

**Б.В. Моргун, А.І. Степаненко, О.В. Степаненко,
М.О. Банникова, А.В. Голубенко, І.О. Нітовська,
П.Д. Майстров, Д.М. Гродзинський**

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ

ВПРОВАДЖЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ СИСТЕМ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ВИСОКОПРОДУКТИВНИХ СПЕЦІАЛІЗОВАНИХ СОРТІВ



Впроваджено молекулярні системи визначення генетичного поліморфізму для 100 сортів озимої пшениці: проведено скринінг наявності цінних алелів на основі полімеразних ланцюгових реакцій; з'ясовано рівень поширення алелів низької та середньої активності поліфенолоксидазних ферментів та проведено валідування. Виявлено сорти пшениці з житніми транслокаціями 1AL.1RS, 1BL.1RS, рецесивним алелем гена *Tamyb10*, геном стійкості до септоріозу *Stb4*, зчепленим з поліморфним локусом *Xgwm111*. Визначено сорт ваксі-пшениці та сорти-носії нетипового функціонального алелю *Wx-B1e*. Складено характеристику 100 елітних та перспективних сортів пшениці за наявністю цінних алелів генів, які детермінують якісні ознаки зерна (гени *PPO*, *Tamyb10-A1*, *Wx*) та стійкість до біотичних та абіотичних стресових факторів (житній транслокативний матеріал, *Tamyb10-A1*, *Stb4*).

Ключові слова: пшениця, алель, праймер, якісні характеристики зерна, полімеразна ланцюгова реакція.

Однією з глобальних проблем сьогодення є питання поліпшення якості зерна пшениці. Пшениця м'яка (*Triticum aestivum* L.) — одна з найважливіших продовольчих зернових культур, яка займає перше місце за посівними площами та становить основу харчового раціону населення багатьох країн світу, в тому числі України. Розвиток сільського господарства і виробництво продуктів харчування вимагають створення стійких до стресів та хвороб сортів рослин та водночас високопродуктивних і здатних давати стабільно якісне збіжжя. Особливо це актуально для України, яка заявляє про себе на світовому ринку постійним зростанням об'єму експортованого зерна.

Ключовим моментом, який прискорює отримання нових сортів пшениці, є пошук генів стійкості як у сучасних, так і в старих сортах пшениці, а також у віддалених видах та гібридах. Не менш важливим є використання молекулярно-генетичних підходів для ідентифікації цінних генотипів та проведення скринінгу перенесення генів під час проведення селекційних схрещувань. У зв'язку з цим метою даної роботи є впровадження системи молекулярного визначення ступеня генетичного поліморфізму сортів пшениці та проведення молекулярно-генетичного аналізу селекційного і сортового матеріалу насіння озимої пшениці з різних селекційних центрів України і зарубіжної селекції (див. табл. 1).

Наявність генетичного поліморфізму послідовностей, які детермінують якісні характе-

ристики зерна та стійкість до біотичних стресових факторів навколишнього середовища. Завдання вдосконалення ефективних маркерних систем до генів, які детермінують якісні показники зерна пшениці та стійкість до стресових факторів зовнішнього середовища вирішується в процесі проведення молекулярно-генетичного аналізу.

1. ГЕНИ ПШЕНИЦІ, ЯКІ ДЕТЕРМІНУЮТЬ ЯКІСНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЗЕРНА ТА СТІЙКІСТЬ ДО СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ ПШЕНИЦІ

Селекційна цінність сортів м'якої пшениці, які містять пшенично-житню транслокацію 1BL.1RS та транслокацію 1AL.1RS, зумовлена стійкістю до абіотичних та біотичних чинників [1–4]. Сорти пшениці з транслокацією

Таблиця 1

Перелік наданих для аналізу сортів пшениці

Походження	Сорти
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, м. Київ	Нива Київщини, Подолянка, Фаворитка, Володарка, Новокиївська, Ятрань 60, Київська остиста, Солоха, Чорнява, Сотниця, Полянка, Борія, Гілея, Золото України, Здобуток, Прездівлиця, Доброслава, Новосмуглянка, Соломія, Щедрівка Київська
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України і Миронівський інститут пшениці ім. В.М. Ремесла НААН України, м. Миронівка	Переяславка, Сонечко, Наталка, Пивна, Ласуня, Крижинка, Веснянка, Богдана, Колумбія, Золотоколоса, Смуглянка, Славна, Спасівка
Миронівський інститут пшениці ім. В.М. Ремесла НААН України, м. Миронівка	Миронівська 808, Миронівська 30, Миронівська 61, Миронівська 65, Українська 246
ННЦ «Інститут землеробства» НААН України, м. Київ	Поліська 90
Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України, м. Харків	Досконала, Статна
Селекційно-генетичний інститут — Національний центр насіннезнавства та сортовивчення НААН України, м. Одеса	Антонівка, Господина, Дальницька, Єдність, Заграва, Звитяга, Істина, Княгиня Ольга, Косовиця, Литанівка, Місія, Нива Одеська, Служниця, Чорноброва, Лебідка од., Ластівка од., Писанка, Пошана, Годувальниця, Ужинок, Білява, Куяльник, Одеська 51, Альбатрос од., Одеська 267, Ніконія, Селянка, Зорепад, Лановий, Кірія, Дюк, Небокрай, Ліона, Доброчин, Гурт, Красень, Турунчук, Бунчук, Польовик, Отаман
Селекційно-генетичний інститут — Національний центр насіннезнавства та сортовивчення НААН України, м. Одеса	Ватажок, Зміна, Подяка, Борвій, Жайвір, Супутниця, Запорука, Хист, Пилипівка, Соната, Гармонія, Софійка, Доброчинна, Ліра
Білоцерківська дослідно-селекційна станція ім. О.К. Коломієць Інституту цукрових буряків НААН України, м. Біла Церква	Білоцерківська н/к
Донецький інститут агропромислового виробництва НААН України, м. Донецьк	Донецька 46, Донецька 48
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України та Фермерське господарство «Теософ», с. Розношенське, Ульяновський район, Кіровоградська область	Трипільська
Краснодарський науково-дослідний інститут сільськогосподарства ім. П.П. Лукьяненко, м. Краснодар, РФ	Безоста 1

1BL.1RS зазвичай містять гени, що контролюють стійкість до таких грибних патогенів, як буря іржа (*Lr26*), стеблова іржа (*Sr31*), жовта іржа (*Yr9*), борошніста роса (*Pm8*) [5, 2, 6] та інші гени стійкості до хвороб та шкідників [7]. Транслокація 1AL.1RS набула поширення серед комерційних сортів завдяки присутності генів стійкості до біотипів попелиці (*Gb2*, *Gb6*), борошністої роси (*Pm17*), кліща [8]. Рослини пшениці з житньою транслокацією більш посухостійкі, з підвищеною адаптаційною здатністю, вищою врожайністю, вмістом білка в зерні [9, 10]. Прояв генів, локалізованих у короткому плечі 1RS жита, залежить від генотипу сортів пшениці [11, 12].

Білки секаліни мають виражений негативний вплив на якість борошна [13]. Для ідентифікації житньої 1R-хромосоми або її короткого плеча 1RS у складі пшенично-житніх транслокацій у сортів, ліній пшениці використовують біохімічні, молекулярно-біологічні, цитогенетичні, молекулярно-генетичні методи [11, 14–16].

Якість зерна пшениці характеризується рівнем активності поліфенолоксидазних ферментів (ПФО), які призводять до небажаного потемніння виробів з пшеничного борошна [17–21]. Пшениця містить багато паралогічних генів *PPO*, які представлені мультигенною родиною, розміщуються у різних місцях і виникли шляхом дуплікації і подальших мутацій [22–24, 5]. Активність поліфенолоксидази визначається, головним чином, алелями *PPO*, що знаходяться у хромосомах 2-ї гомеологічної групи геномів пшениці А і D [25–28]. Крім того, була ідентифікована родина генів, що складається з генів *Ppo-A2*, *Ppo-B2* та *Ppo-D2*, які також впливають на рівень активності ПФО [29]. Для визначення активності *PPO*-генів ефективними виявилися STS (Sequence Tagged Site)-маркери [30, 31]. Алельний поліморфізм генів *Ppo-A2*, *Ppo-B2* та *Ppo-D2* виявляється за допомогою систем молекулярних маркерів, основаних на полімеразних ланцюгових реакціях (ПЛР) [32].

Стійкість до проростання зерен у колосі (ПЗК) є також важливим якісним показником сорту. Червонозерні сорти пшениці, як прави-

ло, більш стійкі до ПЗК, ніж білозерні. Ця асоціація між стійкістю до ПЗК і червоною пігментацією зерна швидше за все спричинена плейотропними ефектами генів, які контролюють колір зерна [33–35]. Забарвлення зерна пшениці контролюється генами *R-1* (гени *Tamyb10*), які є транскрипційними факторами, що регулюють біосинтез флавоноїдів. Один або більше домінуючих алелей *R-A1a*, *R-B1a*, та/або *R-D1a* надають зерну червону пігментацію [36, 37]. Контроль алельного стану генів *Tamyb10* у червонозерних сортах дозволить прогнозувати їх стійкість до ПЗК.

Важливим для збереження врожаю пшениці є її стійкість до грибних захворювань, зокрема до септоріозу. Гени стійкості до септоріозу (за *Біфом*) отримали назву *Stb* [38]. У 2004 р. розпочалася робота щодо картування гена *Stb4*. Було картовано сім локусів *Stb* на різних хромосомах [39–41]. Молекулярні системи для аналізу генів *Stb* і зокрема гена *Stb4* будуть корисними у відборі цінних генотипів, стійких до септоріозу.

Зміна структури крохмалю є одним із перспективних напрямів селекції зернових та поділяється на два принципово відмінних підходи: збільшення кількості амілози та збільшення кількості амілопектину [42]. Головним ферментом біосинтезу амілози є асоційована з гранулами синтазу крохмалю GBSS I з молекулярною масою близько 60 кДа, яка має назву *Wx*-протеїн. У геномі м'якої пшениці три гомеологічні гени кодують ізоформи ферменту GBSS I: *Wx-A1*, *Wx-B1* і *Wx-D1*, які розташовані у плечах хромосом 7AS, 4AL і 7DS відповідно [43]. У пшениці кожен з генів *Wx* має декілька алелів. Пшениця, у якої поєднання трьох неактивних алелів призводить до повного блокування синтезу фермента GBSS I та відповідно амілози, називається ваксі (*Wx*). Сорти з кількома нуль-алелями, які мають дещо знижений синтез амілози, називаються частково ваксі (partial *Waxy*) [44]. Нуль-алелі генів *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* викликають нерівномірний вплив на рівень синтезу амілози. Найбільш суттєве зниження показує нуль-алель гена *Wx-B1* [45]. Співвідношення

амілоза/амілопектин у пшеничному крохмалі має надзвичайно важливе значення для технологічних властивостей крохмалю та борошна пшениці: ваксі-борошно характеризується вищими показниками газотворення та підйомної сили тіста [13, 46]. Додавання борошна з пшениці ваксі до звичайного хлібопекарського борошна суттєво підвищує якість хліба [13]. Зерно Wх-культур — ефективна сировина для одержання етанолу завдяки кращій доступності крохмалю для ензимів і, відповідно, зниження витрат енергії та прискорення процесу ферментації [47].

2. ПРОТОКОЛ ДЕТЕКЦІЇ ГЕНІВ, ЯКІ ДЕТЕРМІНУЮТЬ ЯКІСНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЗЕРНА ТА СТІЙКІСТЬ ПШЕНИЦІ

Для розробки молекулярно-генетичних підходів з метою впровадження у селекційний процес нами було обрано ряд праймерів ПЛР для компонентів, які обумовлюють вибіркоче детектування цільових алелів генів (табл. 2).

В цілому було виділено загальну ДНК, спектрофотометрично виміряно концентрацію очищеної ДНК, нормалізовано концентрацію до 30 нг/мкл, проведено електрофорез загальної ДНК у агарозному гелі. Контроль якості виділеної ДНК проводився на референтні гени одночасно з реакцією на цільові гени у складі мультиплексних ПЛР.

Виділення та очистку загальної ДНК проводили з паростків та сухого матеріалу пшениці за загальноприйнятою методикою [47]. Для перевірки наявності загальної рослинної ДНК після процедури виділення застосовували метод електрофорезу нуклеїнових кислот в агарозному гелі. Для визначення розмірів фрагментів ДНК в агарозному гелі їх порівнювали з маркером, який містив лінійні фрагменти ДНК відомої довжини і кількості. Як маркер молекулярної маси використовували λ /HindIII (Thermo Scientific) з розміром ампліконів, п.н.: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125, який вносився у лунку геля в кількості 400 нг.

Вимірювання концентрації загальної ДНК проводили за допомогою компактного спект-

рофотометра BioPhotometer Plus (Eppendorf) при довжині хвилі 260 нм. Чистоту виділеної ДНК оцінювали за співвідношенням поглинання при довжинах хвиль 230, 260, 280 та 320 нм. Стандартизацію зразків, відповідно до вимірних концентрацій, проводили шляхом розведення препаратів ДНК до 30 нг/мкл.

Для оптимізації ряду реакцій використовували техніку нисхідної та градієнтної ПЛР.

Для швидкої та надійної детекції досліджуваних генів або генетичних послідовностей, які детермінують якісні характеристики зерна та стійкість до біотичних та абіотичних стресових факторів, було розроблено і оптимізовано методики проведення уніплексних та мультиплексних полімеразних ланцюгових реакцій (табл. 3). Методика мультиплексного визначення передбачає синтез в одній пробірці декількох ділянок ДНК, обмежених декількома різними парами праймерів. Для гена або цільової ділянки ДНК підбирають пари праймерів, за допомогою яких проводять ампліфікацію необхідних ділянок характерної довжини для чіткої ідентифікації.

Реакційні суміші включали: специфічні праймери (Metabion) (табл. 2), по 2 мкл буфера для ПЛР 10xDreamTaq™ Green Buffer (Thermo Scientific), по 0,2 мМ кожного дезоксирибонуклеозид-3-фосфату (Thermo Scientific), 0,5 од. полімерази DreamTaq™ DNA Polymerase (Thermo Scientific), 30 нг сумарної ДНК, деіонізовану воду Milli-Q до кінцевого об'єму 20 мкл.

Програми ампліфікацій були такими:

1. Мультиплексна ПЛР для виявлення типу пшенично-житньої транслокації з використанням гена *TaTM20* як референтного: початкова денатурація 3 хв при 94 °С, 34 цикли денатурація 30 с при 94 °С, ренатурація 30 с при 60 °С, елонгація 1 хв при 72 °С, фінальна елонгація 5 хв при 72 °С.

2. Мультиплексна ПЛР для виявлення пшенично-житньої транслокації 1AL.1RS з використанням гена *actin* як референтного: початкова денатурація 3 хв при 94 °С, 34 цикли — денатурація 30 с при 94 °С, ренатурація 30 с

Перелік праймерів, що використовувалися в дослідженні

№ пари	Нуклеотидна послідовність	Довжина фрагмента, який ампліфікується, п.н.	Призначення, специфічність
Референтні гени пшениці			
1	5'-GAGGGATACACGCTTCCTCA-3' 5'-GAAAGTGCTAAGAGAGGCCAAA-3' [36]	547	<i>actin</i> – кодує пшеничний білок актин
2	5'-AAGGGTTGCTCCTCTTCGCGATCT-TG-3' 5'-GTACATGCCAGCACCGTATGGATTG-3' [10]	934	<i>TaLM20</i> – ген білка-транспортера іонів металів пшениці
Пшенично-житні транслокації			
3	5'-TGACAACCCCTTTCCCTCGT-3' 5'-TCATCGACGCTAAGGAGGACCC-3' [52]	226 – <i>1AL.1RS</i> 202 – <i>1BL.1RS</i>	<i>SCM9</i> – визначення типу транслокації
4	5'-AACGAGGGGTTTCGAGGCC-3' 5'-GAGTGTCAAACCCAACGA-3' [51]	233, 338 – <i>1AL.1RS</i>	Жито – специфічні повтори <i>RT73</i> , визначення <i>1AL.1RS</i>
<i>Ppo-A1</i> та <i>Ppo-D1</i>			
5	5'-CCAGATACACAACCTGCTGGC-3' 5'-TGATCTTGAGTTCTCGTCG-3' [31]	290 – <i>Ppo-A1a</i> 481 – <i>Ppo-A1b</i>	Визначення алелів гена <i>Ppo-A1</i>
6	5'-TGAAGCTGCCGGTCATCTAC-3' 5'-AAGTTGCCCATGTCCTCGCC-3' [31]	490 – <i>Ppo-D1b</i>	Визначення алелів гена <i>Ppo-D1</i>
<i>Tamyb10-A1</i>			
7	5'-CTATGTGGATGGCCTTGGAT-3' 5'-CTACCAGCTCGTTTGGGAAG-3' [36]	665 – <i>R-A1b</i>	Визначення алелю <i>R-A1b</i> (набір 1)
8	5'-TTTCAATCGAGTGGGCATAA-3' 5'-CCTGACGATGAGCTCCTCTT-3' [36]	536 – <i>R-A1a</i>	Визначення алелю <i>R-A1a</i> (набір 2)
<i>Stb4</i>			
9	5'-TCTGTAGGCTCTCTCCGACTG-3' 5'-ACCTGATCAGATCCCCTCG-3' [39]	210 – стійкі форми	Наявність локусу <i>Xgwm111</i>
<i>Wx</i>			
10	5'-CCCCAAAGCAAAGCAGGAAAC-3' 5'-CGGCGTCGGG TCCATAGATC-3' [53]	Після гідролізу рестриктазою HindIII 495+176 – <i>Wx-A1a</i> 652 – <i>Wx-A1b</i>	Визначення алелів гена <i>Wx-A1</i>
11	5'-CTGGCCTGCTACCTCAAGAGCAACT-3' 5'-GGTTGCGGTTGGGGTCGATGAC-3' [54; 55]	778 – <i>Wx-B1a</i> 668 – <i>Wx-B1b</i> 804 – <i>Wx-B1e</i>	Визначення алелів <i>Wx-B1a</i> і <i>Wx-B1e</i> (набір 1)
12	5'-GTAGTAAGGTGCAAAAAAGTGCCACG-3' 5'-CAGCCTTATTGTACCAAGACCCATGTGTG-3' [54; 55]		Визначення алелю <i>Wx-B1b</i> (набір 2)
13	5'-GCCGACGTGA AGAAGGTGGTG-3' 5'-CCCCTTGCCT CATTTGTTGTGT-3' [56]	930 – <i>Wx-D1a</i> 342 – <i>Wx-D1b</i>	Визначення алелів гена <i>Wx-D1</i>

Мультиплексні та уніплексні реакції
з вказівкою кінцевої концентрації праймерів у реакції

№ пари	Мета реакції	Гени, які детектуються (концентрація праймерів)
1	Визначення транслокацій 1AL.1RS та 1BL.1RS	<i>SCM9</i> (0,5 мкМ) + <i>TaTM20</i> (0,4 мкМ)
2	Визначення транслокації 1AL.1RS	<i>RT73</i> (0,5 мкМ) + <i>actin</i> (0,25 мкМ)
3	Виявлення алелів гена <i>PPO-A1</i>	<i>PPO-A1</i> (0,5 мкМ) + <i>TaTM20</i> (0,25 мкМ)
4	Виявлення алелів гена <i>PPO-D1</i>	<i>PPO-D1</i> (0,5 мкМ) + <i>TaTM20</i> (0,3 мкМ)
5	Виявлення алелів гена <i>Tamyb10-A1</i> (набір праймерів 1)	<i>Tamyb10-A1</i> (0,5 мкМ) + <i>TaTM20</i> (0,3 мкМ)
6	Виявлення алелів гена <i>Tamyb10-A1</i> (набір праймерів 2)	<i>Tamyb10-A1</i> (0,5 мкМ) + <i>TaTM20</i> (0,15 мкМ)
7	Аналіз локусу <i>Xgwm111</i> , зчепленого з геном стійкості до септоріозу <i>Stb4</i>	<i>Xgwm111</i> (0,5 мкМ)
8	Виявлення алелів гена <i>Wx-A1</i>	<i>Wx-A1</i> (0,5 мкМ) + гідроліз ендонуклеазою HindIII
9	Виявлення алелів гена <i>Wx-B1</i>	<i>Wx-B1</i> (набір 1, 0,75 мкМ) + <i>Wx-B1</i> (набір 2, 0,75 мкМ) + <i>TaTM20</i> (0,5 мкМ)
10	Виявлення алелів гена <i>Wx-D1</i>	<i>Wx-D1</i> (0,5 мкМ)

при 61 °С, елонгація 24 с при 72 °С, фінальна елонгація 5 хв при 72 °С.

3. Мультиплексна ПЛР для виявлення алелів гена *PPO-A1*: початкова денатурація 3 хв при 94 °С, 34 цикли — денатурація 30 с при 94 °С, ренатурація 30 с при 59 °С, елонгація 1 хв при 72 °С, фінальна елонгація 5 хв при 72 °С.

4. Мультиплексна нисхідна (Touchdown) ПЛР для виявлення алелів гена *PPO-D1*: початкова денатурація 3 хв при 94 °С, 8 циклів — денатурація 30 с при 94 °С, ренатурація 30 с при 68 °С (з кожним циклом температура зменшується на 1 °С), елонгація 1 хв при 72 °С та 24 циклів — денатурація 30 с при 94 °С, ренатурація 30 с при 61 °С, елонгація 1 хв при 72 °С, фінальна елонгація 5 хв при 72 °С.

5. Мультиплексна нисхідна (Touchdown) ПЛР для виявлення доміантного алеля гена *Tamyb10-A1* (набір праймерів 1): початкова денатурація 3 хв при 94 °С, 5 циклів — денатурація 30 с при 94 °С, ренатурація 30 с при 67 °С (з кожним циклом температура зменшується на 1 °С), елонгація 43 с при 72 °С та 27 циклів — денатурація 30 с при 94 °С, ренатурація

30 с при 61 °С, елонгація 43 с при 72 °С, фінальна елонгація 5 хв при 72 °С.

6. Мультиплексна ПЛР для виявлення рецесивного алеля гена *Tamyb10-A1* (набір праймерів 2): початкова денатурація 3 хв при 94 °С, 34 цикли — денатурація 30 с при 94 °С, ренатурація 30 с при 56 °С, елонгація 35 с при 72 °С, фінальна елонгація 5 хв при 72 °С.

7. ПЛР для аналізу мікросателітного локусу *Xgwm111*, зчепленого з геном стійкості до септоріозу *Stb4*: початкова денатурація 3 хв при 94 °С, 34 цикли — денатурація 30 с при 94 °С, ренатурація 30 с при 52 °С, елонгація 30 с при 72 °С, фінальна елонгація 5 хв при 72 °С.

8. ПЛР для визначення алелів гена *Wx-A1*: початкова денатурація 3 хв при 94 °С, 34 цикли — денатурація 30 с при 94 °С, ренатурація 30 с при 58 °С, елонгація 40 с при 72 °С, фінальна елонгація 5 хв при 72 °С. Після ампліфікації проводиться гідроліз продуктів реакції ендонуклеазою HindIII.

9. Мультиплексна нисхідна (Touchdown) ПЛР для визначення алелів гена *Wx-B1*: початкова денатурація 3 хв при 94 °С, 6 циклів — денату-

рація 30 с при 94 °С, ренатурація 1 хв при 69 °С (з кожним циклом температура зменшується на 1 °С), елонгація 2 хв при 72 °С та 24 циклів — денатурація 30 с при 94 °С, ренатурація 1 хв при 62 °С, елонгація 2 хв при 72 °С, фінальна елонгація 5 хв при 72 °С.

10. Низхідна (Touchdown) ПЛР для визначення алелів гена *Wx-D1*: початкова денатурація 3 хв при 94 °С, 7 циклів — денатурація 30 с при 94 °С, ренатурація 30 с при 67 °С (з кожним циклом температура зменшується на 1 °С), елонгація 1 хв при 72 °С та 25 циклів — денатурація 30 с при 94 °С, ренатурація 30 с при 60 °С, елонгація 1 хв при 72 °С, фінальна елонгація 5 хв при 72 °С.

Реакції ампліфікації проводили в термоциклерах Arctic Thermal Cycler (Fisher Thermo Scientific) та Mastercycler gradient (Eppendorf). Після проведення ПЛР проводилась рестрикція продуктів ампліфікації послідовності гена *Wx-A1*, для чого готувалась реакційна суміш із продуктів ампліфікації (10 мкл), ендонуклеази рестрикції *HindIII* (7,5 од.) та однократного буфера R (Thermo Scientific, 10 mM Tris-HCl (рН 8,5), 10 mM магнію хлориду, 100 mM калію хлориду, 0,1 мг/мл BSA). Рестрикція тривала 1,5 год при 37 °С. Отримані гідролізовані фрагменти надалі розділяли шляхом горизонтального гель-електрофорезу в агарозному гелі з бромистим етидієм у SB-буфері при напрузі електричного поля 5 В/см. Для визначення розміру продуктів ампліфікації використовували маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix (розмір ампліконів, п.н.: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100). Результати гель-електрофорезу візуалізували за допомогою транслюмінатора ультрафіолетового світла. Бромистий етидій інтеркалює між азотистими основами дуплексу і комплекс флуоресціює в УФ-променях. Отримане зображення обробляли за допомогою графічного редактора GIMP та MS Power Point.

Визначення активності поліфенолоксидазних ферментів виконували за допомогою фар-

бування 1%-им фенолом. Наважки по 0,1 г шроту зерна пшениці заливали 700 мкл 1%-го фенолу, перемішували і витримували 16 год при кімнатній температурі (шрот з наважок паралельно аналізували шляхом мультиплексної ПЛР для визначення алельного стану генів *Pro-A1* та *Pro-D1*). Центрифугували 3 хв при 6000 об./хв. Вимірювали довжину хвилі забарвленого розчину при 405 нм. Як контроль використовували 1%-ий фенол. Під час виміру здійснювали промивку кювети спочатку 70%-им етанолом, потім дистильованою водою. Через кожні 5 зразків для контролю проводили вимірювання 1%-го фенолу.

Для оцінки ефективності молекулярно-генетичних підходів з визначення генів *Wx* проводили фарбування зернівок розчином йоду: подрібнені зернівки переносили в пробірку на 1,5 мл, куди додавали 700 мкл розчину йоду (1:10 спиртовий розчин йоду : дистильована вода), перемішували короткочасно в шейкері. Результати визначали візуально за зміною забарвлення розчину.

Аналіз гліадинової фракції запасних білків пшениці здійснювали методом електрофорезу у поліакриламідному гелі [48].

Статистичний аналіз результатів біохімічних тестів виконували стандартними методами [49], які включали розрахунок середнього значення дисперсії S^2 і стандартного відхилення S , визначення грубих похибок з використанням $3S$ -критерію, β -критерію і критерію Романівського та розрахунок надійного інтервалу прямого вимірювання.

3. ВИЯВЛЕННЯ ПШЕНИЧНО-ЖИТЬОГО ТРАНСЛОКАТИВНОГО МАТЕРІАЛУ

У ході скринінгу зібраної колекції ДНК пшениці на наявність житнього інтрогресивного матеріалу за допомогою підібраних маркерних систем було досліджено 100 сортів пшениці за допомогою праймерів до мікросателітного локусу *SCM9* та житоспецифічних повторів R173. У всіх сортів був присутній амплікон 934 п.н., що свідчить про адекватний перебіг реакції. Для

сортів, які несуть транслокацію 1AL.1RS, спостерігали наявність ампліконів розміром 226 п.н., для сортів з 1BL.1RS — 206 п.н., для інших — відсутність сигналу.

Наявність пшенично-житніх транслокацій різних типів було виявлено у 29-и сортів. З них у 19-и була виявлена 1AL.1RS транслокація, а у 10-и — 1BL.1RS. 27 сортів належать до київського та миронівського селекційних центрів, а 2 — до одеського. Це може свідчити про вищу стійкість сортів з півночі України. Транслокації були виявлені як у сортах, які вже десятиріччя вирощуються на території України, так і серед нових, що показує напрямки роботи в селекційних центрах центральної України. Проте в нових сортах одеської селекції житнього транслокативного матеріалу виявлено не було, що можна пояснити значним зниженням показників хлібопекарської якості у сортів пшениці з транслокаціями в умовах степового клімату України [13]. Підвищення частоти виявлення сортів з транслокацією 1AL.1RS пояснюється ймовірно незначним її впливом на хлібопекарські властивості озимої пшениці м'якої [50].

Додаткове дослідження гліадинової фракції білків пшениці за допомогою розділення їх методом електрофорезу дозволило підтвердити достовірність виявлення житньої транслокації та можливості використання молекулярних систем для аналізу сортового та селекційного матеріалу [49].

4. АНАЛІЗ СОРТОВОГО РІЗНОМАНІТТЯ ПШЕНИЦІ НА НАЯВНІСТЬ АЛЕЛІВ ГЕНІВ ПОЛІФЕНОЛОКСИДАЗНОЇ АКТИВНОСТІ

При виявленні алелів генів *Ppo-A1* та *Ppo-D1* були обрані маркери PPO33 (кододомінантний тип, ген *Ppo-A1*) та PPO29 (домінантний тип, ген *Ppo-D1*). З метою отримання ефективних маркерних систем для впровадження у прикладну селекцію запропоновано ввести в реакцію праймери до референтного гена *TaTM20*. Для маркера PPO33 було запропоновано використання градієнтної ПЛР (рис. 1), для PPO29 — техніку низхідної ПЛР (рис. 2).

Спостерігали амплікони 391 та 582 п.н., які підтверджуються аналізом відповідної послідовності гена *Ppo-A1* з Генетичного банку (National Center for Biotechnology Information). Для деяких сортів (зокрема, Гурт, Заграва, Гілея) спостерігали наявність обох ампліконів, що свідчить про гетерогенність зерна даних сортів.

За використання маркера PPO-29 спостерігали очікуваний амплікон 490 п.н., який свідчить про наявність алеля *b* гена *Ppo-D1*. У всіх сортах виявляли амплікон розміром 934 п.н., який свідчить про адекватність реакції.

Скринінг вибірки 100 сортів пшениці вітчизняної селекції здійснювали за допомогою розроблених мультиплексних ПЛР. Алель *Ppo-A1b* було виявлено лише у сортах Єдність та Білява (український районований сорт білозерної пшениці), що складає 2 % від загальної вибірки. У 12-и сортах спостерігали гетерогенність зерна за геном *Ppo-A1*. Це було виявлено як у старовинних (Миронівська 808), так і в сучасних сортах. У інших сортах ідентифікували алель *Ppo-A1a*, який визначає високий рівень активності поліфенолоксидаз. У 36-и сортах вибірки (36 %) був визначений алель *Ppo-D1a*, який обумовлює низькоактивну поліфенолоксидазну активність, у решти — алель *Ppo-D1b*.

Для підтвердження результатів молекулярно-генетичних систем, за допомогою яких сорти пшениці були поділені на групи, враховуючи алельний склад генів PPO, було проведено серію біохімічних дослідів для визначення активності поліфенолоксидаз, використовуючи як субстрат 1%-ий фенол. Для цього було обрано низку контрастних сортів та білозерних ліній із залученням ряду зарубіжних сортів. Вимірювання інтенсивності забарвлення здійснювалося спектрофотометрично при довжині хвилі 405 нм (табл. 4).

Отримані дані свідчать про високу ПФО активність сортів Куяльник, Ятрань 60 та Недра, які є носіями алеля *Ppo-A1a*. Проте достовірно не можна відрізнити сорт Недра (*Ppo-D1a*) від сортів Куяльник та Ятрань 60 (*Ppo-D1b*).

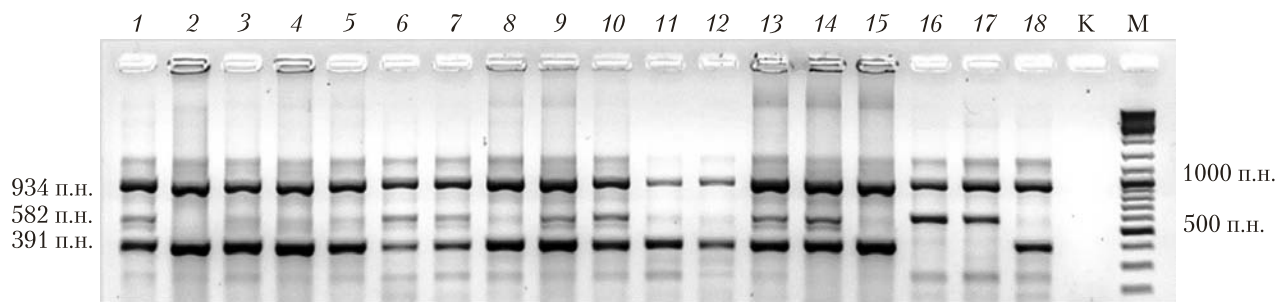


Рис. 1. Електрофореграма продуктів мультиплексної ампліфікації для виявлення алелів *Ppo-A1a* та *Ppo-A1b*. Доріжки 1–16 – досліджувані сорти; 17 – позитивний контроль (*Ppo-A1b*); 18 – позитивний контроль (*Ppo-A1a*); К – негативний контроль (ТЕ буфер); М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix

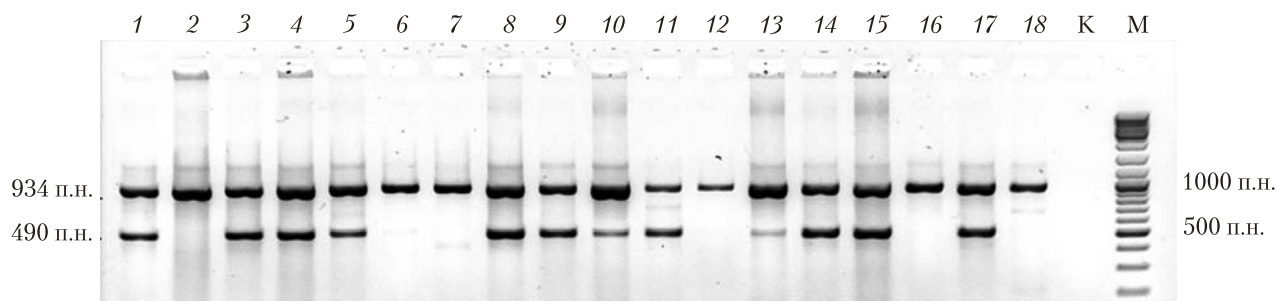


Рис. 2. Електрофореграма результатів мультиплексної ПЛР для виявлення алеля *Ppo-D1b*. Доріжки 1–16 – досліджувані сорти; 17 – позитивний контроль (*Ppo-D1b*); 18 – позитивний контроль (*Ppo-D1a*); К – негативний контроль (ТЕ буфер); М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix

Таблиця 4

**Розподіл контрастних сортів пшениці
за ознакою активності ПФО методом фенольної проби**

Сорт	Значення A_{405}	Активність ПФО	Генотип
Білява	$0,424 \pm 0,100$	Низька	<i>Ppo-A1b, Ppo-D1a</i>
Куяльник	$2,237 \pm 0,263$	Висока	<i>Ppo-A1a, Ppo-D1b</i>
Фаворитка	$0,848 \pm 0,300$	Середня	<i>Ppo-A1a/b, Ppo-D1b</i>
Гренні	$0,588 \pm 0,215$	Низька	<i>Ppo-A1a/b, Ppo-Da</i>
Ятрань-60	$2,105 \pm 0,390$	Висока	<i>Ppo-A1a, Ppo-D1b</i>
Недра	$2,349 \pm 0,286$	Висока	<i>Ppo-A1a, Ppo-D1a</i>
Хуторянка	$0,426 \pm 0,105$	Низька	<i>Ppo-A1a/b, Ppo-D1a</i>
Торчинська	$1,196 \pm 0,360$	Середня	<i>Ppo-A1a/b, Ppo-D1b</i>
Лінія 3162 б.з.	$0,462 \pm 0,162$	Низька	<i>Ppo-A1b, Ppo-D1a</i>

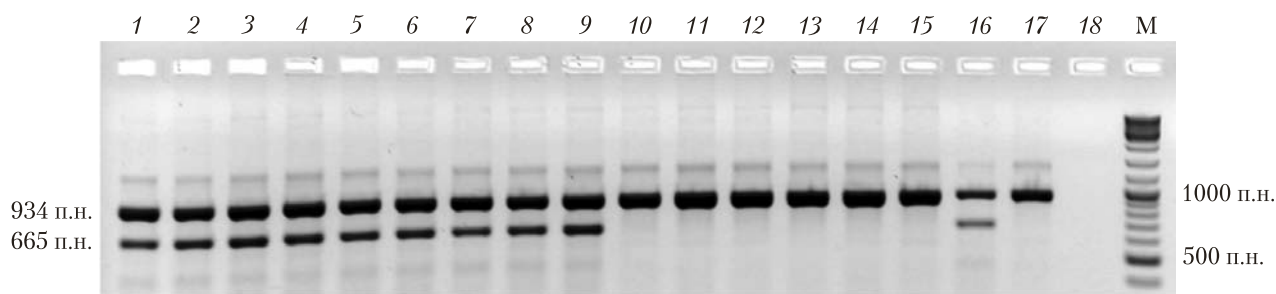


Рис. 3. Електрофореграма продуктів мультиплексної ампліфікації гена *Tamyb10-A1* з праймерами набору 1. Доріжки 1–9 – зразки пшениці, які несуть алель *R-A1b*; 10–15 – зразки пшениці, які несуть алель *R-A1a*; 16 – позитивний контроль; 17 – негативний контроль; 18 – негативний контроль, ТЕ буфер; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

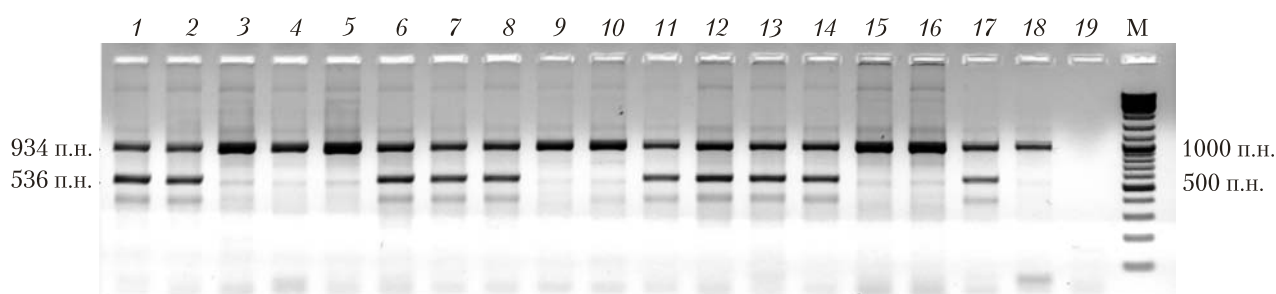


Рис. 4. Електрофореграма продуктів мультиплексної ампліфікації гена *Tamyb10-A1* з праймерами набору 2. Доріжки 1, 2, 6–8, 11–14 – зразки пшениці, які несуть алель *R-A1a*; 3–5, 9–11, 15, 16 – зразки пшениці, які несуть алель *R-A1b*; 17 – позитивний контроль; 18 – негативний контроль; 19 – негативний контроль, ТЕ буфер; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

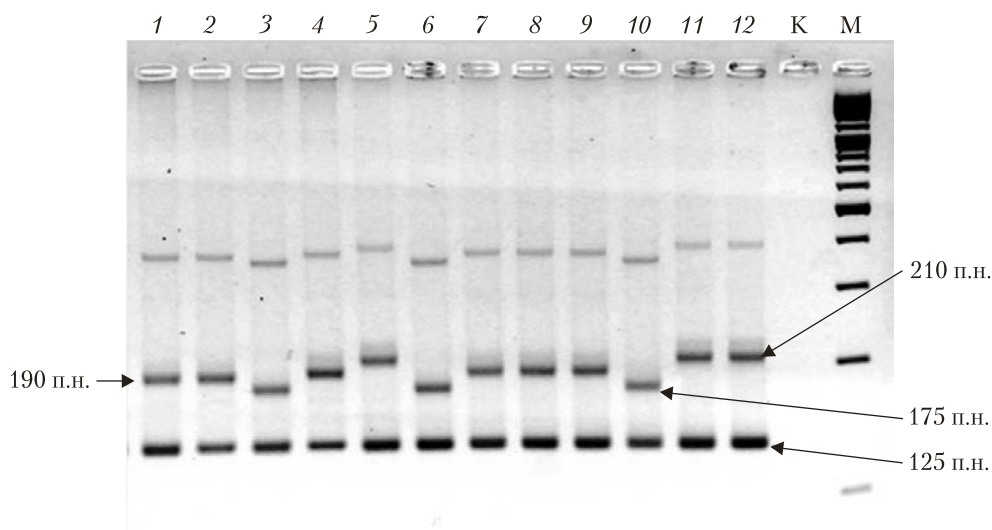


Рис. 5. Електрофореграма продуктів ампліфікації локусу *Xgwm111*. Доріжки: 1–12 – досліджувані сорти пшениці; К – негативний контроль, ТЕ буфер; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Сорт Білява та лінія білозерної пшениці 3162 показали низький достовірно значимий рівень ПФО активності, що корелює з їх генотипом. Проміжний рівень активності ПФО займають сорти, які є гетерогенними за геном *Ppo-A1*. Отже, отримані дані показують ефективність молекулярно-генетичних підходів для характеристики сортів за ознакою активності поліфенолоксидазних ферментів.

5. ВИЯВЛЕННЯ АЛЕЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНА *Tamyb10-A1*

Для виявлення алелів гена *Tamyb10-A1* проводили розробку мультиплексних полімеразних ланцюгових реакцій для двох наборів праймерів (рис. 3, 4). Для контролю адекватності перебігу реакції використовували праймери до референтного гена *TaTM20*.

За використання набору 1 спостерігали амплікон 665 п.н. для сортів, які несуть домінуючий алель *R-A1b*, та для всіх зразків очікували амплікон 934 п.н., який свідчить про адекватність перебігу реакції.

За використання набору 2 спостерігали амплікон 536 п.н. для сортів, які несуть рецесивний алель *R-A1a*, та для всіх зразків очікували амплікон 934 п.н., який свідчить про адекватність перебігу реакції.

За результатами проведених аналізів складено характеристику 100 сортів за геном *Tamyb10-A1*. Сорти з алелем *R-A1b* потенційно мають більшу стійкість до проростання в колосі.

У результаті аналізу 100 сортів пшениці було виявлено 26 сортів, які несуть рецесивний алель *R-A1a*, що відповідає за білий колір зернівки та має негативний вплив на стійкість до проростання в колосі. У 74 сортах виявлено домінуючий алель *R-A1b*, який потенційно позитивно впливає на стійкість до проростання. Частота появи рецесивного алеля є досить високою, незважаючи на практичну відсутність білозерних сортів вітчизняного походження. Таким чином, запропоновані молекулярні підходи оцінки сортового матеріалу ефективні для впровадження у селекційний процес створен-

ня як білозерних сортів, так і сортів, стійких до проростання в колосі.

6. АНАЛІЗ СОРТІВ ПШЕНИЦІ ЗА ЛОКУСОМ *Xgwm111*

Для виявлення локусу *Xgwm111*, який локалізований на хромосомі 7D на відстані 0,7 сМ від *Stb4*, проводилася ПЛР зі специфічною парою праймерів з наступним розділенням за допомогою горизонтального електрофорезу у 3%-ому агарозному гелі. Розмір ампліконів визначали використовуючи програмне забезпечення Gel-Analyzer, ver. 2010a. Було запропоновано виділити 3 амплікони з орієнтовним розміром 175, 190 та 210 п.н., причому розмір амплікону 210 п.н. за літературними даними спостерігається у стійких до септоріозу сортів. Окрім того, ідентифікували другий блок ампліконів розміром 125 та 135 п.н., який не корелює зі стійкістю, проте є цінним для генотипування сортів. Результати типової ампліфікації наведені на рис. 5. Отримана якість розділення продуктів ампліфікації у агарозному гелі виявилася прийнятною для чіткої ідентифікації результатів.

У результаті аналізу було виявлено 18 із 100 сортів пшениці з ампліконом 210 п.н., що свідчить про наявність у даних сортів гена *Stb4*, який обумовлює стійкість до септоріозу. Сорти Добрович і Подяка є гетерогенними за локусом, тобто зерновий матеріал є як з генотипом *Stb4*, так і без нього. Отримані дані придатні для використання у селекції на стійкість пшениці до септоріозу, а також можуть бути залучені до генотипування нових сортів.

7. ВИЗНАЧЕННЯ АЛЕЛЬНОГО СКЛАДУ ГЕНІВ *Wx* ПШЕНИЦІ

Визначення алельного стану генів *Wx* проводили за допомогою попередньо оптимізованих програм та зі специфічними праймерами. На рис. 6 наведено типові результати візуалізації фрагментів ампліфікації гена *Wx-A1* після рестрикційного аналізу.

Спостерігали амплікон розміром 652 п.н. у сортах, які несуть нуль-алель гена *Wx-A1*. Для

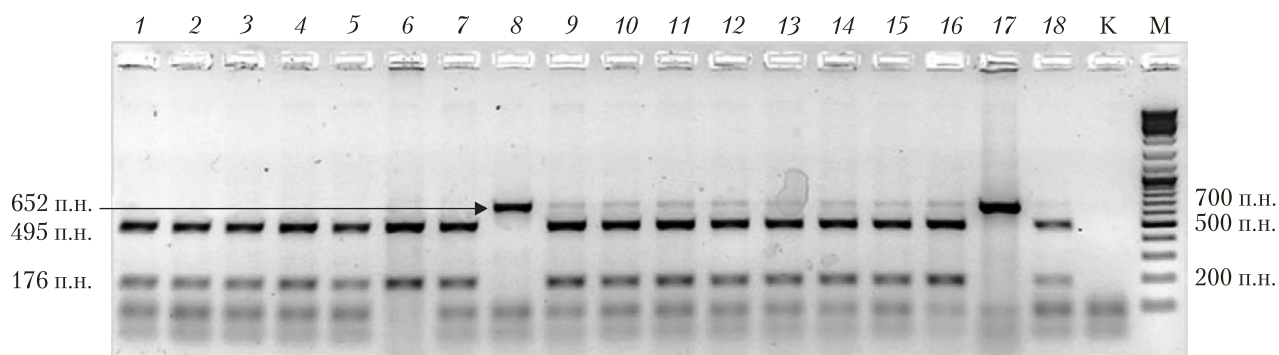


Рис. 6. Електрофореграма результатів ПЛР з рестрикційним аналізом на ген *Wx-A1*. Доріжки: 1–16 – дослідні зразки пшениці; 17 – контрольний зразок, який несе нуль-алель *Wx-A1b* гена; 18 – контрольний зразок, який несе алель дикого типу (*Wx-A1a*); К – негативний контроль; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

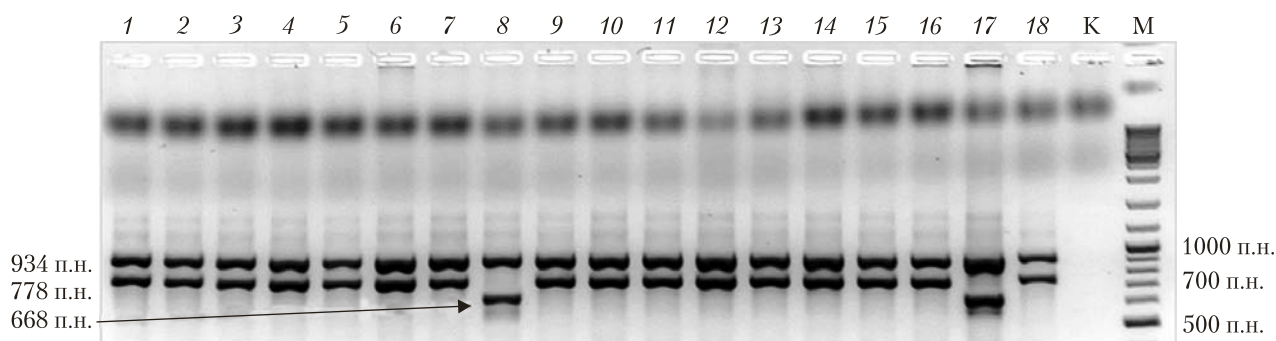


Рис. 7. Електрофореграма результатів мультиплексної ампліфікації гена *Wx-B1*. Доріжки: 1–16 – дослідні зразки пшениці; 17 – контрольний зразок, який несе нуль-алель *Wx-B1b* гена; 18 – контрольний зразок, який несе алель дикого типу (*Wx-B1a*); К – негативний контроль; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

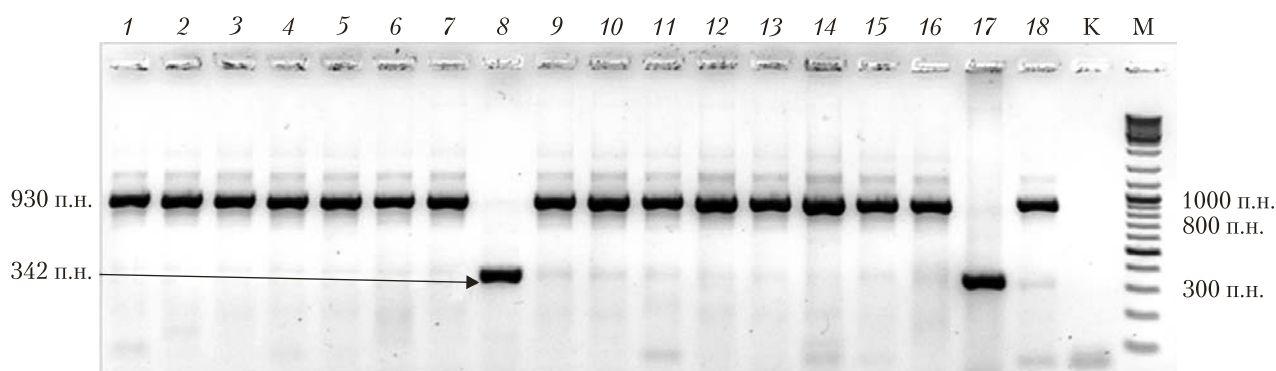


Рис. 8. Електрофореграма результатів ампліфікації гена *Wx-D1*. Доріжки 1–16 – дослідні зразки пшениці; 17 – контрольний зразок, який несе нуль-алель *Wx-D1b* гена; 18 – контрольний зразок, який несе алель дикого типу (*Wx-D1a*); К – негативний контроль; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

сортів, які містять алель дикого типу ідентифікували амплікони 495 та 176 п.н. Негативний контроль підтвердив достовірність результатів.

На рис. 7 наведені типові результати візуалізації ампліфікації гена *Wx-B1*.

Амплікон розміром 668 п.н. спостерігали у сортів з нуль-алелем гена *Wx-B1*, а в інших зразках детектували амплікон 778 п.н., характерний для алеля дикого типу. В деяких сортах спостерігали наявність амплікону 804 п.н., характерного для функціонального алеля *Wx-B1e*. Амплікон розміром 934 п.н., що відповідає гену *TaTM20*, виявлено в усіх зразках, що свідчить про адекватний перебіг реакції.

Амплікон розміром 342 п.н. є типовим для нуль-алеля гена *Wx-D1*, а 930 п.н. — для алеля дикого типу гена *Wx-D1* (рис. 8).

Серед досліджуваних сортів був виявлений один ваксі-сорт пшениці одеської селекції Софійка, що підтверджено за допомогою молекулярно-генетичних аналізів наявністю нуль-алелей за всіма генами *Wx*. Усі зразки за генами *Wx-A1* та *Wx-D1* були представлені алелями дикого типу. Вперше серед українських сортів пшениці було виявлено функціональний алель *e* гена *Wx-B1*. Сорти Кірія і Красень при детекції гена *Wx-B1* виявляли амплікон розміром 804 п.н., що відповідає функціональному алелю *Wx-B1e*. Сорт Селянка ніс одразу і алель дикого типу і функціональний алель. Отже, поліморфізм генів *Wx* серед досліджуваної вибірки пшениці виявився незначним.

Для підтвердження ефективності та достовірності молекулярно-генетичних аналізів було проведено фарбування зернівок пшениці розчином йоду. Для додаткового порівняння окрім досліджуваних сортів було використано ряд ліній з різним алельним складом генів *Wx*. Негативна реакція з йодом спостерігалась у ваксі-сортів, де відсутній крохмаль із звичною структурою і йод не прореагував з амілозою, а у ваксі-пшениці та в сорті Ятрань 60 частково пройшла реакція з утворенням клатрату синього кольору. Отже, дана реакція є доцільною для визначення ваксі-генотипів пшениці.

Робота проводилася у рамках науково-технічного проекту «Впровадження молекулярних систем визначення генетичного й епігенетичного поліморфізму озимої пшениці для отримання високопродуктивних спеціалізованих сортів», фінансованого НАН України. Реєстраційний номер 0114U002736.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Lukaszewski A.J.* Frequency of 1RS.1AL and 1RS.1BL translocations in United States wheat / A.J. Lukaszewski // Crop Sci. — 1990. — V. 30. — P. 1151—1153.
2. *McIntosh R.A.* Catalogue of gene symbols for wheat / R.A. McIntosh, G. Hart, M. Gale // Proc. of the 8th Intern. Wheat Genet. Symp. Eds Z.S. Li, Z.Y. Xin. Beijing, China. — 1993. — P. 1333—1500.
3. *Rabinovich S.V.* Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. / S.V. Rabinovich // Euphytica. — 1998. — V. 100. — P. 323—340.
4. *Shlegel R.* Current list of wheats with rye and alien introgression / R. Shlegel // — 2010. — V. 5-8. — P. 1—14.
5. *Singh N.K.* Linkage mapping of genes for resistance to leaf, stem and stripe rust and secalins on the short arm of rye chromosome 1R / N.K. Singh, K.W. Shepherd, R.A. McIntosh // Theor. Appl. Genet. — 1990. — V. 80. — P. 609—616.
6. *Catalogue of gene symbols for wheat* // Proc. of the 10th Intern. Wheat Genet. Symp/ R.A. McIntosh, Y. Yamazaki, K.M. Devos [et al.] / Eds N.E. Pogna, M. Romano, G. Galterio. Paestum, Italy, 2003. — P. 1—6.
7. *Meltz G., Schlegel R., Thiele V.* Genetic linkage map of rye // Theor. Appl. Genet. — 1992. — V. 83. — P. 33—45.
8. *Козуб Н.О., Созінов І.О., Колючий В.Т. та ін.* Ідентифікація 1AL/1RS транслокації у сортів м'якої пшениці української селекції // Цитология и генетика. — 2005. — 39, № 4. — С. 20—24.
9. *Hoffmann B.* Alteration of drought tolerance of winter wheat caused by translocation of rye chromosome segment 1R // Cereal Res. Commun. — 2008. — V. 36. — P. 269—278.
10. *Kim Y.-Y., Kim D.-Y., Donghwan S. et al.* Expression of the novel wheat gene TM20 confers enhanced cadmium tolerance to bakers' yeast // J. of Biological Chemistry. — 2008. — V. 283 (23). — P. 15893—15902.
11. *Козуб Н.А., Созінов І.А., Созінов А.А.* Сопряженность 1BL/1RS транслокации с качественными и количественными признаками у мягкой пшеницы *T. aestivum* // Цитология и генетика. — 2001. — Т. 35, № 5. — С. 74—80.
12. *Zhou Y., He Z.H., Sui X.X. et al.* Genetic improvement of grain yield and associated traits in the Northern China

- winter wheat region from 1960 to 2000 // *Crop Sci.* — 2007. — Vol. 47. — P. 245–253.
13. Рибалка О.І. Якість пшениці та її поліпшення — К.: Логос, 2011. — 495 с.
 14. Сиволан 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.
 15. Gupta R.B., Shepherd K.W. Identification of rye chromosome 1R translocations and substitutions in hexaploid wheats using storage proteins as genetic markers // *Plant Breeding.* — 1992. — V. 109. — P. 130–140.
 16. Berzonsky W.F., Francki G. Biochemical, molecular and cytogenetic technologies for characterizing 1RS in wheat: a review // *Euphytica.* — 1999. — 108. — P. 1–15.
 17. Dexter J.E., Preston K.R., Matsuo R.R. et al. Development of a high extraction flour for the GRL Pilot Mill to evaluate Canadian wheat potential for the Chinese market // *Can Inst Food Sci Technol.* — 1984. — V. 14. — P. 253–259.
 18. Feillet P., Autran J.C., Icard-Verniere C. Pasta brownness: an assessment // *J Cereal Sci.* — 2000. — Vol. 32. — P. 215–233.
 19. Simeone R., Pasqualone A., Clodoveo M.L. et al. Genetic mapping of polyphenol oxidase in tetraploid wheat // *Cell Mol Biol Lett.* — 2002. — V. 7. — P. 763–769.
 20. McCallum J.A., Walker J.R.L. O-diphenol oxidase activity, phenolic content and colour of New Zealand wheats, flours and milling streams // *J Cereal Sci.* — 1990. — Vol. 12. — P. 83–96.
 21. McCallum J.A., Walker J.R.L. Proanthocyanidins in wheat bran // *Cereal Chem.* — 1990. — Vol. 67(3). — P. 282–285.
 22. Fuerst E.P., Xu S.S., Beecher B. Genetic characterization of kernel polyphenol oxidase in wheat and related species // *J Cereal Sci.* — 2008. — V. 48. — P. 359–368.
 23. Jukanti A.K., Bruckner P.L., Fischer A.M. Evaluation of wheat polyphenol oxidase genes // *Cereal Chem.* — 2004. — V. 81. — P. 481–485.
 24. Massa A.N., Beecher B., Morris C.F. Polyphenol oxidase (PPO) in wheat and wild relatives: molecular evidence for a multigene family // *Theor Appl Genet.* — 2007. — V. 114. — P. 1239–1247.
 25. Demeke T., Morris C.F., Campbell K.J. et al. Wheat Polyphenol Oxidase // *Crop Sci.* — 2001. — V. 41 (6). — P. 1750–1757.
 26. Raman R., Raman H., Martin P. Functional gene markers for polyphenol oxidase locus in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Molecular Breeding.* — 2007. — V. 19 (4). — P. 315–328.
 27. Sun Y., He Z., Ma W. et al. Alternative splicing in the coding region of *Ppo-A1* directly influences the polyphenol oxidase activity in common wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Functional & Integrative Genomics.* — 2011. — V. 11(1). — P. 85–93.
 28. Vatanabe N., Takeuchi A., Nakayama A. Vatanabe N. Inheritance and chromosomal location of the homoeologous genes affecting phenol colour reaction of kernels in durum wheat // *Euphytica.* — 2004. — V. 139. — P. 87–93.
 29. Beecher B.S., Skinner D.Z. Molecular cloning and expression analysis of multiple polyphenol oxidase genes in developing wheat (*Triticum aestivum*) kernels // *J Cereal Sci.* — 2011. — V. 53. — P. 371–378.
 30. Sun D.J., He Z.H., Xia X.C. et al. A novel STS marker for polyphenol oxidase activity in bread wheat // *Mol Breed.* — 2005. — V. 16. — P. 209–218.
 31. He X.Y., He Z.H., Zhang L.P. et al. Allelic variation of polyphenol oxidase (PPO) genes located on chromosomes 2A and 2D and development of functional markers for the PPO genes in common wheat // *Theor Appl Genet.* — 2007. — V. 115. — P. 47–58.
 32. Beecher B.S., Carter A.H., See D.R. Genetic mapping of new seed-expressed polyphenol oxidase genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor Appl Genet.* — 2012. — V. 124. — P. 1463–1473.
 33. Flintham J.E. Different genetic components control coat-imposed and embryo-imposed dormancy in wheat // *Seed Sci Res.* — 2000. — V. 10. — P. 43–50.
 34. Warner R.L., Kudrna D.A., Spaeth S.C. et al. Dormancy in white-grain mutants of Chinese Spring wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Seed Sci Res.* — 2000. — V. 10. — P. 51–60.
 35. Himi E., Mares D.J., Yanagisawa A. et al. Effect of grain colour gene (R) on grain dormancy and sensitivity of the embryo to abscisic acid (ABA) in wheat // *J Exp Bot.* — 2002. — V. 53(374). — P. 1569–1574.
 36. Himi E., Nisar A., Noda K. Colour genes (R and Rc) for grain and coleoptile upregulate flavonoid biosynthesis genes in wheat // *Genome.* — 2005. — V. 48(4). — P. 747–754.
 37. Himi E., Noda K. Isolation and location of three homoeologous dihydroflavonol-4-reductase (DFR) genes of wheat and their tissue-dependent expression // *J Exp Bot.* — 2004. — V. 55(396). — P. 365–375.
 38. Shaner G., Finney R.E. Weather and epidemics of Septoria leaf blotch of wheat // *Phytopathology.* — 1976. — V. 66. — P. 781–785.
 39. Adhikari T.B., Cavaletto J.R., Dubcovsky J. et al. Molecular mapping of the *stb4* gene for resistance to Septoria tritici blotch in wheat // In: *Phytopathology.* — 2004. — V. 94. — P. 1198–1206.
 40. Brading P.A., Verstappen E.C.P., Kema G.H.J. et al. A gene-for-gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the Septoria tritici blotch pathogen // *Phytopathology.* — 2002. — V. 92. — P. 439–445.
 41. McCartney C.A. Inheritance and chromosomal location of race-specific resistance to *Mycosphaerella graminicola* in wheat. Ph.D. thesis. University of Manitoba, Winnipeg, Canada. — 2002.
 42. Копуць М.М., Игнат'єва Н.Г., Васюшкіна Н.Е. и др. Генетический полиморфизм амилолитических ферментов зерна пшеницы и генетика ферментов био-

- синтеза крахмала // *Зерновое хозяйство России*. — 2009. — № 4. — С. 23–27.
43. Chao S., Sharp P. Chao S. RELP-based genetic map of wheat homeologous group 7 chromosomes // *Theor. Appl. Genet.* — 1989. — V. 78. — P. 495–504.
 44. Rodriguez-Quijano M., Nieto-Taladriz M.T., Carrillo J.M. Polymorphism of waxy proteins in Iberian hexaploid wheats // *Plant Breeding*. — 1998. — V. 117. — P. 341–344.
 45. Saito M., Vrinten P., Nakamura T. DNA markers for identifying waxy mutations and improving noodle quality in wheat // *JARQ*. — 2010. — V. 44 (2). — P. 109–115.
 46. Zhao X.C., Sharp P.J., Crosbie G. et al. A single genetic locus associated with starch granule properties in a cross between wheat cultivars of disparate noodle quality // *J. Cereal Sci.* — 1998. — V. 27. — P. 7–13.
 47. Stewart C.N., Via L.E. Stewart C.N. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications // *Bio Techniques*. — 1993. — V. 14(5). — P. 748–749.
 48. 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 НЦНС*. — 2007. — Т. 10, № 50. — С. 52–71.
 49. Степаненко А.І. Розробка систем молекулярно-генетичних маркерів для детекції якісних ознак у пшениці та ячменю: Автореф. дис. канд. біол. наук. — Київ, 2015. — 26 с.
 50. Власенко В.А. Створення вихідного матеріалу для адаптивної селекції і виведення високопродуктивних сортів пшениці в умовах Лісостепу України: Автореф. дис. докт. с.-г. наук. — Одеса, 2008. — 48 с.
 51. Rogowsky P.M., Shepherd K.W., Langridge P. Polymerase chain reaction based mapping of rye involving repeated DNA sequences // *Genome*. — 1992. — V. 35. — P.621–626.
 52. Saal D., Wricke G. Development of simple sequence repeat markers in rye (*Secale cereale* L.) // *Genome*. — 1999. — V. 42. — P. 964–972.
 53. Vanzetti L.S., Pflüger L.A., Rodriguez-Quijano M. et al. Genetic variability for waxy genes in Argentinean bread wheat germplasm // *Electronic J. Biotechnol.* — 2009. — V. 12. — P. 1–9.
 54. Saito M., Vrinten P., Ishikawa G. et al. A novel codominant marker for selection of the null *Wx-B1* allele in wheat breeding programs // *Mol. Breeding*. — 2009. — V. 23. — P. 209–217.
 55. Дивашук М.Г., Климущина М.В., Карлов Г.И. Молекулярно-генетическая характеристика аллеля *Wx-B1e* мягкой пшеницы и применимость ДНК маркеров для его идентификации // *Генетика*. — 2011. — Т. 47. — № 12. — С. 1611–1615.
 56. Vrinten P., Nakamura T., Yamamori M. Molecular characterization of waxy mutations in wheat // *Mol. General Genet.* — 1999. — V. 261. — P. 463–471.

REFERENCES

1. Lukaszewski A.J. Frequency of 1RS.1AL and 1RS.1BL translocations in United States wheat / A.J. Lukaszewski. *Crop Sci.* 1990. V.30: 1151–1153.
2. McIntosh R.A. Cataloge of gene symbols for wheat. R.A. McIntosh, G. Hart, M. Gale. *Proc. of the 8th Intern. Wheat Genet. Symp.* Eds Z.S. Li, Z.Y. Xin. Beijing, China. 1993: 1333–1500.
3. Rabinovich S.V. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. S.V. Rabinovich. *Euphytica*. 1998. V.100: 323–340.
4. Schlegel R. Current list of wheats with rye and alien introgression. *Shlegel*. 2010. V.5-8: 1–14.
5. Singh N.K. Linkage mapping of genes for resistance to leaf, steam and stripe rust and secalins on the short arm of rye chromosome 1R. N.K. Singh, K.W. Shepherd, R.A. McIntosh. *Theor. Appl. Genet.* 1990. V.80: 609–616.
6. Catalogue of gene symbols for wheat. *Proc. of the 10th Intern. Wheat Genet. Symp.* R.A. McIntosh, Y. Yamazaki, K.M. Devos [et al.] Eds N.E.Pogna, M. Romano, G. Galterio. Paestum, Italy, 2003: 1–6.
7. Meltz G., Schlegel R., Thiele V. Genetic linkage map of rye. *Theor. Appl. Genet.* 1992. V.83: 33–45.
8. Kozub N.O., Sozinov I.O., Koljuchyj V.T. та ін. Ідентифікація 1AL/1RS транслокації у сортів м'якої пшениці української селекції. *Cytologyja y genetyka*. 2005. 39(4): 20–24 [in Ukrainian].
9. Hoffmann B. Alteration of drought tolerance of winter wheat caused by translocation of rye chromosome segment 1R. *Cereal Res. Commun.* 2008. V.36: 269–278.
10. Kim Y.-Y., Kim D.-Y., Donghwan S. et al. Expression of the novel wheat gene TM20 confers enhanced cadmium tolerance to bakers' yeast. *J. of Biologocal Chemistry*. 2008. 283(23): 15893–15902.
11. Kozub N.A., Sozynov Y.A., Sozynov A.A. Soprzazhenost' 1BL/1RS translokacyy s kachestvennymy y kolychestvennymy pryznakamy u mjagkoj pshenyци *T. aestivum*. *Cytologyja y genetyka*. 2001. 35(5): 74–80 [in Ukrainian].
12. Zhou Y., He Z.H., Sui X.X. et al. Genetic improvement of grain yield and associated traits in the Northern China winter wheat region from 1960 to 2000. *Crop Sci.* 2007. V.47: 245–253.
13. Rybalka O.I. *Jakist' pshenyци ta i'i' polipshennja*. Kyiv: Logos, 2011 [in Ukrainian].
14. Syvolap Ju.M., Chebotar S.V., Sudarchuk L.V. *Detekcija 1RS.1AL, 1RS.1BL ta modyfikovanoi' translokacij za 1RS hromosomoju u selekcyjnyh form m'jakoi' pshenyци. Metodychni rekomendacii'*. Odesa, 2011 [in Ukrainian].
15. Gupta R.B., Shepherd K.W. Identification of rye chromosome 1R translocations and substitutions in hexaploid wheats using storage proteins as genetic markers. *Plant Breeding*. 1992. V.109: 130–140.

16. Berzonsky W.F., Francki G. Biochemical, molecular and cytogenetic technologies for characterizing 1RS in wheat: a review. *Euphytica*. 1999. 108: 1–15.
17. Dexter J.E., Preston K.R., Matsuo R.R. et al. Development of a high extraction flour for the GRL Pilot Mill to evaluate Canadian wheat potential for the Chinese market. *Can Inst Food Sci Technol*. 1984. 14: 253–259.
18. Feillet P., Autran J.C., Icard-Verniere C. Pastabrownness: an assessment. *J Cereal Sci*. 2000. V. 32: 215–233.
19. Simeone R., Pasqualone A., Clodoveo M.L. et al. Genetic mapping of polyphenol oxidase in tetraploid wheat. *Cell Mol Biol Lett*. 2002. V.7: 763–769.
20. McCallum J.A., Walker J.R.L. O-diphenol oxidase activity, phenolic content and colour of New Zealand wheats, flours and milling streams. *J Cereal Sci*. 1990. V.12: 83–96.
21. McCallum J.A., Walker J.R.L. Proanthocyanidins in wheat bran. *Cereal Chem*. 1990. 67(3): 282–285.
22. Fuerst E.P., Xu S.S., Beecher B. Genetic characterization of kernel polyphenol oxidase in wheat and related species. *J Cereal Sci*. 2008. V.48: 359–368.
23. Jukanti A.K., Bruckner P.L., Fischer A.M. Evaluation of wheat polyphenol oxidase genes. *Cereal Chem*. 2004. V.81: 481–485.
24. Massa A.N., Beecher B., Morris C.F. Polyphenol oxidase (PPO) in wheat and wild relatives: molecular evidence for a multigene family. *Theor Appl Genet*. 2007. V.114: 1239–1247.
25. Demeke T., Morris C.F., Campbelle K.J. et al. Wheat Polyphenol Oxidase. *Crop Sci*. 2001. 41(6): 1750–1757.
26. Raman R., Raman H., Martin P. Functional gene markers for polyphenol oxidase locus in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Breeding*. 2007. 19(4): 315–328.
27. Sun Y., He Z., Ma W. et al. Alternative splicing in the coding region of Ppo-A1 directly influences the polyphenol oxidase activity in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Functional & Integrative Genomics*. 2011. 11(1): 85–93.
28. Vatanabe N., Takeuchi A., Nakayama A. Vatanabe N. Inheritance and chromosomal location of the homoeologous genes affecting phenol colour reaction of kernels in durum wheat. *Euphytica*. 2004. V.139: 87–93.
29. Beecher B.S., Skinner D.Z. Molecular cloning and expression analysis of multiple polyphenol oxidase genes in developing wheat (*Triticum aestivum*) kernels. *J Cereal Sci*. 2011. V.53: 371–378.
30. Sun D.J., He Z.H., Xia X.C. et al. A novel STS marker for polyphenol oxidase activity in bread wheat. *Mol Breed*. 2005. V.16: 209–218.
31. He X.Y., He Z.H., Zhang L.P. et al. Allelic variation of polyphenol oxidase (PPO) genes located on chromosomes 2A and 2D and development of functional markers for the PPO genes in common wheat. *Theor Appl Genet*. 2007. V.115: 47–58.
32. Beecher B.S., Carter A.H., See D.R. Genetic mapping of new seed-expressed polyphenol oxidase genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*. 2012. V.124: 1463–1473.
33. Flintham J.E. Different genetic components control coat-imposed and embryo-imposed dormancy in wheat. *Seed Sci Res*. 2000. V.10: 43–50.
34. Warner R.L., Kudrna D.A., Spaeth S.C. et al. Dormancy in white-grain mutants of Chinese Spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Seed Sci Res*. 2000. V.10: 51–60.
35. Himi E., Mares D.J., Yanagisawa A. et al. Effect of grain colour gene (R) on grain dormancy and sensitivity of the embryo to abscisic acid (ABA) in wheat. *J Exp Bot*. 2002. 53(374): 1569–1574.
36. Himi E., Nisar A., Noda K. Colour genes (R and Rc) for grain and coleoptile upregulate flavonoid biosynthesis genes in wheat. *Genome*. 2005. 48(4): 747–754.
37. Himi E., Noda K. Isolation and location of three homoeologous dihydroflavonol-4-reductase (DFR) genes of wheat and their tissue-dependent expression. *J Exp Bot*. 2004. 55(396): 365–375.
38. Shaner G., Finney R.E. Weather and epidemics of Septoria leaf blotch of wheat. *Phytopathology*. 1976. V.66: 781–785.
39. Adhikari T.B., Cavaletto J.R., Dubcovsky J. et al. Molecular mapping of the *stb4* gene for resistance to Septoria tritici blotch in wheat. *Phytopathology*. 2004. V.94: 1198–1206.
40. Brading P.A., Verstappen E.C.P., Kema G.H.J. et al. A gene-for-gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the Septoria tritici blotch pathogen. *Phytopathology*. 2002. V.92: 439–445.
41. McCartney C.A. *Inheritance and chromosomal location of race-specific resistance to Mycosphaerella graminicola in wheat*. Ph.D. thesis. University of Manitoba, Winnipeg, Canada. 2002.
42. Kopus' M.M., Ignat'eva N.G., Vasjushkina N.E. i dr. Geneticheskij polimorfizm amilolicheskikh fermentov zerna pshenicy i genetika fermentov biosinteza krahmala. *Zernovoe hozjajstvo Rossii*. 2009, no 4: 23–27 [in Russian].
43. Chao S., Sharp P. Chao S. RELP-based genetic map of wheat homeologous group 7 chromosomes. *Theor. Appl. Genet*. 1989. V.78: 495–504.
44. Rodriguez-Quijano M., Nieto-Taladriz M.T., Carrillo J.M. Polymorphism of waxy proteins in Iberian hexaploid wheats. *Plant Breeding*. 1998. V.117: 341–344.
45. Saito M., Vrinten P., Nakamura T. DNA markers for identifying waxy mutations and improving noodle quality in wheat. *JARQ*. 2010. 44(2): 109–115.
46. Zhao X.C., Sharp P.J., Crosbie G. et al. A single genetic locus associated with starch granule properties in a cross between wheat cultivars of disparate noodle quality. *J. Cereal Sci*. 1998. V.27: 7–13.

47. Stewart C.N., Via L.E. Stewart C.N. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Bio Techniques*. 1993. 14(5): 748–749.
48. Rybalka O.I., Chervonis M.V., Shherbyna Z.V. Genetychnyj polimorfizm klejkovynnyh bilkiv zerna, pov'jazanyh z jakistju boroshna pshenyci: metody identyfikacii'. *Zb. nauk. prac' SGINCNS*. 2007. 10(50): 52–71 [in Ukrainian].
49. Stepanenko A.I. Avtoreferat, 2015 [in Ukrainian].
50. Vlasenko V.A. *Stvorennja vyhidnogo materialu dlja adaptynoi' selekcii' i vyvedennja vysokoproduktyvnyh sortiv pshenyci v umovah Lisostepu Ukrainy*. Avtoref. dys. dokt. s.-g. nauk. Odessa, 2008 [in Ukrainian].
51. Rogowsky P.M., Shepherd K.W., Langridge P. Polymerase chain reaction based mapping of rye involving repeated DNA sequences. *Genome*. 1992. V.35: 621–626.
52. Saal D., Wricke G. Development of simple sequence repeat markers in rye (*Secale cereale* L.). *Genome*. 1999. V.42: 964–972.
53. Vanzetti L.S., Pflüger L.A., Rodríguez-Quijano M. et al. Genetic variability for waxy genes in Argentinean bread wheat germplasm. *Electronic J. Biotechnol.* 2009. V.12: 1–9.
54. Saito M., Vrinten P., Ishikawa G. et al. A novel codominant marker for selection of the null Wx-B1 allele in wheat breeding programs. *Mol. Breeding*. 2009. V.23: 209–217.
55. Divashuk M.G., Klimushina M.V., Karlov G.I. Molekuljarno-geneticheskaja harakteristika allelja Wx-B1e m'jagkoj pshenyci i primenimost' DNK markerov dlja ego identyfikacii'. *Genetika*. 2011. 47(12): 1611–1615 [in Russian].
56. Vrinten P., Nakamura T., Yamamori M. Molecular characterization of waxy mutations in wheat. *Mol. General Genet.* 1999. V.261: 463–471.

Б.В. Моргун, А.И. Степаненко, О.В. Степаненко,
М.А. Банникова, А.В. Голубенко, И.А. Нитовская,
П.Д. Майстров, Д.М. Гродзинский

Институт клеточной биологии и генетической
инженерии НАН Украины, Киев

ВНЕДРЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО
ПОЛИМОРФИЗМА ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ СОРТОВ

Внедрены молекулярные системы определения генетического полиморфизма для 100 сортов озимой пшеницы: проведен скрининг наличия ценных аллелей, на основе полимерных цепных реакций; установлен уровень распространения аллелей низкой и средней ак-

тивности полифенолоксидазных ферментов и проведена валидация. Определены сорта пшеницы с ржаными транслокациями 1AL.1RS, 1BL.1RS, рецессивным аллелем гена *Tamyb10*, геном устойчивости к септориозу *Stb4*, сцепленным с полиморфным локусом *Xgwm111*. Выявлен сорт вакси-пшеницы и сорта-носители нетипичного функционального аллеля *Wx-B1e*. Составлена характеристика 100 элитных и перспективных сортов пшеницы по наличию ценных аллелей генов, детерминирующих качественные признаки зерна (гены *PPO*, *Tamyb10-A1*, *Wx*) и устойчивость к биотическим и абиотическим стрессовым факторам (ржаной транслокационный материал, *Tamyb10-A1*, *Stb4*).

Ключевые слова: пшеница, аллель, праймер, качественные характеристики зерна, полимерная цепная реакция.

B.V. Morgun, A.I. Stepanenko, O.V. Stepanenko,
M.A. Bannikova, A.V. Holubenko, I.O. Nitovska,
P.D. Maystrov, D.M. Grodzinsky

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering,
the NAS of Ukraine, Kyiv

IMPLEMENTATION OF MOLECULAR
SYSTEMS FOR IDENTIFICATION
OF GENETIC POLYMORPHISM
IN WINTER WHEAT
TO OBTAIN HIGH-PERFORMANCE
SPECIALIZED VARIETIES

The molecular genetic polymorphism detection systems to screen the presence of alleles in winter wheat 100 varieties were developed. Polymerase chain reactions were deployed to identify relevant genes. The level of allele prevalence of low and medium activity of polyphenol oxidase enzymes was defined and the validation was carried out. Wheat varieties carrying rye 1AL.1RS, 1BL.1RS translocations were characterized and those containing recessive allele of *Tamyb10* gene, with *Stb4* gene resistance to *Septoria* linked to polymorphic locus *Xgwm111*. Waxy wheat variety was discovered and other varieties carrying atypical functional *Wx-B1e* allele. Characteristics of 100 elite and perspective varieties of wheat were compiled for the presence of alleles of genes determining grain quality (genes *PPO*, *Tamyb10-A1*, *Wx*), resistance to biotic and abiotic stress (rye translocative material, *Tamyb10-A1*, *Stb4*).

Keywords: wheat, allele, primer, grain quality characteristics, polymerase chain reactions.

Стаття надійшла до редакції 27.07.15