

УДК 633.111.1+664.64.014

КОМПЛЕКСНИЙ АНАЛІЗ ВМІСТУ ЗАГАЛЬНОГО БІЛКА В ЗЕРНІ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ, ЯКА МІСТИТЬ ГЕН *GPC-B1* ВІД *TRITICUM TURGIDUM* SSP. *DICOCCOIDES*

С. Ю. ПОХИЛЬКО^{1,2}, В. В. ШВАРТАУ³, В. М. ПОЧИНОК³, Л. М. МИХАЛЬСЬКА³, О. М. ДУГАН², Б. В. МОРГУН¹⁻³

¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148
e-mail: molgen@icbge.org.ua

² Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
Україна, 03056, м. Київ, пр. Перемоги, 37

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

Мета. Метою дослідження було достовірне визначення вмісту загального білка в зерні покоління *F₅*, носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* двома методами, що в свою чергу б підтвердило успішну експресію даного гена в генетичному оточенні української м'якої озимої пшениці. **Методи.** Визначення вмісту білка проводили методом К'ельдаля та методом інфрачервоної спектроскопії (NIR). **Результати.** Проаналізовано 44 гібридні лінії, гомозиготні за геном *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*. Встановлено, що для обох методик «в середньому» вміст білка у зерні гібридних ліній спостерігається на 14 % вище у порівнянні з вихідним сортом Куяльник. Особливу увагу привертають лінії № 10, № 12 і № 35, у яких вміст білка перевищує 15 % за методом К'ельдаля. **Висновки.** Вперше отримані результати свідчать, що перенесений ген *Gpc-B1* з дикої полби в нове генетичне оточення українського високопродуктивного районowanego сорту пшениці Куяльник функціонує, позитивно впливаючи на накопичення запасного білка в зернівках.

Ключові слова: біофортифікація, вміст білка, *Triticum aestivum*, ген *Gpc-B1*, методи К'ельдаля та NIR.

Вступ. Пшениця є однією з найважливіших зернових культур в усьому світі, для споживання у їжу, на корм, різноманітної промислової переробки. Вона є основним джерелом енергії, білка і харчових волокон у раціоні людини. Пшениця забезпечує приблизно одну п'яту від загального калорійного внеску населення всього світу. На даний момент, близько 95 % пшениці, яка вирощується в світі, це гексаплоїдна м'яка пшениця (*Triticum aestivum*), інші 5 % складає тетраплоїдна тверда пшениця (*Triticum durum*) [1].

Багатофункціональність та незамінність пшеничного борошна зумовлена особливістю структурного складу білків та їх кількістю. Білковий комплекс пшениці складається з гліадинів, глютенінів, альбумінів і глобулінів. Найбільше у пшеничному зерні представлені запасуючі білки гліадини і глютеніни, які складають 80–85 % від загального вмісту Альбуміни і глобуліни — це структурні і ферментні білки алейронного шару і зародку [2]. Запасуючі білки несуть основне функціональне навантаження щодо їх впливу на якість клейковини. Глютеніни здатні до полімеризації шляхом утворення інтермолекулярних -S-S-зв'язків, які формують макромолекулярний каркас клейковини і відповідають за еластичність та пружність тіста [3]. Гліадини суттєво впливають на фізичні показники тіста, такі як його в'язкість і, особливо, розтяжність [4].

Вміст білка є важливою характеристикою оцінки якості зерна, яке нормується ДСТУ 3768:2010 [5]. Відповідно до державного стандарту пшениця 1-го класу повинна містити білка в зерні не менше 14 %, а 2-го класу — не менше 12,5 %.

Проте в останні десятиріччя, на противагу зростанню врожайності, якість зерна погіршується, включаючи показник вмісту білка [6].

Накопичення запасного білка у зерні обумовлюється факторами навколишнього середовища і комплексом генів, які регулюють цю характеристику [7].

Разом з тим, не так давно у полбі *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* було відкрито ген *Gpc-B1*, розташований на короткому плечі хромосоми 6В [8], що обумовлює підвищене запасання білка у зернівах тетраплоїдної північноамериканської пшениці за різних кліматичних умов [9].

Цей локус, будучи пов'язаним з фізіологічним старіння листя, зумовлює перенесення поживних речовин у зернівку, підвищуючи, у такий спосіб, концентрацію у зерні пшениці важливих макро- та мікроелементів. Ефект даного гена було ретельно вивчено та показано суттєве збільшення в зерні, у порівнянні з вихідною формою, вмісту цинку (60 мг/кг проти 47,5 мг/кг), заліза (44,2 мг/кг проти 35,9 мг/кг), марганцю (53,9 мг/кг проти 40,9 мг/кг) та білка (14,4 % проти 10,8 %) [10, 11]. Таким чином, ген *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* шляхом чисельних схрещувань, проведених в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України, був перенесений в озиму гексаплоїдну пшеницю районаного сорту Куяльник [12]. Разом з тим, прояв цільового гена в новому генетичному оточенні залишається під великим питанням і потребує чіткого з'ясування.

Метою даної роботи було визначити вміст загального білка в зерні покоління F_5 , носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, методом інфрачервоної спектроскопії (NIR) та методом К'ельдаля, для доведення експресії даного гена у новому генетичному оточенні виробничого сорту м'якої озимої пшениці *Triticum aestivum* L.

Матеріали і методи

Матеріалом у досліджах слугували гібридні лінії покоління F_5 , носії гена *Gpc-B1* від дикої полби *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. Контролями виступали материнський сорт Куяльник і яра гексаплоїдна лінія Glupro — донор гена *Gpc-B1* (люб'язно надана prof. Jorge Dubcovsky, University of California, USA).

Вимірювання вмісту загального білка проводили послідовно двома сучасними загальноприйнятими підходами — методом інфрачервоної спектроскопії (NIR) [13] та методом К'ельдаля [14].

Визначення загального азоту проводили методом К'ельдаля, який складався з трьох етапів — мінералізації, нейтралізації і титрування. Відбиралася наважка зерна 0,8000 г, переносилася у пробірку, додавалось 2 таблетки Kjeltabs SK і 15 мл концентрованої сірчаної кислоти. Процес мінералізації проходив на приладі InKjel D-40599 протягом 90 хв. Для наступного етапу, відгонки аміаку, в пробірку автоматично додавався бідистилат і 40 % NaOH. Відігнаний аміак поглинався борною кислотою концентрацією 4 %. Нагрівання і відгонка аміаку тривала 5 хв. Процес проходив автоматично на приладі *Kjeldahl digester SR3i* (Behr Labor-Technik GmbH, Germany). Третій етап — титрування, проводили на цифровому титраторі TitroLine (SI Analytics, Germany). Процес титрування проводився 0,1 N H_2SO_4 і тривав до зниження pH до 4,8. Результат дозволяє оцінити кількість загального азоту в пробі, для переведення якого у кількість загального білка використовували коефіцієнт переведення для пшениці рівний 5,7 згідно ГОСТ 10846-91 [14]. Даним методом було проаналізовано 44 лінії, носії гена *Gpc-B1* та, в якості контролів, дві батьківські форми — материнський сорт Куяльник і лінію-донор Glupro.

Метод інфрачервоної спектроскопії (NIR) оснований на відбитті у ближньому інфрачервоному випромінюванні діапазону хвиль довжинами 500–2300 нм і наступному порівнянні отриманого спектру з результатами бази даних калібрувань. Зразок зерна вагою 50 г попередньо розмелювали на лабораторному млині Perten LM 3100. Отримане борошно аналізували на вміст загального білка на інфрачервоному спектрометрі Inframatic 8600 (Perten, Sweden). Даним методом було проаналізовано 16 ліній носіїв гена *Gpc-B1* та в якості контролів дві батьківські форми [13].

Статистичний аналіз даних проводили по t-критерію Стьюдента при порівнянні середніх величин, що використовується для перевірки рівності середніх значень у двох вибірках [15].

Результати та обговорення

Визначення вмісту білка проводили в поколінні F_5 , усі лінії якого були попередньо перевірені на наявність гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. У цілому було відібрано 44 лінії, гомозиготні за цільовим геном. Подальші дослідження проводилися саме з ними.

Рівень накопиченого білка у зернівах пшениці вимірювався методом К'ельдаля згідно

ГОСТ 10846-91. Встановлено, що з 44 ліній: 12-ть мали загальний вміст білка вище 14 %; 30-ть ліній — вище 12,5 %; і 2-і лінії — вище 12 %. Максимально високий вміст білка виявлено у лінії № 10 — 16,18 %, а мінімальний — у лінії № 17 — 12,14 %. В середньому спостерігався приріст на 14 %, відносно материнського сорту Куяльник. При цьому вміст білка у материнського сорту Куяльник становив 11,85 %, а у батьківської лінії

Glupro — 15,84 %. Хоча лінія Glupro і характеризується високим вмістом білка, проте на протипагу сорту Куяльник не вирізняється за екстер'єром, є маловрожайною і низькорослою, тобто не є перспективною для промислового вирощування. Підсумок визначення білка методом К'ельдаля у гібридних лініях і порівняння із значеннями батьківських форм наведено у вигляді стовпчастої діаграми на рис. 1.

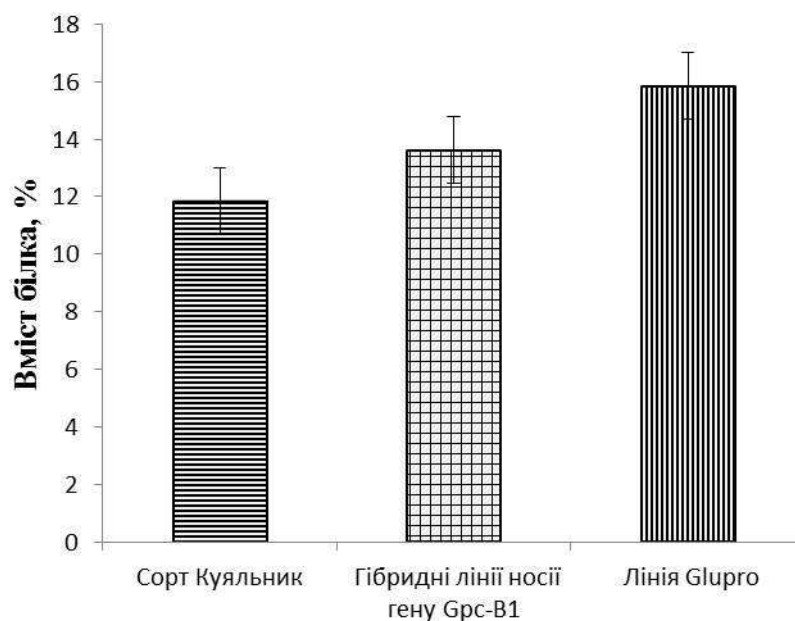


Рисунок 1. Порівняльні результати вимірювання вмісту білка методом К'ельдаля

ДСТУ 4117:2007 регламентує сучасні експрес методики оцінки якісних показників зерна, однією з яких є визначення масової частки білка. Даний підхід базується на інфрачервоній спектроскопії (NIR). Зазначена методика є менш точна у порівнянні з методом К'ельдаля, але має низку переваг, таких як швидкість проведення, простота здійснення, відсутність необхідності реактивів і малі витрати трудових ресурсів.

Серед проаналізованих 16 ліній, найбільш цінних за агрономічними показниками, масова частка білка склала від 14,23 % до 16,81 %. У

сорту Куяльник вміст білка становив 13,49 %. У лінії Glupro масова частка білка була рівна 16,90 %. Найбільший вміст білка серед гібридних ліній спостерігався у № 7 і склав 16,81 %. Найменший вміст білка спостерігався у № 21 і склав 14,23 %, що значно більше ніж у вихідного материнського сорту. В середньому серед гібридних ліній спостерігається приріст білка на 13,93 % у порівнянні з вихідним сортом Куяльник. Стовпчаста діаграма на рис. 2 дозволяє наглядно порівняти отримані методом NIR значення вмісту білка у гібридних лініях і вихідних батьківських формах.

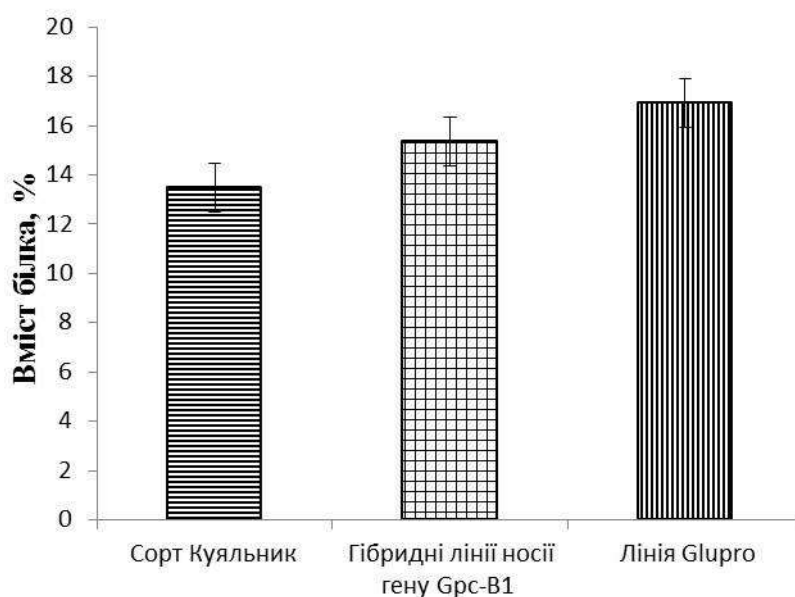


Рисунок 2. Порівняльні результати визначення вмісту білка методом NIR

Дані аналізів, зібрані двома методами, є цілком співставними і чітко вказують на те, що гібридні лінії, носії гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, мають підвищений вміст загального білка у зерні. В середньому цей показник на 14 % (1,8 одиниці) вище ніж у материнського сорту Куяльник. Зібрані дані з двох методів аналізу наведені у табл. 1. Особливу увагу хотілося б звернути на показники лінії № 44. За обома вимірами (14,93 та 15,93) вона має вміст білка вище

середнього по лініям, що чітко свідчить про його достовірну генетичну обумовленість.

Підвищений вміст білка, який визначали методом сканування у NIR, у порівнянні з визначенням за методом К'ельдаля, може бути обумовлений особливостями матриці досліджуваних ліній. Тому, метод сканування у NIR доцільно використовувати лише для попереднього експрес-аналізу даних зразків. Необхідно зазначити, що класичним та арбітражним методом визначення загального білка та загального азоту є метод К'ельдаля.

Табл. 1. Порівняльна підсумкова таблиця результатів

| Лінія | Визначення білка методом К'ельдаля, % | Визначення білка методом NIR, % |
|-------|---------------------------------------|---------------------------------|
| 1 | 13,97 | - |
| 2 | 13,68 | 15,89 |
| 5 | 12,83 | - |
| 7 | 13,40 | 16,81 |
| 8 | 12,31 | - |
| 9 | 13,85 | 15,64 |
| 10 | 16,18 | - |
| 11 | 14,76 | - |
| 12 | 15,11 | - |
| 14 | 13,45 | - |
| 15 | 12,94 | - |
| 17 | 12,14 | - |

| Лінія | Визначення білка методом К'ельдаля, % | Визначення білка методом NIR, % |
|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| 18 | 12,94 | - |
| 19 | 13,85 | 14,70 |
| 20 | 13,00 | - |
| 21 | 12,88 | 14,23 |
| 30 | 13,45 | - |
| 35 | 15,05 | - |
| 36 | 14,82 | - |
| 38 | 12,54 | 14,56 |
| 39 | 13,68 | 15,24 |
| 40 | 14,48 | 15,36 |
| 41 | 13,00 | 15,14 |
| 42 | 14,25 | 15,49 |
| 44 | 14,93 | 15,93 |
| 45 | 14,59 | - |
| 46 | 13,57 | - |
| 49 | 13,11 | - |
| 50 | 13,57 | - |
| 51 | 13,11 | - |
| 56 | 12,71 | - |
| 58 | 14,25 | - |
| 60 | 14,82 | - |
| 62 | 13,62 | - |
| 64 | 13,91 | 15,67 |
| 66 | 13,51 | 15,66 |
| 67 | 13,11 | - |
| 68 | 12,77 | - |
| 75 | 13,74 | 15,32 |
| 76 | 14,31 | - |
| 80 | 13,05 | 14,86 |
| 81 | 13,40 | - |
| 84 | 13,11 | - |
| 86 | 12,71 | 15,45 |
| Середнє по лініям | 13,65 | 15,37 |
| Сорт Куяльник | 11,85 | 13,49 |
| Лінія-донор Glupro | 15,84 | 16,90 |

Примітка: «-» — зразки не аналізувалися за даним показником

Статистична обробка даних проводилася по t-критерію Стьюдента і засвідчила достовірність отриманих даних для дослідних вибірок. Так у даному випадку t-критерій склав 6,92 з вірогідністю $p \leq 0,05$ при рівні значущості $\alpha = 0,05$. Число ступенів свободи для вибірок склало 62, що було значно більше критичного значення, яке для цього числа ступенів свободи було рівним 1,999.

Висновки

Комплексний аналіз зерна гібридних ліній F₅ м'якої озимої пшениці, носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, методом К'ельдаля та методом інфрачервоної спектроскопії є важливим для об'єктивної оцінки вмісту загального білка. Статистична обробка за критерієм

Стьюдента даних обох методик, підтверджує достовірність результатів і їх чітку кореляцію. Сукупний аналіз свідчить, що в середньому вміст білка у зерні гібридних ліній підвищується на 14 % у порівнянні з вихідним сортом Куяльник. Особливу увагу потрібно звернути на лінії № 10, № 12 і № 35, у яких загальний білок перевищує 15 % по методу К'ельдаля. Вперше отримані результати доводять, що перенесений ген *Gpc-B1* з дикої полби *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в нове генетичне оточення високопродуктивного українського сорту Куяльник, функціонує, позитивно впливаючи на накопичення загального білка в зерні м'якої гексаплоїдної озимої пшениці. Гібридні лінії, які досліджувалися, є цінним генетичним матеріалом для подальших селекційних

робіт і виведення нових високобілкових високоякісних сортів вітчизняної пшениці.

Подяки. Це дослідження було підтримано Національною академією наук України, в рамках проекту: «Розробка систем генотипування та маркування цінних біологічних ознак сільськогосподарських культур». Номер Держреєстрації 0116 U 000173.

Перелік літератури

1. Zilic S. Characterization of proteins from grain of different bread and durum wheat genotypes / S. Zilic, M. Barac, M. Pesic *et al.* // *Int. J. Mol. Sci.* — 2011. — № 12. — P. 5878–5894.
2. Тарасюк О. І. Вміст у листках азоту та продуктивність ліній озимої м'якої пшениці, унікальних за хлібопекарськими властивостями / О. І. Тарасюк, В. М. Починок // *Физиология растений и генетика.* — 2015. — Т. 47, № 1. — С. 66–73.
3. Атабаева Х. Н. Биология зерновых культур / Атабаева Х. Н., Массино И. В. — Ташкент : Гос. науч. изд. «Узбекистон миллий энциклопедияси», 2005. — С. 204.
4. Kasarda D. D. Wheat proteins / Kasarda D. D., Bernardin J. E., Nimmo C. C. — *Advances in Cereal Science and Technology.* (Y. Pomeranz, ed.) Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, Minnesota, USA, 1976. — P. 158–236.
5. ДСТУ 3768–2010. Пшениця. Технічні умови. — Держспоживстандарт України. — 2010. — С. 14.
6. Полянецька І. О. Вміст білка та його вихід з урожаєм зерна пшениці озимої залежно від сорту / І. О. Полянецька, В. В. Любич, О. Г. Сухомуд // *Наукові праці інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків.* — 2014. — Випуск 21. — С. 235–239.
7. Simmonds N. The relation between yield and protein in cereal grain // *Journal of the Science of Food and Agriculture.* — 1995. — V. 67. — P. 309–315.
8. Olmos S. Precise mapping of a locus affecting grain protein content in durum wheat / Olmos S., Distelfeld A., Chicaiza O., Schlatter A. R., Fahima T., Echenique V., Dubcovsky J. // *Theoretical and Applied Genetics.* — 2003. — V. 107. — P. 1243–1251.
9. Joppa L. R. Mapping gene(s) for grain protein in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) using a population of recombinant inbred chromosome lines / Joppa L. R., Du C., Hart G. E., Hareland G. A. // *Crop Science.* — 1997. — V. 37. — P. 1586–1589.
10. Uauy C. The high grain protein content gene *Gpc-B1* accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat / Uauy C., Brevis J. C., Dubcovsky J. // *J. Exp. Bot.* — 2006. — V. 57. — P. 2785–2794.
11. Tabbita F. Effects of the *Gpc-B1* locus on high grain protein content introgressed into Argentinean wheat germplasm / Tabbita F., Lewis S., Vouilloz J., Ortega M., Kade M., Abbate P., Barneix A. J. // *Plant Breeding.* — 2013. — V. 132. — P. 48–52.
12. Похилько С. Ю. Дослідження генотипів пшениці м'якої з перенесеним геном *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* / С. Ю. Похилько, А. В. Трояновська, А. І. Степаненко, Б. В. Моргун // *Фактори експериментальної еволюції організмів.* — 2016. — Т. 18. — С. 132–135.

13. ГОСТ 10846-91 Зерно и продукты его переработки. Метод определения белка. — Межгосударственный стандарт — 2009. — С. 8.

14. ДСТУ 4117:2007 Зерно та продукти його переробки. Визначення показників якості методом інфрачервоної спектроскопії. — Держспоживстандарт України. — 2007. — С. 8.

15. Student T. The probable error of a mean // *Biometrika.* 1908. — № 6 (1). — P. 1–25. Точка доступу <https://www.york.ac.uk/depts/maths/histstat/student.pdf>

Представлено І. А. Козерецька
Надійшла 01.03.2017

COMPLEX ANALYSIS OF TOTAL PROTEIN CONTENT IN BREAD WHEAT CONTAINING *GPC-B1* GENE FROM *TRITICUM TURGIDUM* SSP. *DICOCCOIDES*

S. Yu. Pokhylko^{1,2}, V. V. Schwartau³, V. M. Pochinok³, I. M. Mykhalska³, O. M. Dugar², B. V. Morgun¹⁻³

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering National Academy of Sciences of Ukraine Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 148 e-mail: molgen@icbge.org.ua

² National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute», Ukraine, 03056, Kyiv, Peromohy ave., 37

³ Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17

Aim. The purpose of our study was to determine the content of total protein in the F₅ generation grains, the carriers of the *Gpc-B1* gene from *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* by two methods, which in turn would confirm the successful expression of the *Gpc-B1* gene in the genetic environment of bread winter wheat. **Methods.** Determination of protein content was carried out by Kjeldahl method and by infrared spectrometry (NIR) method. **Results.** The 44 hybrid lines that are homozygous for the *Gpc-B1* gene from *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* have been analyzed. It has been established that for both methods, the average content of protein in the grain of hybrid lines is 14 % higher in comparison to the original Kuyalnik variety. Particular attention should be paid to the line number 10, 12 and 35 in which the content of protein exceeds 15 % by the method of Kjeldahl. **Conclusions.** The obtained results indicate that the gene *Gpc-B1* from the wild relative in the new genetic environment of the highly productive registered wheat cultivar Kuyalnik has been functioning and has a positive effect on the accumulation of total protein in grains.

Keywords: biofortification, protein content, *Triticum aestivum*, *Gpc-B1* gene, Kjeldahl and NIR methods.