

УДК 633.11:577.21

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЛОКУСОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ХЛЕБОПЕКАРНОЕ КАЧЕСТВО УКРАИНСКИХ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ

© 2012 г. С.В. Чеботарь¹, Е.М. Благодарова², Е.А. Куракина³,
И.В. Семенюк¹, А.М. Полищук¹, Н.А. Козуб⁴, И.А. Созинов⁴,
А.Н. Хохлов², А.И. Рыбалка², Ю.М. Сиволап¹

¹ Южный биотехнологический центр в растениеводстве НААН, Одесса, Украина,
e-mail: s.v.chebotar@gmail.com;

² Селекционно-генетический институт–Национальный центр
семеноводства и сортоизучения НААН, Одесса, Украина;

³ Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова,
кафедра генетики и молекулярной биологии, Одесса, Украина;

⁴ Институт защиты растений НААН, Киев, Украина

Поступила в редакцию 21 ноября 2011 г. Принята к публикации 20 декабря 2011 г.

Представлен обзор исследований генетического полиморфизма локусов, определяющих хлебопекарное качество украинских сортов пшеницы, с помощью электрофореза запасных белков глиадинов и глютеинов, а также ПЦР-анализа. Представлены результаты анализа полиморфизма в локусах *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* и *Glu-A3* и аллельного состава генов пуриноидинов *Pina-D1* и *Pinb-D1*, контролирующих показатель «твердозерность», а также генов *Wx*, определяющих содержание амилозы в крахмале эндосперма. Сравнение результатов изучения генетического полиморфизма методом ПЦР с аллель-специфичными праймерами к локусам γ -глиадинов с методом электрофореза запасных белков показало возможность идентификации некоторых аллелей генов запасных белков методом ПЦР, однако в целом уровень полиморфизма в γ -глиадиновых локусах, выявленный при использовании ПЦР, был ниже, чем при анализе с помощью электрофореза запасных белков. В локусах *Pin* у большинства сортов выявлены ПЦР-аллели, характерные для твердозерных пшениц, лишь у трех сортов обнаружены аллели, свойственные мягкозерным пшеницам. Отмечены различия по уровню твердозерности у сортов из различных селекционных центров Украины. ПЦР-анализ не выявил в изученной выборке украинских сортов нуль-аллелей генов *Wx*, однако позволил отобрать исходный материал для дальнейшего создания сортов с низким содержанием амилозы.

Ключевые слова: мягкая пшеница, ПЦР, электрофорез, глиадины, глютеины, твердозерность, гены пуриноидинов, гены *Wx*.

Известны три основные генетические системы, контролирующие хлебопекарное качество мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) как сложный полигенный признак. Это гены *Glu*, определяющие компонентный состав высокомолекулярных (HMW) и низкомолекулярных (LMW) запасных белков глютеинов; гены *Gli*, кодирующие спирторастворимые белки глиадины и локус *Ha*, детерминирующий консистенцию эндосперма (Созинов, 1985; Попереля, 1996).

Каждый из локусов запасных белков (кроме *Gli-3*) является полигенным, кластерным и ко-

дирует по несколько полипептидов, кроме того, каждый локус является полиморфным и представлен серией из 3–40 аллельных вариантов (Payne *et al.*, 1984; Попереля, Собко, 1987).

В настоящее время известны 7 основных глиадинкодирующих локусов (*Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1*, *Gli-A2*, *Gli-B2*, *Gli-D2* и *Gli-3* (*Gli-A3*)), а также 4 дополнительных локуса (*Gli-A5*, *Gli-B5*, *Gli-6* (*Gli-A6*), *Gli-7* (*Gli-D7*)), которые тесно сцеплены (0–5 % рекомбинации) с основными (Попереля, Собко, 1987; McIntosh *et al.*, 2008). Описаны 4 локуса, кодирующие низкомолекулярные (LMW) субъединицы глютеинов

(*Glu-B2*, *Glu-A3*, *Glu-B3* и *Glu-D3*) и 3 локуса высокомолекулярных (HMW) глютенинов (*Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*) (Payne *et al.*, 1984).

Гены HMW-субъединиц глютенинов локализованы в длинных плечах хромосом 1A, 1B и 1D. Они кодируют высокомолекулярные полипептиды, которые за счет межмолекулярных дисульфидных связей формируют основной каркас клейковины и характеризуются меньшим, чем глиадины, полиморфизмом (Payne *et al.*, 1984). Локусы низкомолекулярных (LMW) глютенинов *Glu-A3*, *Glu-B3* и *Glu-D3* расположены в коротких плечах хромосом первой группы рядом с глиадиновыми локусами *Gli-1*, и рекомбинации между ними не наблюдается (Попереля, 1996; Ma *et al.*, 2009).

Изучение полиморфизма глютенинов проводится двумя методами: электрофорезом в SDS-геле по модифицированной методике Леммли (Payne *et al.*, 1984) и с помощью кислого электрофореза, который был разработан в Селекционно-генетическом институте (СГИ, Одесса). Последний метод позволяет разделять полипептиды не только по молекулярной массе, но и по заряду молекулы (Попереля, 1996). В настоящее время при анализе глиадинов в полиакриламидном геле (ПАА) активно используются две номенклатуры аллелей: по Метаковскому (Metakovsky, 1991) – с обозначением каждого блока компонентов буквами и по Попереле (1996) – с использованием числовых обозначений (например, *Gli A1b* и *Gld IA 4* – два обозначения аллеля глиадинкодирующего локуса у сорта Безостая 1). Таблица соответствия обоих систем идентификации аллелей приведена в работе С.Ф. Коваля (2005), однако, по нашему мнению, приводимое автором соответствие все же содержит ряд неточностей. Сложность такого сопоставления состоит в том, что состав геля для электрофореза, а следовательно, и подвижность компонентов запасных белков при использовании каждой методики различаются, при этом компоненты могут меняться местами на геле, объединяться и т. д., поэтому в своей статье мы используем обе номенклатуры.

Исторически сложилось так, что в СГИ применялась собственная номенклатура для запасных белков (Попереля, 1996), так как здесь была разработана первая методика для электрофореза глиадинов в крахмальном, а потом и в

полиакриламидном геле, в середине 1970-х гг. был сконструирован прибор для электрофореза. Таким образом, практически весь селекционный материал, создаваемый в СГИ, анализировался именно по этой методике на протяжении более 30 лет. Кроме того, данную номенклатуру активно использовали ученые из стран-членов СЭВ. Это делает, на наш взгляд, возможным и оправданным применение в настоящее время наряду со стандартной методикой (Metakovsky, 1991) системы Ф.А. Поперели. Чтобы было понятно, о какой системе идет речь в каждом конкретном случае, мы и используем обозначение *Gld* для записи генотипа по системе Ф.А. Поперели и *Gli* – по стандартной методике Метаковского (1991).

Анализ распространения аллелей глиадин- и глютенинкодирующих локусов у 85 сортов озимой мягкой пшеницы современной селекции среди различных селекционных центров Украины показал, что каждый центр селекции имеет набор сортов с близким составом запасных белков. На состав запасных белков в сортах пшеницы различных селекционных центров влияют климатические условия, приоритет требований к сорту, источники исходных форм, история селекции в данном центре. Так, частота аллеля *Gld IA 2*, связанного с повышенной влаголюбивостью, была выше в зоне лесостепи, являясь при этом очень низкой в степной зоне (Благодарова и др., 2004). Аллель *Gld IA 8* присутствует только у сортов селекции Института растениеводства им. В.Я. Юрьева, а *Gld IA 10* – только у сортов СГИ. Согласно приведенным исследованиям у украинских сортов встречается 6 аллелей по локусу *Gli-A1*, 5 – по *Gli-B1*; 6 – по *Gli-D1* (при этом фактически локус *Gli-D1* представлен двумя семействами аллелей, различающимися внутри себя только минорными компонентами), 3 – в локусе *Gli-A2*; 4 – в *Gli-B2*; 4 – в *Gli-D2* и 3 в *Gli-A3*. У сортов, выращиваемых в степной зоне, формула аллелей, определяемых по компонентам блоков запасных белков, приближается к формуле сорта Альбатрос одесский. В то же время показано, что некоторые сорта Украины имеют «новые» гены запасных белков, введенные в генофонд с 90-х годов 20-го века, связанные с повышенным уровнем хлебопекарного качества: *Gld 1 A10 (Gli-A1g)*, *Gld 1 B15 (Gli-B1c)* и *Glt 1B5 (Glu-B1 77+8)*.

Полиморфизм глютенинов, выявляемый в украинских сортах пшеницы, не столь значителен. По локусам *Glu* в хромосомах 1А и 1В детектируется по 3 аллеля, а 98 % украинских сортов не различаются по аллельному составу *Glu-D1* локуса и имеют блок 5+10 (по Райне *et al.*, 1984). Судя по многочисленным публикациям, этот аллель связан с самым высоким уровнем хлебопекарного качества и по 4-балльной шкале оценивается в 4 балла (Райне *et al.*, 1981; Созинов, 1985; Попереля, 1996).

Достоверные различия, подтверждающие вклад «новых» аллелей запасных белков в определение наследственно обусловленного уровня хлебопекарного качества зерна, были получены при анализе 2 тыс. гибридных линий F₄–F₆ от скрещивания сортов Одом и Одесская красноколосая (табл. 1) (Popereleya *et al.*, 1998; Попереля, Благодарова, 1998).

Из табл. 1 следует, что наибольший вклад в определение хлебопекарного качества вносят локус *Glt 1D* (*Glu-D1*) и новый для сортов Украины аллель *Glt 1 B5*, (*Glu-B1 77+8*), наличие которого может существенно повысить хлебопекарное качество. Позднее было показано, что этот аллель возник в результате мутации – дубликации генов одного из двух полипептидов, кодируемых этим локусом. По международной номенклатуре, из аллеля *Glu-B1 7+8* возник аллель *Glu-B1 77+8* (Butow *et al.*, 2003). В настоящее время этот аллель вводится в генотипы сортов СГИ, и его имеют многие районированные сорта, например, Селянка, Кукляник и др.

В СГИ применяется разработанная Ф.А. Поперелей (1996) классификация сортов пшеницы по качеству зерна в соответствии с их генети-

ческими формулами, согласно которой все сорта делятся на 8 классов, от сверхсильной пшеницы (SA) до пшеницы с очень низким хлебопекарным качеством (F).

В настоящее время в работу по изучению генетического полиморфизма локусов, определяющих генетически обусловленное качество зерна сортов мягкой пшеницы, в Одессе привлекаются новые методы исследования. С одной стороны, это вызвано тем, что были открыты новые гены, определяющие показатели качества зерна, например, гены *Wx*, которые вовлечены в контроль синтеза амилозы, входящей в состав крахмала эндосперма (Graybosch *et al.*, 1998), созданы трансгенные формы пшеницы с увеличенными дозами генов, кодирующих HMW глютенины (Barro *et al.*, 2003; Butow *et al.*, 2003). С другой стороны, появились новые молекулярные методы изучения генетического полиморфизма не только по продуктам генов (запасным белкам), но и по нуклеотидной последовательности генов, контролирующей качественные показатели зерна пшеницы, с использованием ПЦР для идентификации аллелей (Zhao *et al.*, 2006, 2007; Wang *et al.*, 2009; Reynolds *et al.*, 2010).

Твердозерность мягкой пшеницы также является одной из важнейших характеристик качества зерна и имеет отношение к размолу зерна, замесу теста и изготовлению хлебулочных изделий. В зависимости от выраженности этого признака зерно пшеницы может быть отнесено к хлебопекарному или кондитерскому типу, а уже в рамках данных типов ценность зерна определяется такими показателями, как содержание белка, качество клейковины, амилитическая способность и др. Твердозерность

Таблица 1

Вклад аллелей локусов запасных белков в определение хлебопекарного качества зерна, согласно Popereleya с соавт. (1998), Попереля, Благодарова (1998) с дополнениями

Сравниваемые аллели Popereleya <i>et al.</i> , 1998	Сравниваемые аллели по стандартным методикам	«Сила» муки, е.а.	Объем хлеба, см ³
<i>Gld 1A 10 – Gld 1A 4</i>	<i>Gli -A1g – Gli- A1b</i>	+6	+23
<i>Gld 1B 15 – Gld 1B 1</i>	<i>Gli-B1c – Gli- B b</i>	+19	+23
<i>Glt 1B 5 – Glt 1B 1</i>	<i>Glu –B1 77+8 – 7+8</i>	+53***	+71**
<i>Glt 1D 4 – Glt 1D 1</i>	<i>Glu-D1 2+12 –5+10</i>	–81***	–92***

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

рассматривается как особенность структуры эндосперма, определяющая способность зерна противостоять разрушению в процессе размола и влияющая, таким образом, на гранулометрический состав зерна (Хохлов, 2002). При размоле эндосперм твердозерных сортов раскалывается на крупные частицы – фрагменты белкового матрикса с плотно встроенными крахмальными гранулами, многие из которых разрушаются по линии раскола. Поэтому мука таких пшениц является рассыпчатой. Слишком высокая твердость иногда считается недостатком, так как приводит к чрезмерным затратам энергии во время помола. В противоположность твердозерным сортам эндосперм мягкозерных сортов во время размола рассыпается на мелкие фрагменты, поэтому мука заметно тоньше, «мягче». Она содержит большее количество свободных частиц белкового матрикса и индивидуальных крахмальных гранул. Поверхность последних гладкая и чистая, степень их разрушения значительно меньше, чем у твердозерных сортов. Разница в структуре муки определяет ее поведение при замесе теста. Имея вдвое меньшую удельную поверхность, мука твердозерных сортов, тем не менее, имеет значительно большую водопоглощающую способность, обусловленную примерно вдвое большей степенью повреждения крахмальных гранул в сравнении с мукой мягких сортов. «Открытость» крахмальных гранул для действия амилаз проявляется также в большей газообразующей силе при брожении. «Липкие» поверхности сколотых крахмальных гранул, очевидно, придают механическую жесткость макроструктуре теста. Все эти особенности желательны для сортов пшеницы, используемых для выпечки из обычного дрожжевого теста при условии достаточного количества сильной клейковины (Финни, Ямазаки, 1970; Беркутова, Швецова, 1984; Wrigley, 1994).

Мука наиболее мягкозерных типов («very soft» и «extra soft») хотя и создает некоторые проблемы при размоле, может быть востребованной при изготовлении кондитерских изделий и в других специальных применениях (Хохлов, 2002).

Твердозерность контролируется несколькими тесно сцепленными генами, которые локализованы в коротком плече 5D-хромосомы в

локусе *Ha* (*Hardness*). В этом локусе находятся гены, кодирующие три полипептида, составляющие белок фриабилин: пуриноидины *a* (*Pina-D1*) и *b* (*Pinb-D1*), а также Grain Softness Protein (*GSP1*) (Jolly *et al.*, 1996; Sourdille *et al.*, 1996; Giroux, Morris, 1998). Белок фриабилин имеет размер около 15 кДа и локализуется на поверхности крахмальных гранул у пшеницы с мягкой текстурой эндосперма (Capparelli *et al.*, 2003). Взаимодействие фриабилина с крахмальными гранулами происходит за счет как гидрофобных, так и ионных связей. Пуриноидины и *GSP1* найдены как у твердо- так и у мягкозерных сортов пшеницы, но степень их адгезии на поверхности крахмальных гранул варьирует в зависимости от генотипа пшеницы (Turner *et al.*, 1999). При этом уровень адгезии фриабилина на поверхности крахмальных зерен коррелирует с твердозерностью пшеницы (Ikeda *et al.*, 2005). У сортов твердой пшеницы (*T. durum*) этот белок отсутствует (Greenwell, Schofield, 1986). Пуриноидины *a* и *b* взаимодействуют как гетеродимеры и связывают гранулы крахмала с мембранными липидами амилопластов. Эти полипептиды являются представителями специфической группы низкомолекулярных белков злаков, характеризующихся высоким содержанием аминокислотных остатков цистеина и триптофана (Morris, 2002).

По данным М. Giroux и С. Morris (1997), в геноме гексаплоидной пшеницы существует 3 локуса с генами *GSP*. Эти гены расположены в дистальных концах гомеологичных хромосом 5-й группы, при этом локус *GSP1* в хромосоме 5D тесно сцеплен с пуриноидинкодирующими генами.

Однако исследования мутаций и делеций в локусе *Ha*, а также работы по созданию трансгенных форм пшеницы показывают, что за разницу в текстуре зерна отвечают в основном гены, кодирующие пуриноидины. Градация признака «твердозерность» в значительной мере обусловлена комбинациями аллелей генов *Pina-D1* и *Pinb-D1* (Giroux, Morris, 1997; Morris *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2005; Ram *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Чеботарь и др., 2012). Дикий тип пшеницы *T. aestivum* имеет мягкую текстуру эндосперма, которая контролируется аллелями *Pina-D1a* и *Pinb-D1a*. У твердозерных сортов *T. aestivum* гены *Pina-D1* и *Pinb-D1*

несут (оба или один из них) мутации. Первая обнаруженная мутация, влияющая на твердозерность, приводит к замене глицина на серин в позиции 46 у пуриноидина, кодируемого геном *Pinb-D1b* (Giroux, Morris, 1997). Также был описан еще ряд аллельных состояний *Pina-D1* и *Pinb-D1* генов: мутации гена *Pina-D1* (Giroux, Morris, 1997; Chen *et al.*, 2006), различные точечные мутации в гене *Pinb-D1*, вызывающие аминокислотные замены, три мутации с образованием стоп кодонов в гене *Pinb-D1*: аллели *e, f, g* (Morris *et al.*, 2001), делеция обоих генов *Pina-D1* и *Pinb-D1* (Ikeda *et al.*, 2005) и мутации, которые приводят к сдвигу рамки считывания в *Pinb-D1* – аллели *i, p, r, s* (Ikeda *et al.*, 2005; Ram *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2005).

Физический показатель твердости зерна сортов мягкой пшеницы *T. aestivum*, исследованный на выборке 85 сортов и линий озимой мягкой пшеницы преимущественно украинского происхождения с помощью NIR (near infrared reflectance) анализа, сопоставляли с данными ПЦР-анализа аллельного состава пуриноидиновых генов (Чеботар и др., 2012). Из общего количества исследованных 85 сортов и линий пшеницы 3 имели аллельный состав генов пуриноидинов, характерный для мягкозерных сортов *Pina-D1a* и *Pinb-D1a*. Их физический показатель твердости зерна находился в пределах 20–39 ед., т. е. был типичным для группы мягкозерных пшениц. У 56 сортов генотип был определен как *Pina-D1a, Pinb-D1b*, т. е. характерный для твердозерных сортов. Диапазон твердости зерна в этой группе составил 51–85 ед., характерный для подгрупп «средней твердозерности», «твердозерные», «очень твердозерные». Сорт Цыганка, по данным Zlatska (2010), имеет генотип *Pina-D1a, Pinb-D1c*, фактическая твердость его зерна была 89 ед. (твердозерный, группа «очень твердые»).

Широкий диапазон показателя твердозерности вызвал предположение о присутствии других генетических факторов, сказывающихся на твердозерности, отличных от системы пуриноидиновых генов. Для проверки предположения нами был проведен анализ характера результатов. Он оказался близким к бимодальному «мягкозерные»/«твердозерные». При этом распределение в группе твердозерных пшениц было близким к нормальному ($\chi^2 = 5,59$, $df = 7$,

$p = 0,588$). Плавный одновершинный характер кривой распределения не дал оснований далее предполагать наличие главных генов (так называемых *major genes*), отличных от генов пуриноидинов. Из-за малой выборки группы мягкозерных пшениц проверить соответствие данных нормальному распределению не представилось возможным. Полученные данные (Чеботар и др., 2012) говорят в пользу наличия системы так называемых минорных генов (*minor genes*), которые совместным действием «растягивают» диапазон изменчивости в пределах групп «мягкозерные» и «твердозерные». Обращает на себя внимание значительная разница в твердости зерна сортов пшеницы различных селекционеров. Так, твердозерность сортов селекции Одесского СГИ была заметно ниже, чем у сортов Мироновского и Донского селекционеров. Не исключено, что эта разница обусловлена различным характером налива и созревания зерна у сортов различных экологических групп в условиях южной степи.

В связи с растущим интересом к созданию сортов мягкой пшеницы специальных групп качества, в том числе с пониженным содержанием амилозы в крахмале зерна, был изучен аллельный состав локусов *Wx* у 46 сортов озимой мягкой пшеницы, занесенных в «Государственный реестр сортов растений, рекомендованных для распространения в Украине», и отработаны методы ПЦР-анализа генетического полиморфизма по генам *Wx* с целью дальнейшего привлечения молекулярных маркеров в селекционный процесс в СГИ (Семенюк и др., 2011).

Как известно, основным компонентом эндосперма зерна пшеницы является крахмал, который состоит на 20–30 % из амилозы и 70–80 % из амилопектина. Оба полисахарида являются полимерами глюкозы, при этом амилоза имеет линейную структуру, а амилопектин – разветвляющуюся (Graybosch *et al.*, 1998). Процентное содержание амилозы используется как один из параметров характеристики крахмала муки. У обычных сортов мягкой пшеницы диапазон варьирования амилозы в содержании крахмала ограниченный (20–30 %), в то время как у риса этот показатель варьирует от 0 до 30 % (Nakagahra *et al.*, 1986). В Японии были созданы так называемые «восковые» (*Waxy*) сорта пшеницы (без амилозы), мука которых

используется для производства традиционной высококачественной японской соленой лапши (Nakamura *et al.*, 1995). В селекции пшеницы в Украине также проявляется интерес к созданию «восковых» сортов мягкой пшеницы на основе местных адаптированных сортов.

Ключевым ферментом синтеза амилозы в крахмальных гранулах является гранулоязывающая крахмалсинтаза (GBSS1) или белок Wах_у (молекулярный вес 60 кДа), который кодируется генами *Wx-A1*, *Wx-B1* и *Wx-D1*, локализованными в хромосомах 7AS, 4AL и 7DS (Nakamura *et al.*, 1993).

Для локусов *Wx* установлено наличие функциональных и нефункциональных аллелей. Так, для локуса *Wx-A1* функциональными являются аллели *Wx-A1a*, *Wx-A1c*, нефункциональным – нуль-аллель *Wx-A1b*. Для локуса *Wx-B1* также выявлен нуль-аллель *Wx-B1b* и варианты функциональных аллелей *Wx-B1a*, *Wx-B1c*, *Wx-B1d* и *Wx-B1f*. Для локуса *Wx-D1* показаны два варианта нуль-аллелей *Wx-D1b*, *Wx-D1e* и серия функциональных аллелей: *Wx-D1a*, *Wx-D1c*, *Wx-D1d* и *Wx-D1f* (McIntosh *et al.*, 2003). Различное сочетание нуль-аллелей и функциональных аллелей в *Wx-A1*, *Wx-B1* и *Wx-D1* локусах приводит к различиям по содержанию амилозы в крахмале зерна пшеницы. А объединение в одном генотипе трех нуль-аллелей по *Wx*-локусам ведет к формированию «восковых» пшениц с нулевым содержанием амилозы в крахмале (Nakamura *et al.*, 1995).

Нами проанализировано 46 сортов пшеницы и 2 линии, Wx-15 и Wx-12, с помощью аллель-специфичных праймеров к генам *Wx-A1a*, *Wx-B1* и *Wx-D1* (Петрова и др., 2006). В локусе *Wx-A1* у всех сортов выявлен алель *Wx-A1a*, нуль-аллели *Wx-B1b* и *Wx-D1b* не обнаружены. У линий Wx-15 и Wx-12 выявлены аллели *Wx-B1b* и *Wx-D1b*, специфический продукт амплификации для *Wx-A1a* у данных линий не выявлялся (Петрова и др., 2006). Полученные данные согласуются с тем, что украинские сорта мягкой пшеницы имеют нормальное содержание амилозы (20–30%). В то же время проведенные исследования являются необходимым этапом для введения маркерной селекции по генам *Wx* в селекционные программы СГИ. Так, в СГИ уже были созданы популяции F₄–F₅-рекомбинантных инбредных линий от скрещивания

сорта Куяльник (*Wx-A1aWx-A1a Wx-B1aWx-B1a Wx-D1aWx-D1a*) с линией Wx-15 (*Wx-A1bWx-A1b Wx-B1bWx-B1b Wx-D1bWx-D1b*). Аллель-специфичные праймеры были применены нами для гибридологического анализа популяции F₅, из которой отобрано 10 селекционных форм-носителей аллелей *Wx-A1bWx-A1b Wx-B1bWx-B1b Wx-D1bWx-D1b* (Петрова и др., 2008). Отобранные формы предлагаются для дальнейшего использования при создании отечественных сортов с низким содержанием амилозы.

Система молекулярных маркеров, разработанная Zhang с соавт. (2003, 2004) на основе анализа полиморфизма единичных нуклеотидов (SNPs) в γ -глиадиновых генах локусов *Gli-A1*, *Gli-B1* и *Gli-D1*, была применена для идентификации аллелей генов запасных белков с целью сравнения эффективности ПЦР-маркерной системы для дифференциации генотипов по отношению к используемому методу электрофореза запасных белков, а также с целью подбора более простой маркерной системы с высокой разрешающей способностью, применение которой может быть автоматизировано. Такая постановка задачи вызвана тем, что белковые спектры достаточно сложны и содержат одновременно продукты экспрессии многих локусов, что делает их прочтение сложным, а перевод их идентификации в автоматический режим невозможным.

Проводилось сравнение результатов идентификации аллелей генных кластеров *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* и *Glu-A3* методами электрофореза запасных белков и электрофореза продуктов ПЦР, полученных с использованием аллель-специфичных праймеров, предложенных Zhang с соавт. (2003, 2004), у 14 сортов одесской селекции и 6 почти изогенных линий (Поліщук и др., 2010). При этом для каждого сорта/линии изучались по 3 зерновки, половинка с зародышем проращивалась для выделения ДНК, а из второй половинки выполнялся электрофорез запасных белков по методике Ф.А. Поперели (1989) с идентификацией по Метаковскому (Metakovsky, 1991). В работе были использованы сорта одесской селекции: Лузановка, Зустріч, Струмок, Одесская 267, Знахідка, Любава, Фантазія, Прима, Лада, Застава, Виктория, Альбатрос и созданные М.М. Копусем на основе сорта Безостая 1 почти изогенные

линии (GLI-D1-5, GLI-B1-3, GLI-B1-4, GLI-A1-1, GLI-D1-4, GLI-B1-12), различающиеся только аллелями глиадинов.

По результатам выполненного ПЦР-анализа все изученные сорта разделились на 4 группы (табл. 2), однако по данным электрофореза запасных белков полиморфизм изученных сортов оказался выше.

Так, по локусу *Gli-A1* выявлено 4 аллеля глиадина, которым соответствовали 2 варианта аллелей, согласно результатам ПЦР-анализа. Однако при анализе каталога аллелей глиадинов (Metakovsky, 1991) видно, что по каждому локусу существуют группы блоков, различающихся между собой только 1–2 компонентами. По нашему мнению, чем меньше различаются аллели белков по количеству и подвижности компонентов, тем они ближе друг к другу генетически – по нуклеотидной последовательности.

Аллели *Gli-A1b* и *Gli-A1c* представлены блоками компонентов белков, близких по подвижности при электрофорезе в ПААГ, а аллели *Gli-A1f* и *Gli-A1o* являются очень отличающимися блоками компонентов белков друг от друга и от *Gli-A1b* и *Gli-A1c*. Таким образом, у исследованной группы сортов с помощью ПЦР-

анализа можно идентифицировать только аллель глиадинов *Gli-A1o* (ПЦР-аллель *Gli A1.2*), а генотипы с блоками глиадинов *Gli-A1f*, *Gli-A1b* и *Gli-A1c* характеризуются единым аллелем *Gli A1.1* по ПЦР.

По результатам ПЦР-анализа для локуса *Glu-A3* варианты *a*, *c* встречались с ПЦР-аллелем *Gli-A1.1* (табл. 3).

Аллель *Glu-A3d* четко соответствует аллелю глиадина *Gli-A1o* и ПЦР-аллелю *Gli-A1.2*. Это дает возможность идентифицировать аллель *Gli-A1o*. Аллель *Glu-A3f* представлен только у сорта Зустріч одесская (аллель глиадинов *Gli-A1f*), который не отличается от всех других сортов, кроме сортов Струмок и Лада по ПЦР-анализу локуса *Gli-A1* (Поліщук и др., 2010).

При анализе электрофореграмм глиадинов по локусу *Gli-B1* у исследованных сортов выявлено 3 аллельных варианта – *Gli-B1b*, *Gli-B1d*, *Gli-B1e*. Согласно результатам ПЦР-анализа первым двум вариантам соответствует аллель *Gli-B1.1*, а третьему – *Gli-B1.2* (Поліщук и др., 2010). Так как аллель *Gli-B1e* существенно влияет на качество муки, возможность его идентификации с помощью ПЦР-анализа должна быть подтверждена на большем наборе сортов.

Таблица 2

Аллельный состав локусов *Gli-A1*, *Gli-B1* и *Gli-D1* в генотипах сортов пшеницы по данным ПЦР-анализа и электрофореза запасных белков (цит. по: Поліщук и др., 2010)

Группа	Сорт	Аллели по данным ПЦР-анализа			Аллели по данным электрофореза запасных белков		
		<i>Gli-A1</i>	<i>Gli-B1</i>	<i>Gli-D1</i>	<i>Gli-A1</i>	<i>Gli-B1</i>	<i>Gli-D1</i>
1	Лузановка од.*	1	1	2	<i>b</i>	<i>d</i>	<i>g</i>
	Зустріч од.	1	1	2	<i>f</i>	<i>b</i>	<i>x</i> (10)
	Знахідка од.	1	1	2	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>j</i>
	Любава од.	1	1	2	<i>b</i>	<i>b, d</i>	<i>b, j</i>
	Фантазія од.	1	1	2	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>j</i>
	Альбатрос од.	1	1	2	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>j</i>
2	Одесская 267	1	1	1	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>g</i>
	Викторія	1	1	1	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>j</i>
3	Прима од.	1	2	1	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>f</i>
	Застава од.	1	2	1	<i>b</i>	<i>e</i>	<i>j</i>
4	Струмок	2	1	2	<i>o</i>	<i>d</i>	<i>b</i>
	Лада од.	2	1	2	<i>o</i>	<i>b</i>	<i>j</i>

* Од. – одесская.

Таблица 3

Аллели локуса *Glu-A3* в генотипах мягкой пшеницы по данным ПЦР-анализа (цит. по: Поліщук и др., 2010)

Сорт	Аллели локуса <i>Glu-A3</i>	Наличие продуктов амплификации с аллель-специфическими праймерами к локусу <i>Glu-A3</i>						
		a	abc	ac	d	e	f	g
Лузановка од.	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
Зустріч од.	<i>f</i>	–	–	–	–	–	+	–
Струмок	<i>d</i>	–	–	–	+	–	–	–
Одесская 267	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
Знахідка од.	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
Любава од.	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
Фантазія од.	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
Прима од.	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
Лада од.	<i>d</i>	–	–	–	+	–	–	–
Застава од.	<i>a</i>	+	+	+	–	–	–	–
Викторія	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
Альбатрос од.	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–

* Од. – одесская.

По локусу *Gli-D1* не удалось обнаружить соответствия между аллелями глиадинов на электрофорезе белков и продуктов ПЦР (Поліщук и др., 2010). Возможно, праймеры, разработанные Zhang с соавт. (2003, 2004), тестировали полиморфизм в нуклеотидной последовательности, оказавшейся неpolиморфной на исследуемой выборке сортов, т. е. все изученные здесь аллели глиадинов по локусу *Gli-D1* имели общий γ -глиадиновый компонент, в то время как электрофорез белков отражает весь спектр полиморфизма, определяемый последовательностью локуса *Gli-D1*.

Методами электрофореза белков и ПЦР был изучен также аллельный состав запасных белков у почти изогенных линий, созданных на основе сорта Безостая 1, а также у линии B16 и сорта Одесская красноколосая (Поліщук и др., 2010) (табл. 4, 5).

ПЦР-методом с праймерами к *Gli-B1.1* обнаружен новый, еще не описанный в литературе аллель у линии GLI-B1-12 (аллель глиадинов *Gli-B1o*). Он соответствовал продукту амплификации размером 399 п.н., полученному с парой праймеров Gli-gAF1/Gli-gAR1 (Поліщук и др., 2010), тогда как в исследованиях Zhang с соавт. (2003) данная пара праймеров выявляла

продукты амплификации размером 369 п.н. (аллель *Gli-B1.1*) или не давала продуктов амплификации (аллель *Gli-B1.2*).

При ПЦР-анализе линий с пшенично-ржаной транслокацией 1BL.1RS продуктов амплификации не выявлено, что согласуется с данными электрофореза запасных белков (Поліщук и др., 2010).

В результате молекулярно-генетического анализа локуса *Glu-A3* почти у всех линий, кроме GLI-A1-1, показано наличие аллеля *Glu-A3c*. Полученные результаты согласуются с данными о наличии ПЦР-аллеля *Gli A1.2* у этой линии. По Zhang с соавт. (2003), присутствие этого аллеля совпадает с присутствием аллелей *Glu-A3d* и *Glu-A3e* для локуса *Glu-A3*. Следует обратить внимание на наличие у этой линии блока компонентов глиадинов *Gli-A1m* по электрофорезу запасных белков (Поліщук и др., 2010).

Таким образом, нами показана возможность идентифицировать некоторые аллели глиадинов и низкомолекулярных глютеинов украинских сортов пшеницы с помощью ПЦР-анализа, проанализировано соответствие генетического полиморфизма глиадинкодирующих локусов, выявляемого с помощью молекулярных маркеров (Zhang *et al.*, 2003) по полиморфизму,

Таблица 4

Аллельное состояние Gli-локусов по данным ПЦР и электрофореза глиадинов в почти изогенных линиях мягкой пшеницы (цит. по: Поліщук и др., 2010)

Сорт/Линия	<i>Gli-A1</i>		<i>Gli-B1</i>		<i>Gli-D1</i>	
	ПЦР	Электрофорез белков	ПЦР	Электрофорез белков	ПЦР	Электрофорез белков
Б-16	<i>GliA1.1</i>	<i>x</i>	–	<i>l</i>	<i>GliD1.2</i>	<i>j</i>
Одесская красноколосая	<i>GliA1.1</i>	<i>g</i>	<i>GliB1.2</i>	<i>c</i>	<i>GliD1.2</i>	<i>f</i>
Безостая 1	<i>GliA1.1</i>	<i>b</i>	<i>GliB1.1</i>	<i>b</i>	<i>GliD1.2</i>	<i>b</i>
GLI-D1-5	<i>GliA1.1</i>	<i>b</i>	<i>GliB1.1</i>	<i>b</i>	<i>GliD1.1</i>	<i>g</i>
GLI-B1-3	<i>GliA1.1</i>	<i>b</i>	–	<i>l</i>	<i>GliD1.2</i>	<i>b</i>
GLI-B1-4	<i>GliA1.1</i>	<i>b</i>	<i>GliB1.2</i>	<i>g</i>	<i>GliD1.2</i>	<i>b</i>
GLI-A1-1	<i>GliA1.2</i>	<i>m</i>	<i>GliB1.1</i>	<i>b</i>	<i>GliD1.2</i>	<i>b</i>
GLI-D1-4	<i>GliA1.1</i>	<i>b</i>	<i>GliB1.1</i>	<i>b</i>	<i>GliD1.2</i>	<i>j</i>
GLI-B1-12	<i>GliA1.1</i>	<i>b</i>	Новый алель	<i>o</i>	<i>GliD1.2</i>	<i>b</i>

Таблица 5

Аллельный состав локуса *Glu-A3* в генотипах почти изогенных линий мягкой пшеницы по ПЦР-анализу (цит. по: Поліщук и др., 2010)

Сорт/Линия	Аллели <i>Glu-A3</i> локуса	Наличие аллель-специфичных продуктов амплификации по локусу <i>Glu-A3</i>						
		a	abc	ac	d	e	f	g
Б-16	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
Одесская красноколосая	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
Безостая 1	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
GLI-D1-5	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
GLI-B1-3	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
GLI-B1-4	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
GLI-A1-1	<i>e</i>	–	–	–	–	+	–	–
GLI-D1-4	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–
GLI-B1-12	<i>c</i>	–	+	+	–	–	–	–

наблюдаемому при электрофорезе запасных белков. Показана возможность дифференцировать генотипы мягкой пшеницы с аллелями глиадинов *Gli-A1m* и *Gli-A1o*, которые имеют ПЦР-аллель *Gli-A1.2*, от генотипов с аллелями глиадинов *Gli-A1f*, глиадинов *Gli-A1b*, *Gli-A1c*, *Gli-A1x*, *Gli-A1g*, а также генотипы с вариантами глиадинов *Gli-B1e*, *Gli-B1g* и *Gli-B1c* и с ПЦР-аллелем *Gli-B1.2* от генотипов с аллелями *Gli-B1b* и *Gli-B1d* и с ПЦР-аллелем *Gli-B1.1*. Также выделен новый аллель с ПЦР-праймерами к локусу *Gli-B1* (Поліщук и др., 2010).

Заключение

В целом в данной работе охвачены такие основные системы определения генетически обусловленного уровня хлебопекарного качества, как гены запасных белков глиадинов и глютеинов, гены твердозерности, а также гены *Wx*, связанные с пониженным содержанием амилозы в зерне, изучен полиморфизм по этим системам у украинских сортов.

Поскольку, по данным литературы, твердозерность определяется главным образом

свойствами пуриноидинов, аллельный состав их генов был изучен с помощью ПЦР-анализа и сопоставлен с уровнем этого признака для целой группы украинских сортов. Показано, что распределение сортов между группами «твердозерные» и «мягкозерные» действительно определялось полиморфизмом в локусах, кодирующих пуриноидины, а внутри этих групп – другой генетической системой, так называемыми минорными генами. Таким образом, отмечено наличие других генетических факторов, определяющих твердозерность украинских сортов, а также выявлены различия по уровню твердозерности между селекционными центрами Украины.

В связи с потребностью пищевой промышленности в сортах специального назначения, в частности, с пониженным содержанием амилозы, для 46 сортов, внесенных в Реестр сортов Украины, и двух линий с нулевым содержанием амилозы в крахмале эндосперма методом ПЦР был изучен полиморфизм по генам *Wx*. Нуль-аллели по локусам *Wx-A1*, *Wx-B1* и *Wx-D1* не были обнаружены в выборке сортов, что согласуется с наличием нормального уровня амилозы в украинских сортах. Поэтому для внедрения генов, контролирующих низкое содержание амилозы, в генотипы украинских сортов был специально создан материал – гибридная комбинация F₅ от скрещивания сорта Куяльник с источником данных генов – линией *Wx-15*, из которого с помощью ПЦР-маркеров к локусам *Wx-A1*, *Wx-B1* и *Wx-D1* были отобраны 10 гомозиготных линий, несущих нуль-аллели по всем трем локусам *Wx*.

Сравнение подходов к изучению полиморфизма запасных белков по локусам *Gli-1* и тесно сцепленного *Glu-A3*, основанных на электрофорезе запасных белков и на ПЦР, показало, что уровень полиморфизма глиадинов и LMW-глутенинов у сортов и линий одесской селекции был выше при анализе электрофореграмм белков. Это может объясняться тем, что электрофореграммы запасных белков отражают весь спектр глиадинов, тогда как аллель-специфичные праймеры (Zhang *et al.*, 2003, 2004) позволяют получить информацию только по γ -глиадинам. Тем не менее показана возможность идентификации некоторых аллельных вариантов запасных белков с помощью ПЦР.

Проведенные исследования и выявленные аллельные характеристики генотипов сортов могут быть использованы в селекции мягкой пшеницы для создания сортов с определенным уровнем хлебопекарного качества, а также сортов специального назначения – для кондитерских целей, с низким содержанием амилозы в крахмале – для приготовления изделий из замороженного теста и др.

Литература

- Беркутова Н.С., Швецова И.А. Технологические свойства пшеницы и качество продуктов ее переработки. М.: Колос, 1984. 223 с.
- Благодарова О.М., Литвиненко М.А., Голуб С.А. Генеография аллелів гліадин- і глютенінкодуєчих локусів українських сортів озимої м'якої пшениці // Зб. наук. праць СГІ-НАЦ НАІС. Одеса, 2004. Вип. 6 (46). Ч. 2. С. 179–193.
- Коваль С.Ф., Коваль В.С., Чернаков В.М. и др. Что такое модель сорта. Омск: ФГОУ ВПО ОМГАУ, 2005. 280 с.
- Петрова И.В., Чеботарь С.В., Рыбалка А.И., Сиволап Ю.М. Контроль *Wx*-генов в процессе селекции при создании форм мягкой пшеницы с низким содержанием амилозы // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Зб. наук. пр. К.: ЛОГОС, 2007. Т. 2. С. 162–164.
- Петрова И.В., Чеботарь С.В., Рыбалка О.И., Сиволап Ю.М. ПЛР-аналіз алельного стану *Wx*-генів у сортів пшениці // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. Вавилова / За ред. М.В. Роїка. К.: ЛОГОС, 2006. Т. 3. С. 127–132.
- Петрова И.В., Чеботарь С.В., Рыбалка О.И., Сиволап Ю.М. SSR-аналіз селекційних форм м'якої пшениці з нульовим вмістом амілози у крохмалі // «Геном рослин»: Зб. наук. ст. Одеса, 2008. С. 110–115.
- Поліщук А.М., Чеботарь С.В., Благодарова О.М. и др. Аналіз сортів та майже-ізогенних ліній м'якої пшениці за допомогою ПЛР-аналізу з алель-специфічними праймерами до *Gli*- та *Glu*-локусів // Цитологія і генетика. 2010. № 6. С. 22–31.
- Попереля Ф.О. Три основні генетичні системи якості зерна озимої м'якої пшениці // Реалізація потенційних можливостей сортів та гібридів Селекційно-генетичного інституту в умовах України. Зб. наук. праць СГІ. Одеса, 1996. С. 117–132.
- Попереля Ф.А., Благодарова О.М. Генетика якості зерна перших генотипів надсильної пшениці України // Цитологія і генетика. 1998. Т. 32. № 6. С. 11–19.
- Попереля Ф.А., Собко Т.Я. Генетика гліадіна озимої мягкой пшеницы // Вопросы генетики и селекции зерновых культур. КОЦ СЭВ, Одесса (СССР), НИИР Прага-Рузыне (ЧССР). 1987. Вып. 3. С. 231–242.
- Попереля Ф.А. Полиморфизм гліадіна и его связь с качеством зерна, продуктивностью и адаптивными свойствами сортов мягкой озимой пшеницы // Селекция, семеноводство и интенсивная технология

- возделывания озимой пшеницы. Агропромиздат, 1989. С. 138–150.
- Семенюк И.В., Чеботарь С.В., Рыбалка А.И., Сиволап Ю.М. Молекулярно-генетический анализ селекционных линий мягкой пшеницы с крахмалом амилопектинового типа // Цитология и генетика. 2011. Т. 45. № 5. С. 17–22.
- Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука, 1985.
- Финни К.Ф., Ямазак У.Т. Качество твердозерной, мягкой и дурум пшениц // Пшеница и ее улучшение. М.: Колос, 1970. С. 469–497.
- Хохлов О.М. Генетично обумовлена твердість зерна м'якої пшениці (*T. aestivum*): стан та перспективи досліджень в Україні // Зб. наук. праць СГІ. Одеса, 2002. Вип. 2 (42). С. 9–29.
- Чеботар С.В., Куракіна К.О., Хохлов О.М. и др. Фенотипічні прояви алелів пуринолінових генів м'якої пшениці // Цитологія та генетика. 2012. В печати.
- Barro F., Barcelo P., Lazzeri P. *et al.* Functional properties of flours from field grown transgenic wheat lines expressing the HMW glutenin subunits 1Ax1 and 1Dx5 genes // Mol. Breeding. 2003. V. 14. P. 223–229.
- Butow B., Ma W., Gale K. *et al.* Molecular discrimination of *Bx7* alleles demonstrates that a highly expressed high-molecular-weight glutenin allele has a major impact on wheat flour dough strength // Theor. Appl. Genet. 2003. V. 107. P. 1524–1532.
- Capparelli R., Boriello G., Giroux M.J., Amoroso M.G. Puroindoline A-gene expression is involved in association of puroindolines to starch // Theor. Appl. Genet. 2003. V. 107. P. 1463–1468.
- Chen F., He Z.H., Xia X.C. *et al.* A new puroindoline и mutation present in Chinese winter wheat cultivar Jingdong 11 // J. Cereal Sci. 2005. No 42. P. 267–269.
- Chen F., He Z.H., Xia X.C. *et al.* Molecular and biochemical characterization of puroindoline a and b alleles in Chinese landraces and historical cultivars // Theor. Appl. Genet. 2006. No 112. P. 400–409.
- Giroux M.J., Morris C.F. A glycine to serine change in puroindoline b is associated with great hardness and low levels of starch-surface friabilin // Theor. Appl. Genet. 1997. No 95. P. 857–864.
- Giroux M.J., Morris C.F. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. No 95. P. 6262–6266.
- Graybosch R., Peterson C., Hansen L. *et al.* Identification and characterization of U.S. wheats carrying null alleles at the *waxy* loci // Cereal Chem. J. 1998. V. 75. P. 162–165.
- Greenwell P., Schofield J.D. A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat // Cereal Chem. 1986. No 63. P. 379–380.
- Ikeda T.M., Ohnishi N., Nagamine T. *et al.* Identification of new puroindoline genotypes and their relationship to flour texture among wheat cultivars // J. Cereal Sci. 2005. No 41. P. 1–6.
- Ma W., Anderson O., Kuchel H. *et al.* Genomics of Quality Traits // Plant Genetics and Genomics: Crops and Models. Genetics and Genomics of the Triticeae / Eds C. Feuillet, G.J. Muehlbauer. Springer Science + Business Media, LLC, 2009. P. 611–652.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Devos K.M. *et al.* MacGene 2003. Catalogue of Gene Symbols for Wheat / 10IWGS, Paestum, Italy, 2003.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Devos K.M., Dubkowsky J., Rogers J., Appels R. MacGene 2008. Catalogue of Gene Symbols for Wheat / <http://www.grs.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes>.
- Metakovsky E.V. Gliadin allele identification in common wheat. 2. Catalogue of gliadin alleles in common wheat // J. Genet. Breed. 1991. V. 45. P. 325–344.
- Morris C.F. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness // Plant Mol. Biol. 2002. No 48. P. 633–647.
- Morris C.F., Lillemo M., Simeone M.C. *et al.* Prevalence of puroindoline grain hardness genotypes among historically significant North American spring and winter wheats // Crop. Sci. 2001. V. 41. No 1. P. 218–228.
- Nakagahra M., Nagamine T., Okuno K. Spontaneous occurrence of low amylose genes and geographical distribution of amylose content in Asian rice // Rice Genet. Newslett. 1986. V. 3. P. 46–48.
- Nakamura T., Hoshino H., Hidaka S. Identification of three *Wx* proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Biochem. Genet. 1993. V. 31. P. 75–86.
- Nakamura T., Yamamori M., Hirano H. *et al.* Production of waxy (amylose-free) wheats // Mol. Gen. Genet. 1995. V. 248. No 3. P. 253–259.
- Payne P., Corfield K., Holt L., Blackman J. Correlations between the inheritance of certain high-molecular-weight glutenin subunits and bread-making quality in progenies of six crosses of bread wheat // J. Sci. Fd. Agric. 1981. V. 32. P. 51–60.
- Payne P.I., Holt L.M., Jacson E.A., Law C.N. Wheat storage proteins: their genetics and their potential for manipulation by plant breeding // Phil. Trans. R. Soc. Lond. 1984. V. 304. P. 359–371.
- Poperelya F.A., Blagodarova E.M., Stelmakh A.F. Genetic systems regulating grain quality in winter dread wheat // Proc. of the 9th Intern. Wheat Genet. Symp. Saskatoon, 1998. V. 4. P. 251–253.
- Ram S., Jain N., Shoran J., Singh R. New frame shift mutation in puroindoline b in Indian wheat cultivars Hyb65 and NI5439 // J. Plant Biochem. Biotech. 2005. No 14. P. 45–48.
- Reynolds N.P., Martin J.M., Giroux M.J. Novel *Ha* locus, *Pin-D1c/Pinb-D1h*, affects soft white spring wheat milling and baking // Cereal Chem. J. 2010. V. 87. No 3. P. 237–242.
- Sourdille P., Perretant M.R., Charmet G. *et al.* Linkage between RFLP markers and genes affecting kernel hardness in wheat // Theor. Appl. Genet. 1996. V. 93. P. 580–586.
- Turner M., Mukai Y., Leroy P. *et al.* The *Ha* locus of wheat: identification of a polymorphic region for tracing grain hardness in crosses // Genome. 1999. No 42. P. 1242–1250.
- Wang L.H., Zhao X.L., He Z.H. *et al.* Characterization of low-molecular-weight glutenin subunit *Glu-B3* genes and development of STS markers in common wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2009. V. 118. No 3. P. 525–539.

- Wrigley C.W. Developing better strategies to improve grain quality for wheat // *Aust. J. Agric. Res.* 1994. V. 45. P. 1–17.
- Xia L.Q., Chen F., He Z.H. *et al.* Occurrence of puroindoline alleles in Chinese winter wheats // *Cereal Chem. J.* 2005. V. 82. P. 38–43.
- Zhang W., Gianibelli M.C., Ma W. *et al.* Identification of SNPs and development of allele-specific PCR markers for γ -gliadin alleles in *Triticum aestivum* // *Theor. Appl. Genet.* 2003. V. 107. P. 130–138.
- Zhang W., Gianibelli M.C., Rampling L.R. Characterisation and marker development for low molecular weight glutenin genes from *Glu-A3* alleles of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2004. V. 108. P. 1409–1419.
- Zhao X.L., Xia X.C., He Z.H. *et al.* Characterization of three low-molecular-weight *Glu-D3* subunit genes in common wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2006. V. 113(7). P. 1247–1259.
- Zhao X.L., Xia X.C., He Z.H. *et al.* Novel DNA variations to characterize low molecular weight glutenin *Glu-D3* genes and develop STS markers in common wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2007. V. 114. No 3. P. 451–460.
- Zlatska A.V. Allele composition of *Pina* and *Pinb* loci of eastern European common wheat varieties and their impact on the bread-making quality characteristics // *Intern. Conf. «Plant genetics, genomics, and biotechnology»*. Novosibirsk, 2010. P. 90.

GENETIC POLYMORPHISM OF LOCI DETERMINING BREAD MAKING QUALITY IN UKRAINIAN WHEAT VARIETIES

S.V. Chebotar¹, E.M. Blagodarova², E.A. Kurakina³, I.V. Semenyuk¹, A.M. Polishchuk¹,
N.A. Kozub³, I.A. Sozinov³, A.N. Khokhlov², A.I. Ribalka², Yu. M. Sivolap¹

¹ South Plant Biotechnology Center, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Odessa, Ukraine, e-mail: sabina-chebotar@rambler.ru;

² Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, Odessa, Ukraine;

³ Odessa National State University, Department of Genetics and Molecular Biology, Odessa, Ukraine;

⁴ Institute of Plant Protection UAAS, Kiev, Ukraine

Summary

The paper presents an overview of studies of genetic polymorphism of loci determining bread-making quality among Ukrainian wheat varieties by means of electrophoretic analysis of storage proteins (*Gli* and *Glu*) and PCR. The results of analysis of polymorphism in the *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1*, *Glu-A3* loci, as well as the allelic compositions of the *Pina-D1* and *Pinb-D1* genes, determining grain hardness, and *Wx* genes, controlling amylose content in the starch of the endosperm, are presented. Comparison of the results obtained with allele-specific primers to the γ gliadin loci and by storage protein electrophoresis shows that the former method can identify some alleles, but the level of polymorphism revealed by this method is lower than that revealed by electrophoresis of storage proteins. Most of the varieties under consideration have PCR alleles characteristic for hard wheat, and only three varieties have alleles specific for soft wheat. Varieties originating from different Ukrainian breeding-centers differ in grain hardness. PCR analysis has not revealed the presence of null alleles of *Wx* genes in the studied Ukrainian genetic pool but allowed selection of breeding material for further development of low-amylose varieties.

Key words: bread wheat, PCR, electrophoresis, gliadins, glutenins, grain hardness, puroindoline genes, *Wx* genes.