

УДК 631.52 (633.11+633.2)

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОЛІМОРФІЗМУ
ГЕНІВ Wx ДЛЯ СТВОРЕННЯ СОРТІВ ТРИТИКАЛЕ
СПИРТО-ДИСТИЛЯТНОГО ТА КОРМОВОГО НАПРЯМІВ**

О.С. Левченко, В.М. Стариченко, Н.І. Коберник

Національний науковий центр „Інститут землеробства НААН”

Культура тритикале має широкий діапазон використання: від переробки на борошно для випікання хліба до отримання промислового спирту і крохмалю. Крохмаль – менш рухома речовина, ніж прості вуглеводи, і здебільшого є запасним продуктом. Його нагромадження в ендоспермі зернівки становить близько 85 % її маси. До його складу входять два полісахариди – амілоза і амілопектин. Тритикальний крохмаль містить 23-25 % амілози і близько 73-75 % амілопектину. Зміна співвідношення амілози й амілопектину в крохмальних гранулах значною мірою впливає на технологічні властивості борошна. З однієї тони зерна сучасних сортів тритикале можна отримати 420-560 л спирту, 230-300 кг цінного високобілкового кормового шроту і 140-160 л вуглекислого газу, який використовується для газування харчових напоїв.

Протягом останніх трьох років відділом селекції і насінництва зернових культур ННЦ „Інститут землеробства НААН” було вивчено 115 колекційних зразків тритикале озимого вітчизняного (різних селекційних установ) та закордонного (Росія, Білорусь, Канада, Польща, Румунія, Чехія) походження. Метою наших досліджень є вивчення колекційних зразків для створення сортів тритикале озимого спеціального технічного використання і виробництва біоетанолу, які б характеризувались високим вмістом крохмалю в зерні та високою ефективністю його трансформації в біоетанол.

За вмістом крохмалю в зерні (>67,0 %) виділені сорти тритикале озимого Ратне, Пурпурний, Гарне, Раритет, Букет, Романтика (Україна), Авангард (Росія), Раго (Польща), Pronto, Шарм, ТД 42, які достовірно перевищили сорт-стандарт Поліський 7 із вмістом крохмалю 62,1-66,7 % на 7-12 % (67,0- 71,2 %); за продуктивністю (810-1310 г/м²) виділені сорти Тризуб, Папсуєвська, Половецьке, Раритет (Україна), Варвара, Ізомер, Лідер (Росія), Руно (Білорусь), Раго (Польща), Dorena (Чехія), Sorento, Краків`як, які достовірно перевищили сорт-стандарт Поліський 7 з продуктивністю 500-530 г/м² на 310-810 г/м².

У синтезі амілози основну функцію має асоційована з гранулами синтаза крохмалю GBSSI (granule bound starch synthase I), яку називають Wx-протеїн. У м'якої пшениці виявлена хромосомна локалізація трьох гомеологічних генів, які кодують ізоформи GBSSI ферменту: Wx A1 (7AS), Wx B1 (4AL), Wx D1 (7DS).

Після проведення пшенично-тритикальної гібридизації у отриманих потомків тритикале був проведений молекулярно-генетичний аналіз поліморфізму генів Wx.

Загальну ДНК із зразків тритикале виділяли методом ЦТАБ + ПВП, для аналізу брали по 10 зерен з одного колосу. Полімеразну ланцюгову реакцію

(ПЛР) проводили у термоциклері Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler за допомогою набору реагентів GenPak®PCRCore у 20 мкл реакційної суміші, що містила 1 од. Таq ДНК полімерази. Концентрація ДНК пшениці була приблизно 100 нг. При проведенні ПЛР аналізу використовували наступні праймери: для гену Wx-A1 праймери Wx-A1F (5'-ccccaagcaagcaggaac-3') та Wx-A1R (5'-cggcgtcgggtccatagatc-3'); для гену Wx-B1 праймери BDFL (5'-ctggcctgctacctcaagagcaact-3'), BRC1 (5'-ggttgcggttggggtcgatgac-3'), BFC (5'-cgtagtaaggtgcaaaaaagtccacg-3') та BRC2(5'-acagccttattgtaccaagaccatgtgtg-3'); для гену Wx-D1 праймери Wx-D1F (5'-gccgacgtgagaaggtggtg-3') та Wx-D1R (5'-ccccttgggtcattgtgtg-3').

Умови проведення ПЛР для гену Wx-A1: початкова денатурація за 94°C – 3 хв, 34 цикли – денатурація за 94 °C – 30 с, за температури відпалу праймерів 58 °C – 30 с, елонгація за 72 °C – 40 с, фінальна елонгація – 5 хв. із наступним гідролізом продуктів ампліфікації ендонуклеазою рестрикції HindIII. За наявності алеля Wx-A1b (нуль-алель) очікувався амплікон 652 пн, Wx-A1a (дикий тип) – 495 та 176 пн. У разі гетерозиготного стану виявлялись амплікони усіх типів. Умови реакції для гену Wx-B1: початкова денатурація за 94 °C – 3 хв., 6 циклів – денатурація за 94 °C – 30 с, за температури, вищої за температуру відпалу праймерів 69 °C – 1 хв, з кожним циклом температура знижувалась на 1 °C, елонгація за 72 °C – 2 хв. та ще 24 цикли – денатурація за 94 °C – 30 с, за температури відпалу праймерів 62 °C – 1 хв., елонгація за 72 °C – 2 хв та фінальна елонгація – 5 хв. За наявності алеля Wx-B1a (дикий тип) очікувався амплікон 778 пн, Wx-B1b (нуль-алель) – 668 пн. У разі гетерозиготного стану виявлялись амплікони обох типів. Умови реакції для Wx-D1: початкова денатурація за 94 °C – 3 хв, 7 циклів – денатурація за 94 °C – 30 с, за температури, вищої за температуру відпалу праймерів 67 °C – 30 с, з кожним циклом температура знижувалась на 1 °C, елонгація за 72 °C – 1 хв та ще 25 циклів – денатурація за 94 °C – 30 с, за температури відпалу праймерів 60 °C – 30 с, елонгація за 72 °C – 1 хв, фінальна елонгація – 5 хв. За наявності алеля Wx-D1a (дикий тип) очікувався амплікон 930 пн, Wx-D1b (нуль-алель) – 342 пн. У разі гетерозиготного стану виявлялись амплікони обох типів. Електрофорез проводили у 1,2 % агарозному гелі у натрій-боратному буфері з 0,5 мкг/мл бромистого етидію.

В результаті молекулярно-генетичного аналізу було виявлено, що зразки тритикале 86-16, 88-16, 108-16, 243-16, 607-16, 867-16 мають алелі обох типів за геном Wx-A1, алель дикого типу гена Wx-B1 та був відсутній Wx-D1; зразок 90-16 є гетерозиготою за Wx-A1 та Wx-D1 і має алель Wx-B1 дикого типу; зразки 100-16, 101-16, 103-16, 104-16, 109-16, 111-16 гетерозиготні за геном Wx-A та мають алелі дикого типу генів Wx-B1 і Wx-D1; зразок 120-16 гетерозиготний за генами Wx-A1 і Wx-B1 та містить нуль-алель гена Wx-D1; зразок 291-16 має нуль-алель гена Wx-A1, Wx-B1 дикого типу та алель Wx-D1 був відсутній; зразок 838-16 є гомозиготою за нуль-алелями генів Wx-A1, Wx-B1 та Wx-D1.