

УДК 633.11 : 577.21

ДЕТЕКЦІЯ ПШЕНИЧНО-ЖИТНІХ ТРАНСЛОКАЦІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ ДНК-МАРКЕРІВ ТА ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ БІЛКІВ

А.І. СТЕПАНЕНКО¹, О.М. БЛАГОДАРОВА², Б.В. МОРГУН^{1,3}, Т.В. ЧУГУНКОВА³,
О.І. РИБАЛКА²

¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

² Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннезнавства
та сортовивчення НААН України

Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дорога, 3

³ Інститут фізіології рослин і генетики НАН України
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17

e-mail: molden@icbge.org.ua

Мета. Визначити можливості використання молекулярно-генетичного маркування генів та електрофорезу гліадинової фракції білків для детекції пшенично-житніх 1AL. 1RS та 1BL. 1RS транслокацій. **Методи.** ПЛР-аналіз ДНК пшениці, електрофорез білків у поліакриламідному гелі. **Результати.** Ідентифіковано пшенично-житні транслокації у сортах озимої пшениці. **Висновки.** Полімеразна ланцюгова реакція із застосуванням специфічних праймерів та електрофорез гліадинової фракції білків є достовірними, ефективними та взаємно доповнюючими методами для ідентифікації пшенично-житніх транслокацій.

Ключові слова: озима м'яка пшениця, пшенично-житні транслокації, ПЛР-аналіз, ДНК-маркери, електрофорез білків.

Вступ. Виявлення сортів озимої м'якої пшениці з житніми транслокаціями та їхнє застосування у селекційних програмах є важливим етапом створення нового вихідного матеріалу з покращеними господарсько-цінними ознаками. Ідентифікація пшенично-житніх транслокацій можлива різними методами. Ос-татнім часом достатньо ефективними способами визначення чужорідного ге-нетичного матеріалу у геномі пшениці є молекулярно-генетичне ДНК-марку-вання та електрофоретичне визначення білків [1–3]. Використання біохімічних маркерів та маркерів ДНК у селекційно-генетичних дослідженнях, а також для вирішення фундаментальних завдань у галузі генетики, селекції та еволюції ор-ганізмів називають «фрагментним аналізом» (komisk.ru/seminar). Такий підхід можна вважати достатньо перспективним, зокрема, біохімічні та молекулярні маркери були використані для оцінки генетичного різноманіття сортів болгар-ської пшениці [4]. Для аналізу сортів та майже ізогенних ліній м'якої пшениці також використовували як ДНК-аналіз із алель-специфічними праймерами до локусів *Gli-1* та *Glu-3*, так і електрофорез білків-гліадинів у поліакриламідному гелі [5]. В результаті було виявлено відповідність молекулярно-генетичних да-них та даних електрофорезу запасних білків. Детекція житньої транслокації, як правило, пов'язана з використанням молекулярних маркерів, що визначають

© А.І. СТЕПАНЕНКО, О.М. БЛАГОДАРОВА, Б.В. МОРГУН, Т.В. ЧУГУНКОВА, О.І. РИБАЛКА, 2014

локуси *Xrems1303* та *Sec-1*, які знаходяться у короткому плечі хромосоми 1R жита [6, 7]. Крім того, можливо аналізувати наявність у рослинному матеріалі гліадинових локусів *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1*, розташованих, відповідно, на коротких плечах хромосом пшениці 1A, 1B, 1D [2]. За наявності пшенично-житніх транслокацій відсутні фракції гліадинових білків, синтез яких пов'язаний із заміщеними пшеничними ділянками хромосом.

Мета даної роботи – перевірка надійності молекулярно-генетичних систем визначення наявності пшенично-житньої транслокації та її локалізації у сортів озимої м'якої пшениці.

Матеріали і методи

Матеріалами дослідження були сорти озимої м'якої пшениці української селекції: Ятрань 60, Колумбія, Куяльник, Чорнява, Фаворитка, Спасівка, Гілея, Хуторянка, Золотоколоса, Смуглянка та Новокиївська.

Загальну ДНК виділяли за допомогою модифікованого СТАВ мініпреп методу [8]. Пшенично-житню транслокацію ідентифікували з використанням мультиплексних полімеразних ланцюгових реакцій із специфічними праймерами до локусів *Xrems1303*, *Sec-1* та *SCM9* [6, 9–11]. Умови проведення мультиплексних ПЛР були розроблені згідно [7, 13]. Праймери до референтного гена *TaTM20* підбрано за рекомендаціями [12]. Продукти ампліфікації розділяли методом горизонтального електрофорезу у 1,2 % та 2 % агарозному гелі в натрій боратному буфері з 0,5 мг/мл бромистого етидію [14]. Аналіз гліадинової фракції білків проводився згідно [15].

Результати та обговорення

Молекулярно-генетичний аналіз ДНК із застосуванням специфічних маркерів дозволяє визначати наявність житніх транслокацій у сортах пшениці. Використовуючи мультиплексні полімеразні ланцюгові ре-

акції, показано наявність плеча 1RS жита у сортах Колумбія, Чорнява, Фаворитка, Спасівка, Гілея, Золотоколоса, Смуглянка та Новокиївська. Неоднозначні результати отримані для сорту-дворучки Хуторянка. Сорти Ятрань 60 та Куяльник не мають транслокацій. Завдяки специфічним праймерам до локусів *Xrems1303* та *Sec-1* детектують фрагменти ДНК розміром 290 пн та 400 пн і вони є маркерами звичайної пшенично-житньої транслокації (рис. 1, 2). В обох реакціях як референтний ген пшениці брали ген *TaTM20*.

Локус *Sec-1* детектується ампліконом довжиною 400 пн і визначає синтез житніх білків ω -секалінів, що можливе лише за наявності пшенично-житньої транслокації у зазначених сортів (рис. 2).

Слід зауважити, що при використанні молекулярних маркерів до локусу *Sec-1* фрагменти ампліфікації детектуються як у випадку наявності транслокації у першій хромосомі геному А пшениці (1AL.1RS), так і геному В (1BL.1RS). Для розділення сортів за наявністю транслокацій у різних хромосомах пшениці, були підбрані умови реакції ампліфікації для виявлення у їхніх геномах мікросателітного локусу жита *SCM9*, який за присутності амплікону у 226 пн вказує на транслокацію 1AL.1RS, а амплікону у 206 пн – 1BL.1RS (рис. 3).

Результати ПЛР-аналізу вказують, що сорти Ятрань 60 та Куяльник не містять пшенично-житніх транслокацій. Про це свідчить відсутність продуктів ампліфікації житнього локусу *SCM9*. Сорти Колумбія, Чорнява, Спасівка, Гілея, Хуторянка, Золотоколоса і Смуглянка є носіями транслокації 1AL.1RS, а сорти Фаворитка та Новокиївська – 1BL.1RS. Таким чином, використання незалежних праймерів до локусів, розташованих у транслокованому плечі хромосоми 1R жита, дозволило підтвердити достовірність виявлення житньої транслокації та можливості використання моле-

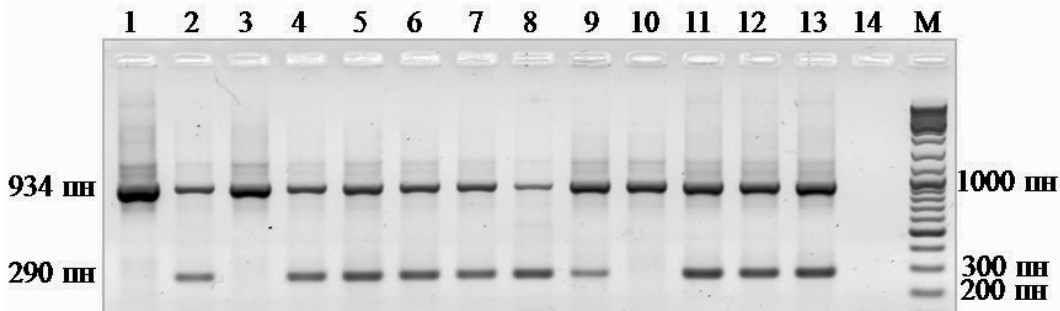


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації локусу *Xrems1303* у сортів: 1 – Ятрань 60; 2 – Колумбія; 3 – Куяльник; 4 – Чорнява; 5, 6 – Фаворитка; 7 – Спасівка; 8 – Гілея; 9, 10 – Хуторянка; 11 – Золотоколоса; 12 – Смуглянка; 13 – Новокиївська; 14 – негативний контроль ТЕ буфер рН 8,0; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

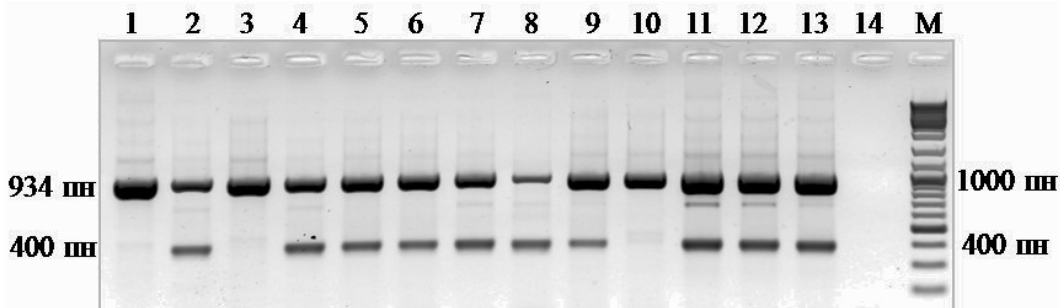


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації локусу *Sec-1* у сортів: 1 – Ятрань 60; 2 – Колумбія; 3 – Куяльник; 4 – Чорнява; 5, 6 – Фаворитка; 7 – Спасівка; 8 – Гілея; 9, 10 – Хуторянка; 11 – Золотоколоса; 12 – Смуглянка; 13 – Новокиївська; 14 – негативний контроль ТЕ буфер рН 8,0; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

кулярних систем для аналізу ДНК сортового та селекційного матеріалу.

Визначення наявності пшенично-житньої транслокації проводили також методом електрофорезу гліадинової фракції білків. Типову електрофореграму їхнього розділення наведено на рис. 4.

Факт присутності центричних хромосомних пшенично-житніх транслокацій 1AL.1RS та 1BL.1RS на електрофоретичному гелі детектується за специфічними гліадиновими компонентами за принципом альтернативного заміщення. Так, специфічним маркером для локусу *Gli-A1* (плече 1AS), який альтернативно заміщується транслокаційним плечем 1RS житньої хромосоми 1R, є гліадиновий компо-

нент, позначений на рис. 4 стрілкою зліва. У генотипів з транслокацією 1AL.1RS цей компонент відсутній. Специфічним маркером для локусу *Gli-B1* є гліадиновий компонент, позначений на рис. 4 стрілкою справа. У генотипів з транслокацією 1BL.1RS цей компонент відсутній. Отже, типовими гомогенними генотипами (сортами) з транслокацією 1AL.1RS є зразки, наведені на доріжках 2, 3, 5, 6, 9–12, 15–18. Зразки на доріжках 13 і 14, очевидно, гетерогенні за транслокацією, оскільки інтенсивність прояву характерних для транслокації 1AL.1RS маркерних гліадинів є нижчою, ніж у гомогенних. Типовими генотипами з транслокацією 1BL.1RS є зразки на доріжках 19 та 20 (сорт Новокиївська).

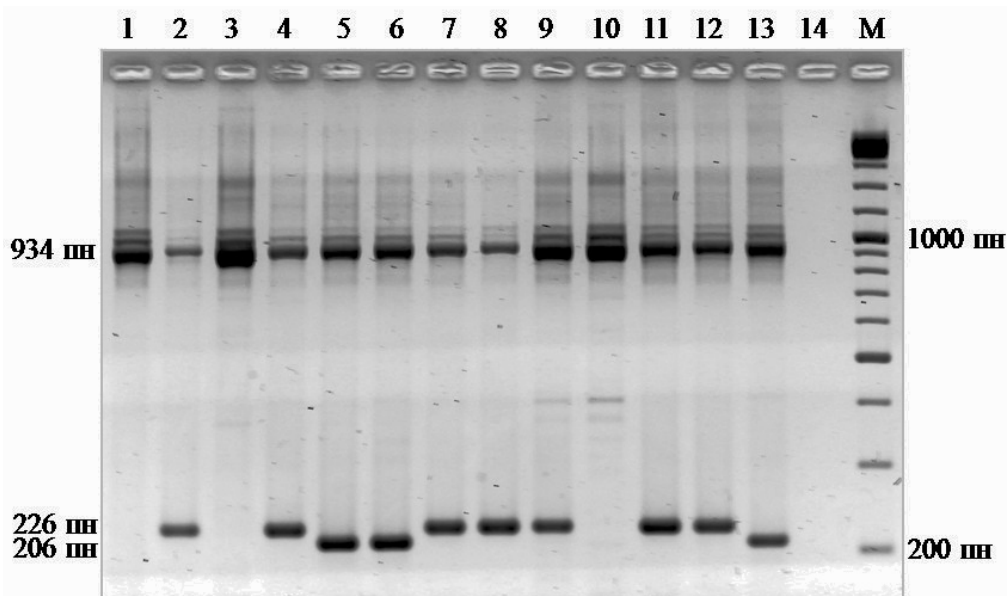


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації локусу *SCM9* у сортів: 1 – Ятрань 60; 2 – Колумбія; 3 – Куяльник; 4 – Чорнява; 5, 6 – Фаворитка; 7 – Спасівка; 8 – Гілея; 9, 10 – Хуторянка; 11 – Золотоколоса; 12 – Смуглянка; 13 – Новокиївська; 14 – негативний контроль ТЕ буфер рН 8,0; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

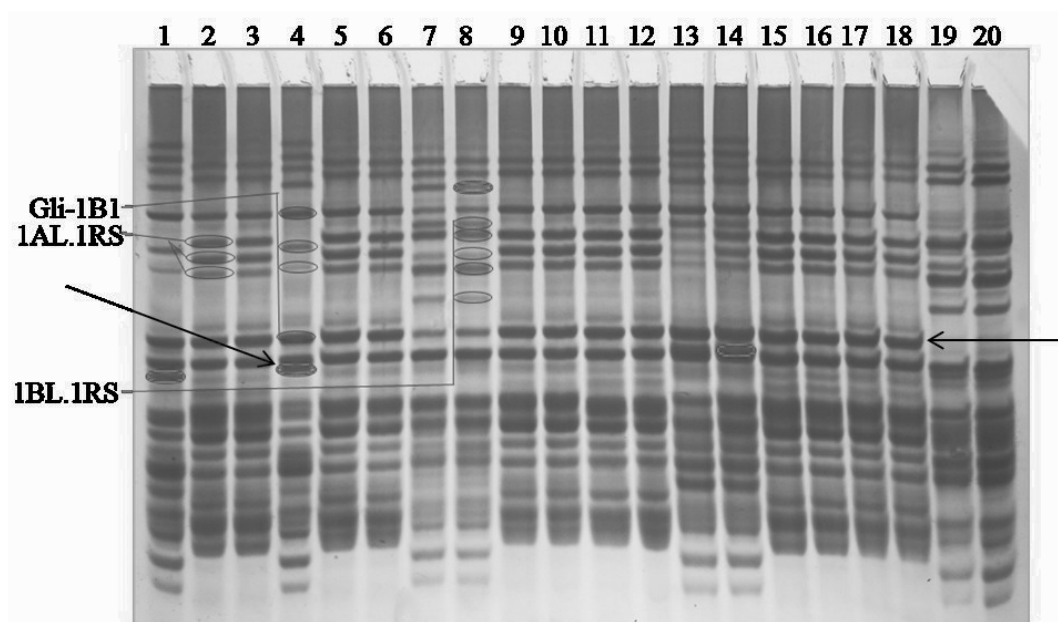


Рис. 4. Електрофореграма гліадинової фракції білків у сортів пшениці: 1 – Ятрань 60; 2, 3 – Колумбія; 4 – Куяльник (стандарт); 5, 6 – Чорнява; 7, 8 – Фаворитка; 9, 10 – Спасівка; 11, 12 – Гілея; 13, 14 – Хуторянка; 15, 16 – Золотоколоса; 17, 18 – Смуглянка; 19, 20 – Новокиївська

Сорт Фаворитка (доріжки 7 та 8) не є гомогенним за транслокацією 1BL.1RS, оскільки на одній з доріжок інтенсивність прояву білків-секалінів, які є маркерами для локусу *Sec-1*, знижена. Крім того, проаналізовані генотипи містять маркерний гліадин для пшеничного локусу Gli-B1. Результати проведених досліджень підсумовані у таблиці.

Таблиця. Розподіл сортів озимої пшениці за 1AL.1RS та 1BL.1RS транслокаціями

№	Сорт	ДНК аналіз	Білковий аналіз
1	Ятрань 60	–	–
2	Колумбія	1AL.1RS	1AL.1RS
3	Куяльник	–	–
4	Чорнява	1AL.1RS	1AL.1RS
5	Фаворитка	1BL.1RS	1BL.1RS/--
6	Спасівка	1AL.1RS	1AL.1RS
7	Гілея	1AL.1RS	1AL.1RS
8	Хуторянка	1AL.1RS/-	1AL.1RS/-
9	Золотоколоса	1AL.1RS	1AL.1RS
10	Смуглянка	1AL.1RS	1AL.1RS
11	Новокиївська	1BL.1RS	1BL.1RS

Примітка. Для сорту Фаворитка у білковому аналізі було виявлено наявність зернового матеріалу без транслокації.

Висновки

Показано, що підібрані маркерні системи (молекулярно-генетичний аналіз ДНК та електрофоретичне визначення білків) є ефективними для ідентифікації пшенично-житніх транслокацій 1AL.1RS та 1BL.1RS у сортах озимої м'якої пшениці. Поєднання різних використаних методів дозволяє виявляти гетерогенність рослинного матеріалу, що є важливим при складанні селекційних програм.

Перелік літератури

1. Козуб Н.О., Созінов І.О., Колючий В.Т., Власенко В.А., Собко Т.О., Созінов О.О. Ідентифікація 1AL/1RS транслокації у сортів м'якої пшениці української селекції // Цитология и генетика. – 2005. – Т. 39, № 4. – С. 20–24.

2. Рибалка О.І. Якість пшениці та її поліпшення. – К.: Логос, 2011. – 495 с.
3. Сиволап Ю.М. Молекулярные маркеры и селекция // Цитология и генетика. – 2013. – Т. 47, № 3. – С. 71–80.
4. Zheleva D., Todorovska E., Christov N., Ivanov P., Ivanova I., Todorov I. Assessing the genetic variation of Bulgarian bread wheat varieties by biochemical and molecular markers // Biotechnology and Biotechnological Equipment. – 2007. – Vol. 21. – P. 311–321.
5. Поліщук А.М., Чеботар С.В., Благодарова О.М., Козуб Н.О., Созінов І.О., Сиволап Ю.М. Аналіз сортів та майже ізогенних ліній м'якої пшениці за допомогою ПЛР з алель-специфічними праймерами до Gli-1 та Glu-3 локусів // Цитология и генетика. – 2010. – Т. 44, № 6. – С. 22–31.
6. Сиволап Ю.М., Чеботар С.В., Сударчук Л.В. Детекція 1RS.1AL, 1RS.1BL та модифікованої транслокації за 1RS хромосомою у селекційних форм м'якої пшениці. Методичні рекомендації. – Одеса. – 2011. – 13 с.
7. Степаненко А.І., Моргун Б.В., Чугункова Т.В., Адаменко Н.І., Великожон Л.Г. Скринінг сортів озимої м'якої пшениці на наявність пшенично-житньої транслокації за ДНК-маркерами // Вісник укр. товариства генетиків і селекціонерів. – 2012. – Т. 10, № 2. – С. 311–318.
8. Stewart C.N., Via L.E. A Rapid CTAB DNA Isolation Technique Useful for RAPD Fingerprinting and Other PCR Applications // BioTechniques. – 1993. – Vol. 14, № 5. – P. 748–749.
9. Khlestkina E.K., Than M.H.M., Pestsova E.D., Röder M.S., Malyshev S.V., Korzun V., Börner A. Mapping of 99 new microsatellite-derived loci in rye (*Secale cereale* L.) including 39 expressed sequences tags // Theor. Appl. Genet. – 2004. – Vol. 109. – P. 725–732.
10. Chai J.F., Zhou R.H., Jia J.Z., Liu X. Development and application of a new codominant PCR marker for detecting 1BL.1RS wheat-rye chromosome translocation // Plant Breeding. – 2006. – Vol. 125. – P. 302–304.
11. Saal D., Wricke G. Development of simple sequence repeat markers in rye (*Secale cereale* L.) // Genome. – 1999. – Vol. 42. – P. 964–972.
12. Yu-Young Kim, Do-Young Kim, Donghwan Shim et al. Expression of the novel wheat gene TM20 confers enhanced cadmium tolerance to bakers' yeast // J. of Biological Chemistry. – 2008. – Vol. 283, № 23. – P. 15893–15902.
13. Степаненко А.І., Степаненко О.В., Моргун Б.В. Визначення наявності пшенично-житніх транслокацій 1AL.1RS та 1BL.1RS методом мультиплексних ПЛР у сучасних сортах пшениці // Біологія рослин та біотехнологія. Матеріали II конферен-

ції молодих учених 24–25 грудня 2013 року, ІХБІГ НАНУ, Київ, Україна. – С. 30.

14. Brody J.R., Kern S.E. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis // Anal. Biochem. – 2004. – Vol. 333. – P. 1–13.
15. Рибалка О.І., Червоніс М.В., Щербина З.В. Генетичний поліморфізм клейковинних білків зерна, пов'язаних з якістю борошна пшениці: методи ідентифікації // Зб. наук. праць СГІ НУНС. – 2007. – Т. 10, № 50. – С. 52–71.

*Представлено В.А. Кунахом
Надійшла 21.05.2014*

ДЕТЕКЦИЯ ПШЕНИЧНО-РЖАНЫХ ТРАНСЛОКАЦИЙ С ПОМОЩЬЮ ДНК- МАРКЕРОВ И ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА БЕЛКОВ

*А.И. Степаненко¹, О.М. Благодарова²,
Б.В. Моргун^{1,3}, Т.В. Чугункова³, А.И. Рыбалка²*

¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины Украина, 03680, Киев, ул. Академика Заболотного, 148

²Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения НААН Украины Украина, 65036, Одесса, Овидиопольская дорога, 3

³Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17 e-mail: molgen@icbge.org.ua

Цель. Определить возможность использования молекулярно-генетического маркирования генов и электрофореза глиадиновой фракции белков для детекции пшенично-ржаных 1AL.1RS и 1BL.1RS транслокаций. **Методы.** ПЦР-анализ ДНК пшеницы, электрофорез белков в полиакриламидном геле. **Результаты.** Идентифицированы пшенично-ржаные транслокации в сортах озимой пшеницы. **Выводы.** Полимеразная цепная реакция с использованием специфических праймеров и электро-

форез глиадиновой фракции белков являются достоверными, эффективными и взаимно дополняющими методами для идентификации пшенично-ржаных транслокаций.

Ключевые слова: озимая мягкая пшеница, пшенично-ржаные транслокации, ПЦР-анализ, ДНК-маркеры, электрофорез белков.

DETECTION OF WHEAT-RYE TRANSLOCATIONS BY MEANS OF DNA MARKERS AND ELECTROPHORESIS OF PROTEINS

*A.I. Stepanenko¹, O.M. Blagodarova²,
B.V. Morgun^{1,3}, T.V. Chugunkova³,
O.I. Rybalka²*

¹Institute of Cell Biology and Genetic Engineering National Academy of Sciences of Ukraine Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 148

²Plant Breeding & Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation Ukraine, 65036, Odesa, Ovidiopol'sk rd., 3

³Institute of Plant Physiology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykiv'ska str., 31/17 e-mail: molgen@icbge.org.ua

Aim. The aim was to identify opportunities to use molecular genetic labeling of genes and electrophoresis of protein gliadin fractions for detection of 1AL.1RS and 1BL.1RS wheat-rye translocations. **Methods.** PCR analysis of wheat DNA, protein electrophoresis in polyacrylamide gels. **Results.** Wheat-rye translocations in winter wheat were identified. **Conclusions.** Polymerase chain reaction using specific primers and electrophoresis of protein gliadin fractions are reliable, efficient and complementary methods for identifying wheat-rye translocations.

Key words: winter soft wheat, wheat-rye translocations, PCR-analysis, DNA-markers, electrophoresis of proteins.