

СІЧКАР С.М.[✉], ВЕЛИКОЖОН Л.Г., ДУБРОВНА О.В.Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: sichkar07@gmail.com[✉]sichkar07@gmail.com

АНАЛІЗ ЛОКУСІВ *Glu1* У ГІБРИДІВ *TRITICUM SPELTA* L. × *TRITICUM AESTIVUM* L.

Пшениця спельта (*Triticum spelta* L.) – вид плівчастої пшениці, геном якої A^uA^vBBDD близькоспоріднений з гексаплоїдною м'якою пшеницею (*T. aestivum* L.), має форми ярого та озимого типу розвитку. Підвищена увага до спельти в багатьох країнах Європи в останнє десятиліття зумовлена рядом причин, серед яких можна назвати придатність для низьковитратного, органічного землеробства, а також деякі харчові та технологічні властивості, що дозволяють їй у ряді випадків потіснити традиційно домінуючу м'яку пшеницю [1–3]. За даними низки дослідників встановлено, що клейковина спельти позбавлена або принаймні має менше, ніж клейковина м'якої пшениці, компонентів, що викликають целиакову хворобу у сприйнятливих людей [1–3]. Порівняно з твердозерною м'якою пшеницею спельта характеризується нижчим вмістом нерозчинних полімерних білків, але вищим вмістом гліадинів та розчинних полімерних білків, завдяки чому має м'якшу та менш еластичну (пружну) клейковину. Сорти спельти також відрізнялися за вмістом окремих незамінних амінокислот: аргініну, аспарагінової кислоти, валіну, лейцину, тирозину, містять низку мікро- та макроелементів, ненасичених жирних кислот та інших корисних речовин [4]. Крім того, борошно із зерна спельти має унікальні смакові якості і високий вміст вітамінів групи В [5], а також придатне для виготовлення кращих за якістю кондитерських виробів [1–3]. Однак широкому поширенню цієї культури перешкоджає її низька врожайність і ряд морфологічних характеристик, негативних у виробничому відношенні [6]. Головним методом покращення спельти вважається міжвидова гібридизація з м'якою пшеницею.

Відомо, що хлібопекарські якості сортів пшениці визначаються фізичними властивостями клейковинного комплексу зерна, який утворюють білки гліадини та глютеніни. Ці білки належать до класу запасних (за їх біологічною

функцією у рослин), або клейковинних (за їх технологічним використанням) [7]. Серед них важливе місце за ефективністю займають QTL і генні структури, що визначають склад високомолекулярних субодиниць глютенінів (HMW-GS). Локуси високомолекулярних субодиниць глютенінів *Glu-A1*, *Glu-B1* та *Glu-D1* розміщені на довгих плечах хромосом 1AL, 1BL и 1DL м'якої пшениці. Вони кодують високомолекулярні поліпептиди, які за рахунок міжмолекулярних дисульфідних зв'язків формують основний каркас клейковини і характеризуються меншим, ніж гліадини, поліморфізмом [8].

Поліморфізм запасних білків використовується для вивчення генетичного різноманіття спельт [9–11]. Серед алелів гліадинів і високомолекулярних субодиниць глютенінів у спельти виявлені як такі, що ідентичні алелям м'якої пшениці, так і нові, виявлені лише у спельт [12]. Водночас на сьогодні розроблені молекулярні методи з використанням ПЛР для вивчення генетичного поліморфізму за нуклеотидними послідовностями генів, що контролюють якісні показники зерна пшениці. ДНК-маркери розроблені до послідовностей генів високомолекулярних глютенінів для полегшення селекції за допомогою маркерів (MAS) та раннього добору генотипів з хорошою хлібопекарською якістю [13–15]. Зокрема, розроблені кодомінатні маркери, придатні для аналізу субодиниць високомолекулярних глютенінів, які кодуються локусами *Glu-A1* і *Glu-D1* [16]. У зв'язку з цим метою нашої роботи було визначення алельного стану генів локусів *Glu-A1* та *Glu-D1* у батьківських компонентів – зразків озимої спельти і сортів м'якої пшениці – та їх міжвидових гібридів, а також порівняльний аналіз сполучень окремих локусів із проявом ознак якості зерна.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження були зразки спельти з колекції Інституту фізіології рослин і

генетики НАН України, а також прості та беккросні гібриди першого та другого насіннєвих поколінь, отримані при їх схрещуванні з сортами м'якої пшениці Наталка і Зимоярка.

Для проведення мультиплексної полімеразної реакції з метою виявлення алельного стану генів *Glu-A1*, що відповідають за синтез білкових субодиниць Ax1, Ax2*, Ax-null використовували праймери UMN19F (5'-CGAGA CAATATGAGCA-GCAAG-3') та UMN19R (5'-CTGCCATGGAGAAGTTGGA-3') до цільового гена та праймери до референтного гена пшениці *actin*. Режим ампліфікації: денатурація – 94°C 3 хв та 34 цикли: денатурація – 94°C 30 с, відпал – 60°C 30 с, елонгація – 72°C 30 с, кінцева елонгація – 72°C 5 хв. Продукти ПЛР розділяли у 2,0 %-му агарозному гелі з бромистим етидієм у 1xSB електродному буфері. Розмір очікуваних ампліконів становив для алеля Ax2* (алель *b*, амплікон 344 п.н.), для алелів Ax1 або Ax-null (алелі *a* або *c* спостерігали амплікон 362 п.н.). Амплікон розміром 507 п.н. детектує наявність референтного гена пшениці *actin* та вказує на адекватність перебігу полімеразної реакції.

Виявлення алелів локусів *Glu-D1* базується на проведенні дуплексної полімеразної реакції (одночасне виявлення алелів генів), які кодують субодиниці Dx5 та Du10 (5+10) і Dx2 та Du12 (2+12) у сортах і селекційних гібридах м'якої пшениці з використанням специфічних праймерів UMN25F: (5'-GGGACAATACGA GCAGCAA-3') – для Dx2 ; UMN25R: (5'-TTG

TTCCGGTTGTTGCCA-3') для Dx5; UMN26F: (5'-CGCAAGACAATATGAGCAAAC-3') для Du10; UMN26R: (5'-TTGCSTTTGTCTGTG TGC-3') для Du12. Для зразків із субодиницями 5+10 спостерігали наявність ампліконів 397 та 281 п.н., із субодиницями 2+12 – ампліконів 415 і 299 п.н. Режим ампліфікації: денатурація – 94°C 3 хв та 34 цикли: денатурація – 94°C 30 с, відпал – 60°C 30 с, елонгація – 72°C 1 хв, кінцева елонгація – 72°C 5 хв. Продукти ампліфікації візуалізували після їх електрофоретичного розділення в 2,5 %-му агарозному гелі в ультрафіолетовому світлі із залученням етидій броміду як фарбувального реагенту.

Результати та обговорення

Електрофоретичне визначення продуктів ампліфікації ДНК показало, що у наявних колекційних зразків спельти були виявлені алелі *a* або *c* у локусі *Glu-A1* та відсутність алеля *b*, проте були виділені генотипи, що розрізнялися за наявністю алелів *a* і *d* у локусі *Glu-D1*. Такі контрастні форми були нами використані для проведення гібридизації (табл. 1).

Під час аналізу батьківських компонентів та міжвидових гібридів на наявність алелів локусу *Glu-A1*, результати якого представлені на рис. 1, виявлено, що у всіх зразків були визначені алелі *a* або *c* у геномі А, про що свідчить наявність амплікону довжиною 362 п.н.

Гібрид УК 10С/15 × Наталка характеризується відсутністю алеля *a* локусу *Glu-D1* (рис. 2), як і його батьківські компоненти.

Таблиця 1. Наявність алелів локусів *Glu-1*, що кодують синтез високомолекулярних глютенінів у батьківських компонентів гібридів

№ з/п	Назва зразка	<i>Glu-A1</i>		<i>Glu-D1</i>	
		<i>a/c</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>d</i>
1	УК 2 С/15	+	-	+	-
2	УК 3С/15	+	-	+	-
3	УК 4С/15	+	-	+	-
4	УК 5 С/15	+	-	+	+
5	УК 7С/15	+	-	+	+
6	УК 8С/15	+	-	+	-
7	УК 9С/15	+	-	+	+
8	УК 10 С/15	+	-	-	+
9	УК 11С/15	+	-	+	+
10	Наталка	+	-	-	+
11	Зимоярка	+	-	+	-

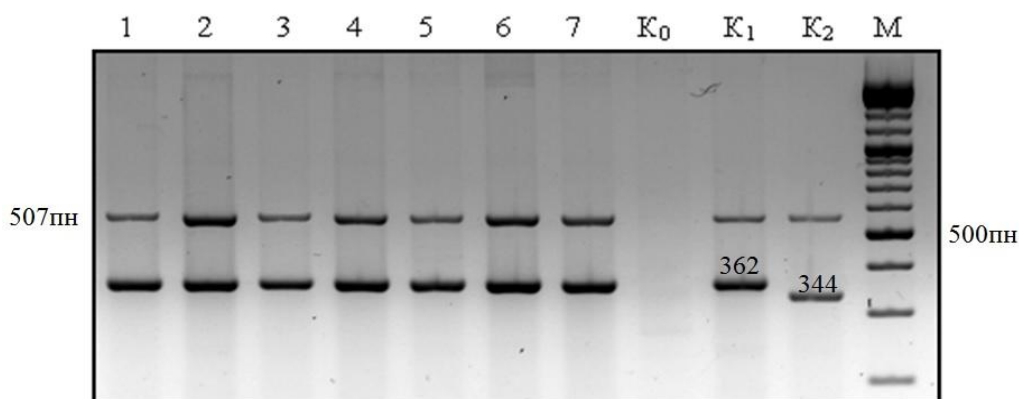


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК батьківських форм та гібридів *Triticum spelta* L. × *T. aestivum* L. із праймерами до алелів локусу Glu-A1 та референтного гена *actin*. Доріжки: 1 – УК 2С/15; 2 – УК 5С/15; 3 – УК 10С/15; 4 – Наталка; 5 – (УК 2С/15 × Наталка); 6 – (УК 5С/15 × Зимоярка); 7 – (УК 10С/15 × Наталка) K₀ – негативний контроль без додавання ДНК (ТЕ буфер); K₁ – позитивний контроль (пшениця, що містить алель *Glu-A1a/c*); K₂ – позитивний контроль (пшениця, що містить алель *Glu-A1b*); М – маркер молекулярної маси ДНК Ladder Mix.

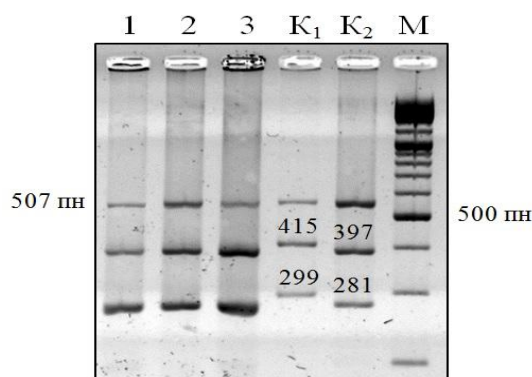


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК батьківських форм та гібрида *Triticum spelta* L. × *T. aestivum* L. з праймерами до алелів локусу Glu-D1. Доріжки: 1 – (УК 10 С/15 × Наталка); 2 – УК 10 С/15; 3 – Наталка; K₁ – контроль (пшениця, що містить алель *Glu-D1a*), K₂ – контроль (пшениця, що містить алель *Glu-D1 d*); М – маркер молекулярної маси ДНК Ladder Mix.

Нами проведений ДНК-аналіз простих гібридних комбінацій *Triticum spelta* L. × *T. aestivum* L., батьківські компоненти яких розрізняються наявністю або відсутністю алелів *a* та *d* локусу Glu-D1. Як і очікувалося, у проаналізованих форм виявлено як алелі батьківського компонента, так і материнського, що підтвердило гібридність отриманих рослин. Слід зазначити, що у випадку, коли батьківські компоненти мали різні алелі, вони виявлялися у гібрида з однаковою інтенсивністю (рис. 3, дор. 9–12), у той час як за наявності і у батьківського, і у материнського компонента однакових алелів інтенсивність забарвлення фрагментів збільшувалася, що може свідчити про багатокопійність (рис. 3, дор. 7, 8, 13, 14).

Відомо, що великий на якість борошна пшениці мають алелі локусу Glu-D1. Наступни-

ми за впливом є алелі локусів Glu-B1 і Glu-A1 [17]. Алельні варіанти високомолекулярних глютенінів 1A1, 1A2*, 1B 7 + 8, 1B 77 + 8, 1D 5 + 10 визначають високі показники якості зерна та хлібопекарські властивості пшениці [18]. Доведено існування тісної кореляційної залежності між присутністю/відсутністю певних алелів локусів Glu-1 і показниками хлібопекарської якості. Встановлено, що алель *d* локусу Glu-D1 (за якого синтезуються субодиниці 5 та 10) з індексом якості 4 має виражений позитивний вплив на якість борошна. З іншого боку, поширений алель *a* (субодиниці 2 та 12) має негативний вплив на отримання якісного формового хліба, проте рекомендований для сортів, які використовуються для виготовлення подового хліба, локшини та кондитерських виробів.

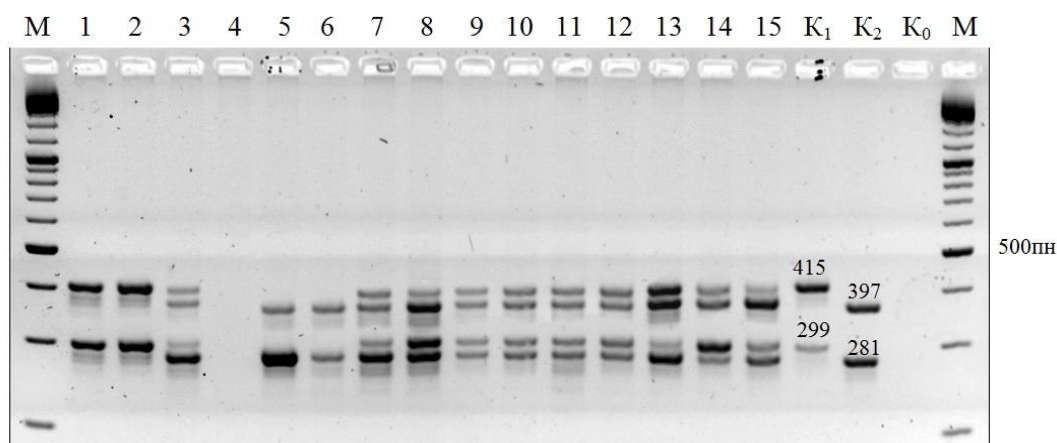


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК батьківських форм та гібридів *Triticum spelta* L. × *T. aestivum* L. з праймерами до алелів локусу Glu-D1. Доріжки: 1 – Зимоярка; 2 – УК 2С/15; 3 – УК 5С/15; 4 – Полба (відсутність геному D); 5 – УК 10С/15; 6 – Наталка; 7 – (УК 7С/15 × Наталка); 8 – (УК 5С/15 × Наталка); 9 – (УК 3С/15 × Наталка); 10 – (УК 4С/15 × Наталка); 11 – (УК 2С/15 × Наталка); 12 – (УК 8С/15 × Наталка); 13 – (УК 9С/15 × Наталка); 14 – (УК 11С/15 × Наталка); 15 – (УК 10С/15 × Зимоярка); K₀ – негативний контроль без додавання ДНК (ТЕ буфер); K₁ – позитивний контроль (пшениця, що містить алель *Glu-D1 a*); K₂ – позитивний контроль (пшениця, що містить алель *Glu-D1 d*); М – маркер молекулярної маси ДНК Ladder Mix.

При аналізі зразка спельти УК 10С/15 (табл. 2) було виявлено, що наявність алеля *d* локусу Glu-D1 зумовлює зниження білка, проте підвищується показник седиментації, який був вищим, ніж у зразків УК 2С/15 та УК 5С/15, які мали алелі *a* та *a+d* відповідно. Водночас зразок спельти УК 2С/15 з алелем *a* має вдвічі більшу твердозерність порівняно з носіями алелів *d* та *a+d*.

Аналізуючи гібридні комбінації *Triticum spelta* L. × *T. aestivum* L., батьківські компоненти яких розрізняються наявністю або відсутністю алелів *a* та *d* локусу Glu-D1 було виявлено, що у гібрида (УК 10С/15 × Наталка), батьківські компоненти якого характеризуються наявністю тільки алеля *d*, хлібопекарські властивості перевершували гібрид (УК 2С/15 × Наталка) (табл. 3), в якого були наявні *a* та *d* алелі локусу Glu-D1. Це підтверджує, що алель *d* має біль-

ший вплив на хлібопекарські властивості борошна, проте цей гібрид потребує більш детального вивчення, адже не встановлено, який саме алель у локусі Glu-A1 був присутній.

У беккросного гібрида ((Наталка × УК 2С/15) × Наталка) був найбільший показник седиментації (табл. 2) та кращі хлібопекарські властивості (табл. 3), проте вміст білка знижувався. У беккросного гібрида (УК 2С/15 × (Наталка × УК 2С/15)) спостерігалася протилежна тенденція.

Головними показниками якості тіста є співвідношення пружності до еластичності тіста, «індекс еластичності тіста» та сила борошна. Вважається, якщо «індекс еластичності тіста» вищий 60 %, то зразки борошна кращі за якістю, нижчий – середньої та задовільної якості. Так, гібриди мали цей показник від 47,3 % до 63,9 %, що значно вище, ніж у зразків спельти.

Таблиця 2. Результати біохімічного аналізу зерна спельти

Назва зразка	Білок, %	Клейковина, %	Твердозерність	SDS-30
УК 2С/15	17,4	37,5	16	13
УК 5С/15	16,7	35,9	8	13
УК 10С/15	15,6	33,4	8	32
Наталка	14,1	30,0	37	93
(УК 10С/15 × Наталка)	16,2	34,7	13	76
(УК 2С/15 × Наталка)	16,7	35,9	12	38
((Наталка × УК 2С/15) × Наталка)	16,4	35,3	10	87
(УК 2С/15 × (Наталка × УК 2С/15))	17,6	38,0	11	28

Таблиця 3. Результати хлібопекарських властивостей батьківських форм та гібридів

Назва зразка	Пружність тіста	P/L	Сила борошна, а.о.	ВПЗ борошна, %	Індекс еластичності	Об'єм хліба з 100 г борошна	Загальна хлібопекарська оцінка
УК 2С/15	27	0,2	67	58,2	30,7	710	6,1
УК 5С/15	31	0,2	87	58,6	38,2	760	6,4
УК 10С/15	32	0,2	83	56,2	35,3	780	6,5
Наталка	91	0,8	357	59,0	62,6	1040	8,0
(УК 10С/15 × Наталка)	55	0,3	303	58,4	63,0	920	7,3
(УК 2С/15 × Наталка)	52	0,3	263	57,6	63,9	800	6,5
((Наталка × УК 2С/15) × Наталка)	31	0,2	144	58,0	54,5	980	7,9
(УК 2С/15 × (Наталка × УК 2С/15))	38	0,2	143	60,6	47,3	730	6,2

Висновки

ДНК-аналіз алельного стану генів локусів Glu-A1 та Glu-D1 у зразків озимої спельти та їх міжвидових гібридів з м'якою пшеницею дозволив виділити зразки спельти та гібридні комбінації, які можуть бути перспективними для подальшої селекційної роботи. Показано, що наяв-

ність алеля *d* локусу Glu-D1 підвищує хлібопекарські властивості гібридів. Отже, генетичне поліпшення спельти шляхом міжвидової гібридизації з сортами м'якої пшениці, які містять лише алель *d* локусу Glu-D1, може привести до створення ліній із підвищеним вмістом білка і хорошими хлібопекарськими якостями.

Література

- Jorgensen J.R., Olsen C.C. Yield and quality assessment of spelt (*Triticum spelta* L.) compared with winter wheat (*Triticum aestivum* L.) in Denmark // Spelt and Quina. – Working Group Meeting (24–25 Oct. 1997). – Wageningen, the Netherlands, 1997. – P. 33–38.
- Eltun R., Aasven M. The possibilities for spelt cultivation in Norway // Spelt and Quina. – Working Group Meeting (24–25 Oct. 1997). – Wageningen, the Netherlands, 1997. – P. 7–13.
- Dahlstedt L. Spelt Wheat (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* (L.)) An alternative crop for ecological farming systems // Spelt and Quina. – Working Group Meeting (24–25 Oct. 1997). – Wageningen, the Netherlands, 1997. – P. 3–6.
- Galova Z., Knoblochova H. Biochemical characteristics of five spelt wheat cultivars (*Triticum spelta* L.) // Acta fytotechnica et zootechnica. – 2001. – V. 4. – P. 85–87.
- Campbell K.G. Spelt: agronomy, genetics, and breeding // Plant Breeding Rev. – 1997. – № 15. – P. 187–213.
- Шелепов В.В., Гаврилюк Н.Н., Вергунов В.А. Пшеница: биология, морфология, селекція, семеноводство. – К.: Логос, 2013. – 498 с.
- Чеботарь С.В., Благодарова Е.М., Куракина Е.А., Семенюк И.В., Полищук А.М., Козуб Н.А., Созинов И.А., Хохлов А.Н., Рыбалка А.И., Сиволап Ю.М. Генетический полиморфизм локусов, определяющих хлебопекарное качество украинских сортов пшеницы // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Т. 16, № 1. – С. 87–98.
- Payne P.I. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality // Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. – 1987. – V. 38. – P. 141–153.
- Нінієва А.К., Козуб Н.О., Созинов І.О., Рибалка О.І., Леонов О.Ю., Твердохліб О.В., Богуславський р.Л. Характеристика зразків *Triticum spelta* L. за показниками якості зерна та електрофоретичними спектрами запасних білків // Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2013. – Т. 11, № 1. – С. 96–105.
- Романова Ю.А., Губарева Н.К., Конарев А.В., Митрофанова О.П., Ляпунова О.А., Анфилова Н.А., Стрельченко П.П. Исследование коллекции вида пшеницы *Triticum spelta* L. по полиморфизму глиадинов // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 9. – С. 1258–1265.
- Козуб Н.А., Богуславский р.Л., Созинов И.А., Твердохлеб Е.В., Ксиниас И.Н., Блюм Я.Б., Созинов А.А. Аллели по локусам запасных белков у образцов *Triticum spelta* L. и их встречаемость у родственных пшениц // Цитология и генетика. – 2014. – Т. 48, N 1. – С. 41–51.
- An X., Qiaoyun L., Yueming Y., Yinghua X., Hsam S.L., Zeller F.J. Genetic diversity of European spelt wheat (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L. em. Thell.) revealed by glutenin subunit variations at the Glu-1 and Glu-3 loci // Euphytica. – 2005. – V. 146. – P. 193–201.
- Obreht D., Kobiljski B., Djan M., Vapa L. Identification of *Glu-B1* alleles in bread wheat cultivars using PCR // Genetica. – 2007. – V. 39, N 1. – P. 23–28.
- Gale K.R. Diagnostic DNA markers for quality traits in wheat // J Cereal. – 2005. – Sci 41. – P. 181–192.

15. Schwarz G., Felsenstein F.G., Wenzel G. Development and validation of a PCR-based marker assay for negative selection of the HMW glutenin allele Glu-B1-1d (Bx-6) in wheat // *Theor Appl Genet.* – 2004. – V. 109. – P. 1064–1069.
16. Liu S., Chao S., Anderson J. New DNA markers for high molecular weight glutenin subunits in wheat // *Theor Appl Genet.* – 2008. – V. 118. – P. 177–183.
17. Boisson M., Mondon K., Torney V., Nicot N., Laine A.L., Bahrman N., Gouy A., Daniel-Vedele F., Hirel B., Sourdille P., Dardevet M., Ravel C., Le Gouis J. Partial sequences of nitrogen metabolism genes in hexaploid wheat // *Theor. Appl. Genet.* – 2005. – V. 110, № 5. – P. 932–940.
18. Панченко І.А., Усова З.В., Питула Н.М. та ін. Інформаційна цінність та успадкування алельних варіантів блоків високомолекулярних глютенінів в селекції озимої пшениці на якість зерна // *Селекція і насінництво.* – 2007. – Вип. 94. – С. 115–128.

SICHKAR S.M., VELIKOZHON L.H., DUBROVNA O.V.

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: sichkar07@gmail.com

ANALYSIS OF Glu-1 LOCI IN HYBRID TRITICUM SPELTA L. × TRITICUM AESTIVUM L.

Aim. Determination of allelic status of genes in samples of winter spelt and bread wheat varieties and their interspecific hybrids, as well as a comparative analysis of specific combinations of loci and characteristics of grain quality. **Methods.** We used the method of multiplexed PCR. **Results.** DNA analysis of allelic status of genes of loci Glu-A1 and Glu-D1 in samples of winter spelt and their interspecific hybrids with bread wheat samples allowed to isolate spelt and hybrid combinations that could be promising for further breeding. It was shown that the allele *d* of locus Glu-D1 improves the baking properties of hybrids. **Conclusions.** Genetic improvement spelt by interspecific hybridization with varieties of bread wheat that contain only *d* allele of locus Glu-D1 can give rise to lines with high protein and good baking qualities. **Keywords:** *Triticum spelta* L., *T. aestivum* L., PCR, loci Glu-1, PCR-analysis.