis, S., Vouilloz, J., Ortega, M., Kade, M., Abbate, P. & Barneix, A. (2013). Effects of the Gpc-B1 locus on high grain protein content introgressed into Argentinean wheat germplasm. *Plant Breed.*, 132, pp. 48-52.
48. Raboy, V., Noaman, M., Taylor, G. & Pickett, S. (1991). Grain phytic acid and protein are highly correlated in winter wheat. *Crop Sci.*, 31, pp. 631-635.
49. Feil, B. & Bänziger, M. (1993). Nitrogen and cultivar effects on the mineral element concentration in the grain of spring wheat. *Eur. J. Agron.*, 2, pp. 205-212.
50. Feil, B. & Fossati, D. (1995). Mineral composition of triticale grains as related to grain yield and grain protein. *Crop Sci.*, 35, pp. 1426-1431.
51. Asplund, L., Bergkvist, G., Leino, M., Westerbergh, A. & Weih, M. (2013). Swedish spring wheat varieties with the rare high grain protein allele of NAM-B1 differ in leaf senescence and grain mineral content. *PLoS One*, 8, pp. 1-11.
52. Avni, R., Zhao, R., Pearce, S., Jun, Y., Uauy, C., Tabbita, F., Fahima, T., Slade, A., Dubcovsky, J. & Distelfeld, A. (2014). Functional characterization of GPC-1 genes in hexaploid wheat. *Planta*, 239, pp. 313-324.
53. González, F., Miralles, D. & Slafer, G. (2011). Wheat floret survival as related to pre-anthesis spike growth. *J. Exp. Bot.*, 62, pp. 4889-4901.
54. Borrill, P., Fahy, B., Smith, A. & Uauy, C. (2015). Wheat grain filling is limited by grain filling capacity rather than the duration of flag leaf photosynthesis: a case study using NAM RNAi plants. *PLoS One*, 10, No. 8, pp. e0134947. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134947>
55. Kovacs, M., Howes, N., Clarke, J. & Leisle, D. (1998). Quality characteristics of durum wheat lines deriving high protein from a *Triticum dicoccoides* (6b) substitution. *J. Cereal Sci.*, 27, pp. 47-51.
56. Mesfin, A., Frohberg, R., Khan, K. & Olson, T. (2010). Increased grain protein content and its association with agronomic and end-use quality in two hard red spring wheat populations derived from *Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides*. *Euphytica*, 116, pp. 237-242.
57. Kuhn, J., Stubbs, T. & Carter, A. (2016). Effect of the allele in hard red winter wheat in the US Pacific Northwest. *Crop Sci.*, 56, pp. 1009-1016.
58. Brevis, J., Morris, C., Manthey, F. & Dubcovsky, J. (2010). Effect of the grain protein content locus Gpc-B1 on bread and pasta quality. *J. Cereal Sci.*, 51, pp. 357-365.
59. Souza, E., Martin, J., Guttieri, M., O'Brien, K., Habernicht, D., Lanning, S., McLean, R., Carlson, G. & Talbert, L. (2004). Influence of genotype, environment, and nitrogen management on spring wheat quality. *Crop Sci.*, 44, pp. 425-432.
60. Snape, J., Quarrie, S. & Laurie, D. (1996). Comparative mapping and its use for the genetic analysis of agronomic characters in wheat. *Euphytica*, 89, pp. 27-31.
61. Kulwal, P., Kumar, N., Kumar, A., Gupta, R., Balyan, H. & Gupta, P. (2005). Gene networks in hexaploid wheat: interacting quantitative trait loci for grain protein content. *Funct. Integr. Genomics*, 5, pp. 254-259.
62. Johnson, A., Kyriacou, B., Callahan, D., Carruthers, L., Stangoulis, J., Lombi, E. & Tester, M. (2011). Constitutive overexpression of the OsNAS gene family reveals single-gene strategies for effective iron- and zinc-biofortification of rice endosperm. *PLoS One*, 6, No. 9, pp. e24476.
63. Lee, S., Persson, D., Hansen, T., Husted, S., Schjoerring, J., Kim, Y., Jeon, U., Kim, Y., Kakei, Y., Masuda, H., Nishizawa, N. & An, G. (2011). Bio-available zinc in rice seeds is increased by activation tagging of nicotianamine synthase. *Plant Biotechnol. J.*, 9, pp. 865-873.
64. Masuda, H., Kobayashi, T., Ishimaru, Y., Takahashi, M., Aung, M., Nakanishi, H., Mori, S. & Nishizawa, N. (2013). Iron-biofortification in rice by the introduction of three barley genes participated in mugineic acid biosynthesis with soybean ferritin gene. *Front. Plant Sci.*, 4, pp. 132.
65. Masuda, H., Usuda, K., Kobayashi, T., Ishimaru, Y., Kakei, Y., Takahashi, M., Higuchi, K., Nakanishi, H., Mori, S. & Nishizawa, N. (2009). Overexpression of the barley nicotianamine synthase gene HvNAS1 increases iron and zinc concentrations in rice grains. *Rice*, 2, pp. 155-166.
66. Takagi, S., Nomoto, K. & Takemoto, T. (2008). Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. *J. Plant Nutr.*, 7, pp. 469-477.

67. Takahashi, M. (2003). Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell*, 15, pp. 1263-1280.
68. White, P. & Broadley, M. (2011). Physiological limits to zinc biofortification of edible crops. *Front. Plant Sci.*, 2, p. 80.
69. Ishimaru, Y., Masuda, H., Bashir, K., Inoue, H., Tsukamoto, T., Takahashi, M., Nakanishi, H., Aoki, N., Hirose, T., Ohsugi, R. & Nishizawa, N. (2010). Rice metalnicotianamine transporter, OsYSL2, is required for the long-distance transport of iron and manganese. *Plant J.*, 62, No. 3, pp. 379-390.
70. Lee, S., Chiecko, J., Kim, S., Walker, E., Lee, Y., Guerinot, M. & An, G. (2009). Disruption of OsYSL15 leads to iron inefficiency in rice plants. *Plant Physiol.*, 150, pp. 786-800.
71. Tiong, J., McDonald, G., Genc, Y., Pedas, P., Hayes, J., Toubia, J., Langridge, P. & Huang, C. (2014). HvZIP7 mediates zinc accumulation in barley (*Hordeum vulgare*) at moderately high zinc supply. *New Phytol.*, 201, pp. 131-143.
72. Goto, F., Yoshihara, T., Shigemoto, N., Toki, S. & Takaiwa, F. (1999). Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nat. Biotechnol.*, 17, pp. 282-286.
73. Oliva, N., Chadha-Mohanty, P., Poletti, S., Abrigo, E., Atienza, G., Torrizo, L., Garcia, R., Duecas, C., Poncio, M., Balindong, J., Manzanilla, M., Montecillo, F., Zaidem, M., Barry, G., Hervy, P., Shou, H. & Slamet-Loedin, I. (2014). Large-scale production and evaluation of marker-free indica rice IR64 expressing phytoferritin genes. *Mol. Breed.*, 33, pp. 23-37.
74. Paul, S., Ali, N., Datta, S. & Datta, K. (2014). Development of an iron-enriched high-yieldings indica rice cultivar by introgression of a high-iron trait from transgenic iron-biofortified rice. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 69, pp. 203-208.
75. Vasconcelos, M., Datta, K., Oliva, N., Khalekuzzaman, M., Torrizo, L., Krishnan, S., Oliveira, M., Goto, F. & Datta, S. (2003). Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene. *Plant Sci.*, 164, pp. 371-378.
76. Zhang, Y., Xu, Y., Yi, H. & Gong, J. (2012). Vacuolar membrane transporters OsVIT1 and OsVIT2 modulate iron translocation between flag leaves and seeds in rice. *Plant J.*, 72, pp. 400-410.
77. Borrill, P., Connorton, J., Balk, J., Miller, A., Sanders, D. & Uauy, C. (2014). Biofortification of wheat grain with iron and zinc: integrating novel genomic resources and knowledge from model crops. *Front. Plant Sci.*, 5, Article 53, pp. 1-8.

Received 24.05.2018

GPC-B1 (NAM-B1) ГЕН КАК НОВЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ РЕСУРС В СЕЛЕКЦИИ ПШЕНИЦЫ НА ПОВЫШЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА В ЗЕРНЕ И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ

А.И. Рыбалка^{1,2}, *Б.В. Моргун*^{2,3}, *С.С. Полищук*¹

¹Селекционно-генетический институт—Национальный центр семеноведения и сортоизучения Национальной академии аграрных наук Украины, Одесса

²Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

³Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, Киев

Повышение содержания белка в зерне пшеницы остается одной из стратегических задач современной селекции. Однако содержание белка в зерне является сложным полигенно детерминированным признаком, в значительной степени зависящим от агроклиматических условий выращивания и, как следствие, сложно контролируемым и управляемым в процессе селекции. У дикой пшеницы двузернянки *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* из национальных фондов зародышевой плазмы Израиля в хромосоме 6В

идентифицирован ген дикого типа *Gpc-B1* (grain protein concentration), который существенно повышает содержание протеина в зерне и одновременно нескольких ключевых микроэлементов вследствие ускорения физиологического старения растений и более эффективной ремобилизации азота из вегетативных органов в зерно. Ген *Gpc-B1* оказывает минорные негативные эффекты на некоторые структурные элементы урожая (масса зерновки и натура), не снижая при этом урожай зерна *per se*. Ген *Gpc-B1* клонирован и детально исследован как по молекулярной структуре, так и по функциональности. В процессе серии экспериментов, выполненных в разных странах мира на разном генетическом фоне и в контрастных условиях выращивания, доказана высокая эффективность использования гена *Gpc-B1* в селекционных программах с целью повышения содержания белка и ключевых микроэлементов в зерне, улучшения его технологической и пищевой ценности.

Ключевые слова: пшеница, содержание белка, минералов, хромосома 6В, ген *Gpc-B1* (*NAM-B1*), физиологическое старение, ремобилизация азота, *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*.

GPC-B1 (*NAM-B1*) GENE AS A NEW GENETIC RESOURCE IN WHEAT BREEDING FOR HIGH GRAIN PROTEIN CONTENT AND MICRONUTRIENTS

A.I. Rybalka^{1,2}, *B.V. Morgun*^{2,3}, *S.S. Polyshchuk*¹

¹Plant Breeding and Genetics Institute—National Center of Seed and Cultivars Investigation, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine

3 Ovidiopolska Road, Odesa, 65036, Ukraine

²Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine

31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

³Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine

148 Zabolotnogo St., Kyiv, 03143, Ukraine

e-mail: molgen@icbge.org.ua

Grain protein content enhancement in wheat continues to be as one of the strategic purposes of the modern breeding. However, grain protein content is a quantitative polygenic trait highly depended of the agronomic and climate environments of growth. Therefore, it is complicated for efficient control and managing in the course of breeding. In the wild emmer *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* accession of national funds of germplasm in Israel the wild-type gene *Gpc-B1* (grain protein concentration) located on chromosome 6B was identified. The functional *Gpc-B1* is associated with essential enhancement of grain protein content and simultaneously several key micronutrients due to enforcement of physiological plant senescence and more efficient nitrogen remobilization from vegetative mass to grain. Gene *Gpc-B1* causes minor negative effects on some structural yield elements such as grain and grain test weight with no considerable penalty on grain yield *per se*. Gene *Gpc-B1* was successfully cloned and its molecular structure and functionality were studied in details. The experiments carried out in many countries on the different genetic background and under contrast growth environments evidenced the high efficiency of the gene *Gpc-B1* use in breeding programs aimed on grain protein and minerals content enhancement as well as wheat baking and nutrition quality amelioration.

Key words: wheat, protein content, minerals, chromosome 6B, gene *Gpc-B1* (*NAM-B1*), senescence, nitrogen remobilization, *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*.