

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

ПОХИЛЬКО СВІТЛАНА ЮРІЇВНА

УДК 601.4:577.21:633.11

**ТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ БІОФОРТИФІКАЦІЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ
ГЕНОМ *GPC-B1* ВІД *TRITICUM TURGIDUM* SSP. *DICOCCOIDES***

03.00.20 - біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ 2018

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано на кафедрі промислової біотехнології Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» Міністерства освіти і науки України та у відділі молекулярної генетики Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Науковий керівник: кандидат біологічних наук
Моргун Богдан Володимирович,
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН
України,
в.о. завідувача відділу молекулярної генетики

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Таран Наталія Юріївна,
Київський національний університет імені Тараса
Шевченка,
завідувач кафедри біології рослин ННЦ «Інститут біології
та медицини»

доктор сільськогосподарських наук, старший науковий
співробітник, член-кореспондент НААН України,
Патика Микола Володимирович,
Національний університет біоресурсів і
природокористування України
завідувач кафедри екобіотехнології та біорізноманіття

Захист відбудеться 27 червня 2018 року о 11-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.002.28 при Національному технічному університеті України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» за адресою: 03056, Україна, м. Київ, пр. Перемоги, 37, корп. 4, ауд. 258.

З дисертацією можна ознайомитися у Науково-технічній бібліотеці ім. Г.І. Денисенка Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут» за адресою: 03056, Україна, м. Київ, пр. Перемоги, 37.

Автореферат розіслано 26 травня 2018 року.

В.о. ученого секретаря спеціалізованої
вченої ради Д 26.002.28, д.т.н., доц.



Т.С. Тодосійчук

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Однією з найбільших проблем людства XXI століття – це забезпечення стабільного харчування постійно зростаючого населення земної кулі. За попередніми оцінками до 2050 року на планеті Земля буде більше як 9 млрд осіб (Van Der Straeten et al., 2017; Stovet et al., 2017). У 2015 році хронічне недоїдання серед населення зменшилося з 1 млрд до 795 млн вперше за 25 років (FAO, 2015). Однак, хоча калорійне недоїдання (гострий голод) зменшилося, недоїдання поживних речовин, так званий «прихований голод», викликаний нестачею вітамінів та мінералів збільшився. Дана проблема актуальна для 2 млрд людей, а, отже, являє собою найпоширенішу форму недоїдання (Bioversity strategy 2014-2024).

Пшениця є однією з найважливіших зернових культур в усьому світі, як з точки зору промисловості, так і в якості продукту для перероблювання. Вона являється основним джерелом енергії, білка та клітковини у раціоні людини. Пшениця забезпечує приблизно одну п'яту від загального калорійного складу раціону населення всього світу (Van Der Straeten et al., 2017).

Однією із проблем сьогодення України є питання поліпшення якості зерна пшениці. Україна посідає високе місце на світовому ринку зернових: частка в експорті пшениці в середньому складає 5%; одночасно частка України в експорті пшениці до ЄС становить 32% (Маханьова Ю. М., 2015).

На жаль, українська пшениця у загальній масі поступається за якістю зерна кращим світовим сортам і, як наслідок, у повній мірі не задовольняє внутрішній і зовнішній ринки рівнем якості пшеничного борошна (Рибалка О. І. та ін., 2012).

Отже, робота над розробкою нових селекційних ліній, які є результатом схрещування з віддаленими родичами пшениці, дасть можливість отримати більш якісне і збалансоване зерно, що надалі може допомогти, хоча б частково вирішити проблему «прихованого голоду» для українців. Використання сучасних систем ДНК-маркерів, та новітніх методів аналізу якісного складу зерна, дадуть можливість за короткий термін відібрати перспективні лінії з підвищеним вмістом мікроелементів та білка.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами, планами.

Дисертаційну роботу виконано на базі кафедри промислової біотехнології Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» і відділу молекулярної генетики Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України у рамках державної бюджетної теми III-6-16 «Розробка систем генотипування та маркування цінних біологічних ознак сільськогосподарських культур» (державний реєстраційний номер 0116U000173).

Мета та задачі дослідження. Метою роботи була розробка технології відбору ліній м'якої озимої пшениці носіїв гена *Gpc-B1*, перенесеного з *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Для вирішення поставленої мети були сформульовані такі завдання:

- 1) розробити молекулярно-генетичні системи ДНК-маркерів для виявлення гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в рослинах пшениці м'якої озимої;
- 2) розробити системи молекулярних маркерів для визначення частоти рекомбінації локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219* на 6В хромосомі пшениці – носії гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*;
- 3) провести аналіз алелів генів глютенінів, що зумовлюють екстрасильні показники борошна, та відібрати перспективні лінії м'якої пшениці – котрі несуть ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* і найбільш генетично споріднені до сорту Куяльник;
- 4) провести аналіз алельного стану пуринодолінових генів в лініях пшениці, носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, та відібрати перспективні лінії, що найбільш генетично споріднені до сорту Куяльник;
- 5) провести комплексний аналіз вмісту загального білка в зерні м'якої пшениці, яка містить ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*;
- 6) проаналізувати генотипи зразків пшениці, які є носіями гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* на вміст мікро- та макроелементів;
- 7) провести аналіз урожайності та селекційних показників дослідних ліній-носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* у польових умовах;

Об'єкт дослідження – поліморфний ген *Gpc-B1* та його прояв у новому генетичному оточенні.

Предмет дослідження – системи молекулярних маркерів, для аналізу дослідних ліній-носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Методи дослідження: молекулярно-генетичні (полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) з різними типами ДНК-маркерів, гідроліз продуктів ПЛР, виділення загальної ДНК з рослинного матеріалу, електрофорез продуктів ампліфікації в агарозному гелі), біофізичні (визначення вмісту мінеральних елементів методом ICP-MS, визначення якісних показників зерна пшениці методом інфрачервоної спектроскопії), біохімічні (визначення вмісту загального нітрогену методом К'ельдаля, визначення індексу седиментації за методом SDS-30), статистичні (оцінка вірогідності отриманих результатів), селекційно-генетичні (гібридизація, вимірювання параметрів розвитку, оцінка продуктивності рослин у польових умовах, добори).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше розроблено молекулярно-генетичні системи ДНК-маркерів для визначення наявності гена *Gpc-B1* перенесеного з *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* в пшениці м'якій озимій.

Вперше було вивчено алельний стан пуринодолінових генів в дослідних лініях м'якої пшениці – носіях гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* та знайдено унікальну комбінацію алелей *Pina-D1b*, *Pinb-D1a*, що не була відома до того у вітчизняних сортах пшениці.

За допомогою аналізу алелей генів глютенінів доведено екстрасильні показники якості борошна дослідних ліній-носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

За результатами аналізів вмісту мікро- та макроелементів і загального білка, встановлено, що результат експресії гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в дослідних лініях м'якої пшениці підвищує вміст Fe, Mn, Zn, Se та білка в порівнянні з вихідним сортом Куяльник.

Вперше проаналізовано врожайність та фізіологічні показники дослідних ліній-носіїв гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* в польових умовах, та встановлено, що лінії є стійкими до полягання, середньорослими з середньою врожайністю 43 ц/га, що на 40% більше ніж у вихідної лінії Glupro.

Вперше розроблено технологію відбору ліній м'якої озимої пшениці, яка містить функціональний ген *Gpc-B1*, перенесений від дикорослого співродича *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати аналізу поколінь дослідних ліній-носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* використані в селекційних програмах Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, а також в Селекційно-генетичному інституті Національний центр насіннезнавства і сортовивчення НААН України.

Розроблені молекулярні генетичні системи для визначення гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* можуть бути використанні для контролю гена в подальших селекційних схрещуваннях і направленою відбору селекційних ліній.

Молекулярно-генетичні системи, розроблені для визначення частоти рекомбінації локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219* на 6В хромосомі, можуть бути застосовані для генотипування сортів.

Відібрані лінії пшениці F₆ покоління – носії гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* можуть бути використані для створення перспективних сортів пшениці з підвищеним вмістом білка і мікро- та макроелементів.

Особистий внесок здобувача. Результати роботи, які викладено в дисертації, одержані автором або за його безпосередньої участі. Планування експериментальної роботи проводилося спільно із науковим керівником. Концепцію роботи, планування, основні результати і висновки роботи сформульовано й обговорено дисертантом разом з к.б.н. Б. В. Моргуном, д.б.н., член-кореспондентом НАН України О. І. Рибалкою, д.б.н., проф. О. М. Дуганом.

Польові досліді планувалися та розглядалися спільно з д.б.н., академіком НАН України В. В. Моргуном та к.б.н. В. М. Починком. Експеримент щодо визначення вмісту мікро- та макроелементів у зерні й аналізу загального нітрогену методом К'ельдаля проводився спільно з д.б.н., член-кореспондентом НАН України В. В. Швартау та к.б.н. Л. М. Михальською.

Автором особисто здійснено виділення рослинної ДНК; підібрано біотехнологічні умови для виявлення поліморфізму цільових генів;

розроблено і проведено уніплексні та мультиплексні ПЛР з різними праймерами; відібрано перспективні зразки у кожному поколінні; визначено якісні показники зерна пшениці методом інфрачервоної спектроскопії; виконано польові експерименти.

Автор висловлює щирю вдячність науковому керівнику к.б.н. Б. В. Моргуну, д.б.н. О. М. Дугану, чл.-кор. НАН України О. І. Рибалці та В.В. Швартау, к.б.н. А. В. Трояновській, к.б.н. А. І. Степаненку й іншим колегам за підтримку та цінні поради під час виконання роботи.

Апробація роботи. Основні матеріали дисертації були представлені на науково-практичних конференціях:

міжнародних: II Международная научная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (Минск, 13-16 октября 2015 года); X Міжнародна конференція молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2-4 грудня 2015); XI Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Одеса, 12-16 вересня 2016 року); The 3rd international symposium on Euroasian biodiversity (Minsk, 05-08 July 2017); XII Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Умань, 2-6 жовтня 2017 року); VI Міжнародна конференція «Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти» (Львів, 4-6 жовтня 2017 року);

всеукраїнських: X Всеукраїнська науково-практична конференція, присвячена 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 22 квітня 2016 року); Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Тернопільські біологічні читання – 2017» (Тернопіль, 20-22 квітня 2017 року); XI Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 21 квітня 2017 року); Третя конференція молодих вчених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, 16-18 травня 2017 року);

звітньо-науковий семінар на кафедрі промислової біотехнології Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського».

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 15 наукових праць, у тому числі 5 статей у наукових фахових виданнях України (з них 2 статті у виданнях України, які включені до міжнародних наукометричних баз), 10 тез доповідей у збірниках матеріалів конференцій.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, чотирьох експериментальних розділів, узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел та додатків. Роботу викладено на 154 сторінках машинописного тексту, включаючи 19 рисунків і 12 таблиць. Перелік цитованої літератури містить 201 найменування.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури розглянуто основні ефективні напрямки, за якими проводиться біофортифікація пшениці в світі. Наведена характеристика пшениці м'якої, як об'єкта дослідження, а також показана важливість проведення селекційних робіт та покращення її, як одного з основних джерел енергії, білка і клітковини. Наведено основні біотехнологічні методи удосконалення генетичної складової та якостей пшениці. Проведено аналіз сучасних тенденцій молекулярно-генетичних маркерів, що в сучасному селекційному процесі є невід'ємним інструментом роботи при відборі та аналізі генетичного матеріалу. Основну увагу зосереджено на гені *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, його походженні, ефекті його прояву у різному генетичному оточенні та його цінність для вирішення проблем нестачі мінералів у раціоні людей.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У розділі представлено селекційні лінії та сорти, що були використані в дослідженнях. Лінія-донор *Glupro* була люб'язно надана Jorge Dubcovsky, за що ми дуже вдячні. Виділення загальної ДНК проводили з зелених листових пластинок чи зернівок модифікованим ЦТАБ-експрес методом. Польові досліди закладалися на дослідному полі ІФРГ НАН України.

Виявлення цінних генів та алелей генів проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням специфічних праймерів (Khan et al., 2000; Distelfeld et al., 2006; Himi et al., 2011; Kim et al., 2008; Röder, 1998; Butow et al., 2014; Liu et al., 2008; Gautier et al., 1994). Продукти ПЛР розділяли в агарозному гелі з концентрацією від 1,6% до 2,5% в SB-буфері (5 мМ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ рН 8,5) та LB-буфері (10 мМ $\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$ рН 8,5).

Визначення елементного складу зернівок здійснювали на мас-спектрометрі з індуктивно зв'язаною плазмою ICP-MS Agilent 7700x (Agilent Technologies) з ICP-MS MassHunter WorkStation на базі ІФРГ НАНУ.

Визначення якісних показників зерна проводили за допомогою метода інфрачервоної спектроскопії. Показники твердозерності та загального білка у борошні пшениці вимірювали приладом Perten Informatic 8600 в ІФРГ НАНУ.

Визначення вмісту загального білка виконували методом К'ельдаля. Наважку зерна 0,8000 г мінералізували K_2SO_4 3,5 г та $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,4 г і 15 мл H_2SO_4 . Відігнаний аміак поглинався 4% борною кислотою. Процес титрування проводився 0,1Н H_2SO_4 і тривав до зниження рН до 4,8.

Непряму оцінку «сили» борошна, тобто визначення індексу седиментації за методом SDS-30, здійснювали на автоматичному приладі з програмним управлінням згідно з патентом № 17023 України.

РОЗДІЛ 3. СИСТЕМИ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ЛІНІЙ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ З ГЕНОМ *Gpc-B1* ВІД *TRITICUM TURGIDUM* SSP. *DICOCCOIDES*

У розділі представлена розробка молекулярних систем ДНК-маркерів для визначення гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*. Для перевірки наявності цільового гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* в дослідних лініях пшениці, отриманих від схрещування сорту Куяльник та гексаплоїдної лінії пшениці Glupro, було розроблено домінуючу і кодомінуючу систему молекулярно-генетичних маркерів.

Результати типової мультиплексної ампліфікації з домінуючою системою праймерів на ген *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* представлено на рис. 1.

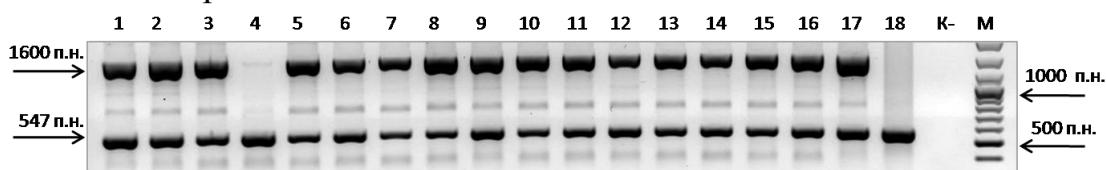


Рис. 1. Електрофореграма результатів мультиплексної ПЛР на наявність гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* та референтного гена *actin*.

Очікуваний амплікон для цільового гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* має довжину 1600 п.н., тоді як референтний ген, має фрагмент на довжині 547 п.н. Відсутність фрагменту на доріжці №4 (рис.1) довжиною 1600 п.н. свідчить про відсутність гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* в дослідному зразку, наявність амплікону довжиною 547 п.н. свідчить про присутність загальної ДНК в зразку і адекватного перебігу ПЛР.

Для визначення алельного стану гена *Gpc-B1* була розроблена кодомінуюча молекулярно-генетична система маркерів, що дає можливість визначити, присутність активного алеля гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* і наявність неактивного алеля від *T. aestivum*. Результат типової електрофореграми ПЛР з кодомінуючою системою праймерів на ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* наведено на рис. 2.

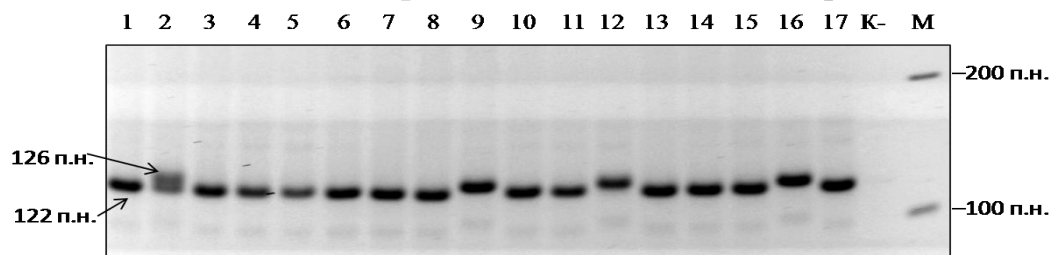


Рис. 2. Електрофореграма результатів ПЛР на наявність гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Амплікон 122 п.н. свідчить про алель гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, амплікон 126 п.н. – вказує про наявність не активного алеля від

T. aestivum. На доріжці №2 (рис.2) присутні два амплікони довжиною 122 п.н. і 126 п.н., що свідчить про гетерозиготний стан гена.

Розроблена кодомінантна молекулярно-генетична система є досконалішою і дає можливість на більш ранньому етапі відбракувати дослідні рослини, що не несуть цільовий ген *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, а також мають гетерозиготний алельний стан гена *Gpc-B1*.

Скринінг поколінь рослин пшениці – носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, за допомогою підібраних систем ДНК-маркерів. Розробленими ДНК-маркерними системами було перевірено чотири покоління дослідних ліній пшениці, починаючи з F₂ і закінчуючи F₅.

Покоління F₂ було представлено у вигляді 160 дослідних сімей у вигляді зразків зеленої маси рослин. Покоління дослідних сімей F₃ було представлено 99 зразками у вигляді зеленої маси рослин. З зібраних зразків обох поколінь було виділено ДНК і проведена мультиплексна ПЛР з домінантною системою праймерів.

З зібраних 160 зразків пшениці F₂ покоління, 99 зразків мали позитивну реакцію на ген *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, а 61 зразок містив неактивний алель гена від *T. aestivum*. Зразки, що мали алель гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, були відібрані та висаджені в ґрунт на наступний рік для отримання F₃ покоління м'якої озимої пшениці.

З 99 відібраних сімей F₃ покоління пшениці ген *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* містила 81 дослідна сім'я.

З сімей пшениці покоління F₄, за фенотиповими показниками, та масою зерен з одного колоса було відібрано 90 найкращих колосів, вимолочено та висаджено в ґрунт зерно кожного колоса в окремий рядок. Відібрані 90 колосів, кожен окремо були перевірені розробленою кодомінантною системою молекулярно-генетичних маркерів на наявність гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Зібране F₅ покоління пшениці було проаналізовано кодомінантною системою ДНК-маркерів на наявність гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* з суміші 5 зерен з різних колосів, що дозволяє стверджувати, що зразки, які мали позитивний гомозиготний стан гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, можуть називатися лініями по даному гену.

Рослини покоління F₅ пшениці також були перевірені на наявність гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*. З 90 зразків, 44 були гомозиготними за даним геном, 18 – гетерозиготними, а 28 – не містили гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Основна увага подальших досліджень буде націлена саме на лінії, що є гомозиготними за геном *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, і відповідно з інтродукованою 6В хромосомою від дикого співродича культурної пшениці, так, як вони є перспективним генетичним матеріалом, для подальших селекційних робіт.

Розробка кодомінантних систем мікросателітних маркерів до локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219*. На 6В хромосомі м'якої

пшениці локалізовані ряд важливих генів, що відповідають за безостість-остистість, субодиниці гліадина, антоціановий колір колеоптиля, відновлення фертильності при цитоплазматичній чоловічій стерильності, стійкість до борошнистої роси, бурої іржі і стеблової іржі тощо. Залучення диких алелей генів з інтродукованою цілою хромосомою є недоцільним тому, для дослідних ліній було важливо, щоб ген *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* був присутній на 6В хромосомі, а вся інша частина 6В хромосоми була заміщена на 6В хромосому культурної м'якої пшениці *T. aestivum* сорту Куяльник (Чекалін та ін., 2008), яка пройшла тисячолітній шлях цілеспрямованого добору волею людини.

Для встановлення факту рекомбінації на 6В хромосомі дослідних сімей пшениці – носіїв гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, було розроблено 4 кодомінантних системи ДНК-маркерів, до SSR локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219* розміщених по обидва боки від локусу інтересу.

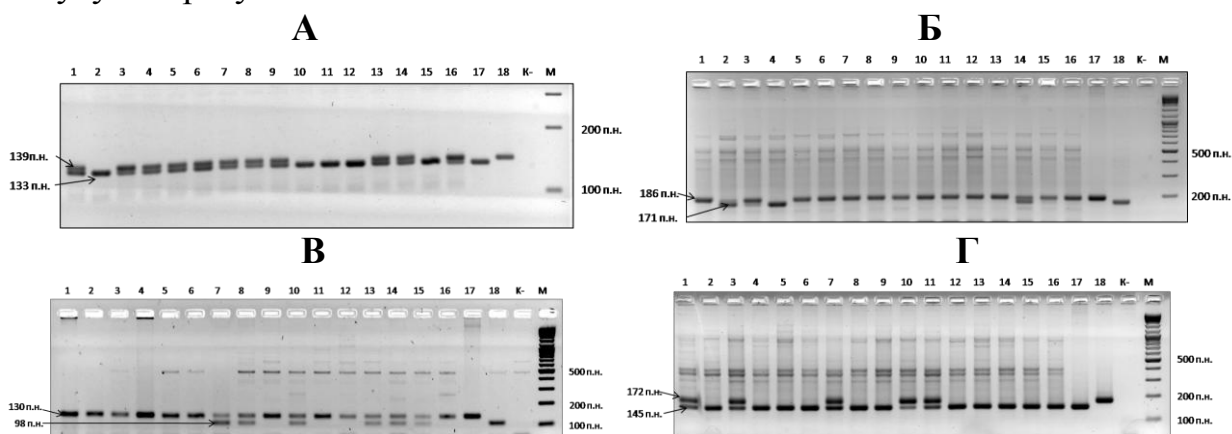


Рис. 3. Типові електрофореграми продуктів ампліфікації SSR локусів *Xgwm508* (А), *Xgwm193* (Б), *Xgwm626* (В), *Xgwm219* (Г).

Амплікон довжиною 133 п.н. вказує про наявність локусу *Xgwm508* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, амплікон – 139 п.н. свідчить, що досліджуваний локус *Xgwm508* від *T. aestivum*. Присутність 2 ампліконів, як наприклад на доріжці №1 (рис. 3А), сигналізує про гетерозиготність локусу. Цінними зразками при перевірці по розробленій системі є сім'ї, що мали локус *Xgwm508* від *T. aestivum*, оскільки це свідчить, що фрагмент хромосоми на якому розташований досліджуваний локус, від культурної м'якої пшениці *T. aestivum*.

Амплікон 171 п.н. свідчить про наявність локусу *Xgwm193* від *T. aestivum*, амплікон – 186 п.н вказує на присутність локусу від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*. Наявність двох ампліконів, як на доріжці №14 (рис. 3Б), вказує на те, що локус *Xgwm193* гетерозиготний. Цінними зразками популяції в даному аналізі, являються зразки, в яких локус *Xgwm193* від *T. aestivum*.

Амплікон 98 п.н. свідчить про присутність локуса *Xgwm626* від *T. aestivum*, тоді як амплікон – 130 п.н. свідчить про наявність локуса

Xgwm626 від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*. Присутність двох ампліконів 98 п.н. та 130 п.н, як на доріжці №8 (рис.3В), свідчить про гетерозиготність локусу *Xgwm626*. Як і для попередніх локусів, в даному випадку найбільшу цінність несуть зразки, у яких локус *Xgwm626* від *T. aestivum*.

Амплікон 145 п.н. свідчить про наявність локуса *Xgwm219* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, тоді як амплікон – 172 п.н. вказує, що локус *Xgwm219* від *T. aestivum*. Наявність двох фрагментів на доріжці, наприклад, як на доріжці №1 (рис. 3Г), свідчить про гетерозиготний стан локуса *Xgwm219*. За результатами перевірки по локусу *Xgwm219* цінність несуть зразки, в яких присутній локус від *T. aestivum*.

SSR локуси *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219* розміщені рівномірно по 6В хромосомі, що дозволяє прослідкувати процес рекомбінації на майже всій довжині хромосоми.

Аналіз рослин пшениці F₃ покоління носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* по підібраним SSR локусам. З використанням розроблених біотехнологічних систем до локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219* було проведено аналіз вибірки сімей пшениці F₃ покоління з метою виявлення цінних сімей з певною генетичною комбінацією локусів, а також визначення частоти рекомбінації за локусами *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219*.

Загалом спостерігали: по локусу *Xgwm508* наявність алеля *T. aestivum* у сімей №25, №120, №157, №158; наявність алеля локусу *Xgwm193* від *T. aestivum* у сімей №25, №28, №63, №158 та №159; наявність алеля локусу *Xgwm626* від *T. aestivum* у сімей №57, №68, №158 та №159; наявність алеля локусу *Xgwm219* від *T. aestivum* у сімей №25, №72, №75, №83, №122, №158 та №159.

Велика кількість зразків була у гетерозиготному стані по вибраним локусам. А саме з 81 сімей, по локусу *Xgwm508* - 27, по локусу *Xgwm193* – 31, по локусу *Xgwm219* – 32, і по локусу *Xgwm 626* – 28, що також є позитивним результатом, у порівнянні з сім'ями, що містили алелі локусів лише від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Отримані дані, дають можливість прослідкувати процес проходження кросенговеру на 6В хромосомі і надають результати для відбору дослідних сімей не лише за фенотиповими показниками, а й за генетипом, що є значно достовірніше і правильніше.

Визначення частоти рекомбінації за локусами *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219*. В результаті обчислень отримано частоту рекомбінації для локусів $Xgwm508 = 2,94 \pm 1,28 \%$, $Xgwm193 = 3,96 \pm 1,51\%$, $Xgwm626 = 2,98 \pm 1,29\%$, $Xgwm219 = 6,77 \pm 2,08\%$.

Дослідження, процесу рекомбінації дає можливість науково прогнозувати вірогідність отримання в подальшому ліній, що матимуть ген *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, а всю іншу частину 6В хромосоми від сорту Куяльник (*T. aestivum*). Хоча даний процес є досить складним і

тривалим у часі, виведення нових високопродуктивних ліній пшениці, з підвищеним вмістом білка, цинку, заліза та мангану є важливим завданням.

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ АЛЕЛЬНОГО СТАНУ ПУРОІНДОЛІНОВИХ ТА ГЛЮТЕНІНОВИХ ГЕНІВ У РОСЛИН НОСІЇВ *GPC-B1* ВІД *TRITICUM TURGIDUM* SSP. *DICOCCOIDES*

Контроль наявності алелей генів *GLU-1* та продуктивності рослин покоління F₅. Визначення алельного стану генів *Glu-1*, проводили в зразках покоління F₅, які є носіями гена *Gpc-B1* від дикого емера *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. Сорт Куяльник, як материнська форма, має екстрасильні показники борошна і несе найсильніші алелі *Glu-D1d* (білкові субодиниці 5 та 10), *Glu-B1al* (білкові субодиниці 7 (екстраекспресія) та 8), *Glu-A1b* (білкова субодиниця 2*), тоді як батьківська лінія, не має таких сильних хлібопекарських якостей і несе алелі *Glu-D1d*, *Glu-B1d*, *Glu-A1a*. Доцільним виявився пошук рекомбінантних рослин.

Маса зерна з головного колосу є одним з важливих елементів продуктивності. Дана ознака тісно пов'язана з показниками кількості зерен у колосі, довжиною колосу та умовами вирощування (Жемела та ін., 2012). Маса 1000 зерен показує крупність і виповненість повітряно-сухих зерен. Вона також є показником якості насіннєвого матеріалу, який враховується при визначенні норми висіву, та в значній мірі визначає схожість і життєздатність (Целуйко та ін., 2014). Пшениця з масою 1000 зерен до 25 г має мілкі зерна, від 25 г до 35 г – зерна середнього розміру, понад 35 г – зерна великого розміру.

Найціннішим алелем для якості хлібопекарського борошна вважається *Glu-D1d*. Для виявлення алельного стану гена *Glu-D1*, була використана мультиплексна ПЛР з специфічними праймерами до локусу (Liu et al., 2008) рис. 4А.

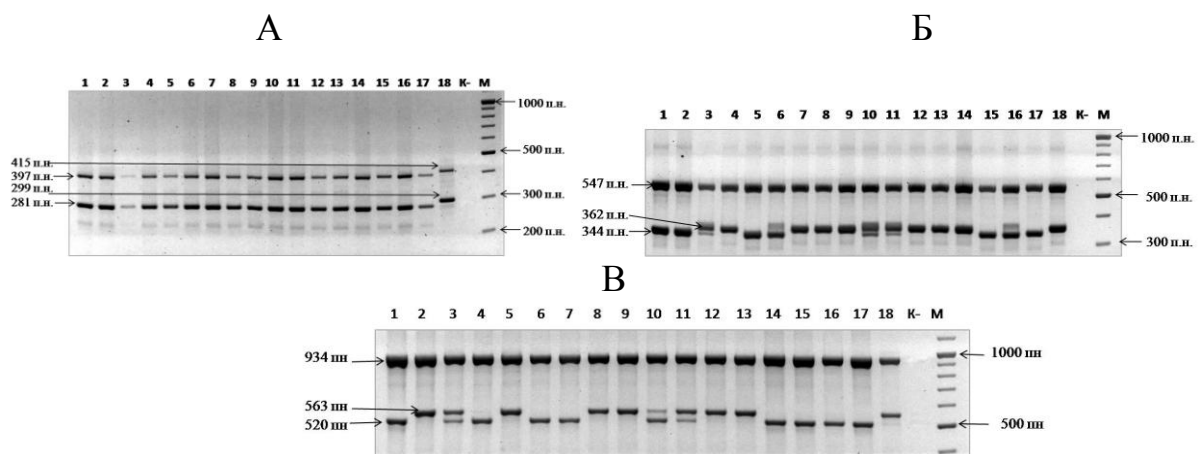


Рис. 4. Типові електрофореграми продуктів ампліфікації ділянок генів *Glu-A1*(А), *Glu-B1*(Б), *Glu-D1*(В).

Обраною системою молекулярно-генетичних маркерів було проаналізовано 44 лінії пшениці. Довжина очікуваних ампліконів становила: *Glu-D1(5)* – 281 п.н., *Glu-D1(2)* – 299 п.н., *Glu-D1(10)* – 397 п.н., *Glu-D1(12)* – 415 п.н. Сорт Куяльник і лінія Glupro мають алель *Glu-D1d*, тобто (5+10), тому поліморфізму у дослідних ліній не виявлено. Наявний алельний стан гена *Glu-D1d* у всіх лініях є позитивним, оскільки саме даний алель має найсильніший вплив на якість борошна.

Наступним етапом роботи був аналіз ділянки гена *Glu-A1*. Материнський сорт пшениці Куяльник є носієм алеля *Glu-Alb*, який кодує субодиницю 2*, тоді як батьківська донорна лінія Glupro несе алель *Glu-A1a* (субодиниця 1). Типова електрофореграма результатів мультиплексної ПЛР ділянки гена *Glu-A1* представлена на рис. 4Б.

Довжина очікуваних ампліконів: у разі наявності субодиниці *Glu-Alb* – складає 344 п.н., у разі наявності субодиниці *Glu-A1a* – 362 п.н., амплікон 547 п.н. вказує на референтний ген *actin*. Серед перевірених 44 сімей було виявлено, що 11 з них несуть *Glu-Alb*, 22 – *Glu-A1a*, а 11 – гетерозиготні. Субодиниці 1 та 2* однаково добре впливають на хлібопекарську якість борошна, тому для нас представляють цінність стабільні гомозиготні лінії з будь-яким з цих алелів.

Лінії-носії гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* аналізувалися на наявність субодиниці *Glu-B1a1*, яка присутня лише у материнського сорту Куяльник, тоді як батьківська лінія несе *Glu-B1d*, який кодує синтез субодиниць 6 та 8. Типова електрофореграма продуктів мультиплексної ПЛР на наявність субодиниці *Glu-B1a1* наведена на рис. 4В.

Довжина очікуваних ампліконів складала: для референтного гена *TaTM20* – 934 п.н., за наявності *Glu-B1a1* – 563 п.н., при відсутності *Glu-B1a1* – 520 п.н. Серед перевірених 44 дослідних ліній було виявлено 21 лінію, котрі несуть *Glu-B1a1*, 16 ліній, що містять *Glu-B1d* і 7 ліній гетерозиготних. Інтерес представляють лінії, які несуть алель *Glu-B1a1*, тому що наявність *Glu-B1d* значно знижує хлібопекарську якість борошна.

Рослини дослідних ліній F₅ покоління вирощувалися у рядках, довжиною по 1,5 м у порівняльному випробуванні. Їх продуктивність оцінювали через такі параметри, як маса 1000 зернівок, кількість зерен у головному колосі та маса зерен з 1 колосу. Отримані дані, за масою 1000 насінин дослідних ліній, дають можливість оцінити їх по виповненню зерна. Материнський сорт Куяльник, має масу 1000 зерен 39,5 г, тоді як у лінія Glupro – 28,1 г. Серед проаналізованих 44 ліній, 8 мали масу 1000 зерен вище ніж у материнського сорту Куяльник, тому саме на ці лінії варто звернути особливу увагу. Також було помічено пряму залежність між масою 1000 зерен та масою зернівок з одного колосу. Залежності між масою 1000 зерен і кількістю зерен з одному колосі не помічено.

За трьома локусами *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* виявлено 16-ть найбільш цінних дослідних ліній. Вони містять оптимальні для хлібопекарської якості алельні форми у локусі *Glu-1* (*Glu-A1a* або *Glu-Alb*, *Glu-B1a1*, *Glu-D1d*). За

результатами перевірки маси 1000 зернівок виявлено, що 2 з 16 ліній мають значення маси більше за материнський сорт. Показано, що комбінування в нащадках алелей, відповідальних за підвищення якості борошна, є важливим етапом створення екстрасильних сортів пшениці. Максимальний ефект цінного алеля досягається правильним підбором генетичного оточення.

Аналіз алельного складу генів *Pina-D1*, *Pinb-D1* у популяції рослин пшениці покоління F₅. Текстура ендосперму контролюється кількома зчепленими генами, розміщеними на короткому плечі хромосоми 5D у локусі *Ha* (*Hardness*). Гени кодують три поліпептиди, які складають білок фриабілін: пуроіндолін *a* (ген *Pina-D1*), пуроіндолін *b* (ген *Pinb-D1*) та Grain Softness Protein (ген *Gsp-1*) (Mohammadi et al., 2014; Beecher et al., 2002; Lillemo et al., 2006). Оцінку алельного стану генів *Pina-D1* та *Pinb-D1*, відповідальних за формування текстури ендосперму проводили за допомогою методу ПЛР і специфічних маркерних систем. Типова електрофореграма продуктів мультиплексної ПЛР на послідовність гена *Pina-D1* представлена на рис. 5А.

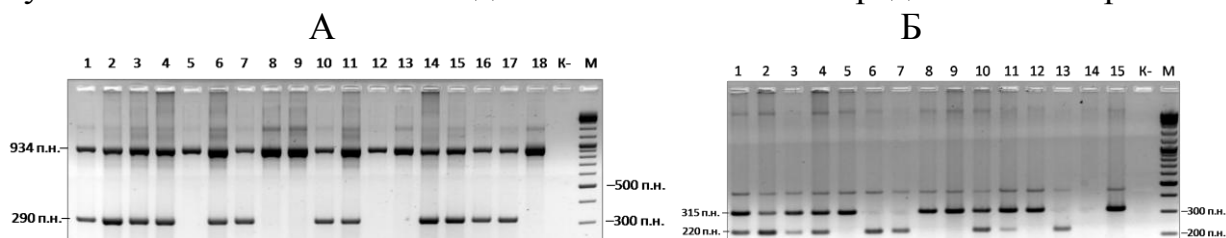


Рис.5. Характерні електрофореграми продуктів ПЛР для генів *Pina-D1* (А), *Pinb-D1*(Б).

Поява амплікону довжиною 290 п.н., свідчить про наявність алелю *Pina-D1a*, успадкованого від материнського сорту Куяльник, тоді як відсутність даного амплікону вказує на наявність алелю *Pina-D1b*, як у батьківської лінії Glupro. В якості референтного був використаний ген *TaTM20* з розміром амплікону 934 п.н. Аналіз зернівок показав, що серед 44 ліній, 32 мали алель *Pina-D1a*, а 12 – *Pina-D1b*. Переважна більшість сортів української селекції несуть алель *Pina-D1a* (Чеботар та ін., 2012) тому, привнесення нового поліморфного генетичного матеріалу на прикладі алеля *Pina-D1b*, має позитивний вплив на подальшу селекцію українських сортів.

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації на ген *Pinb-D1* проводили після гідролізу рестриктазою MbiI у 2%-му агарозному гелі. Типові спектри ДНК фрагментів показано на рис. 5Б.

Амплікон довжиною 315 п.н., вказує на наявність алеля *Pinb-D1a*, тоді як амплікон розміром 220 п.н. – на алель *Pinb-D1b*. З проаналізованих 44 ліній, 12 мають алель *Pinb-D1a*, 17 – *Pinb-D1b*, а 15 були гетерозиготними у даному локусі.

Більшість ліній містять алелі *Pina-D1a* та *Pinb-D1b*, що характерно для сортів української селекції і материнського сорту Куяльник. Наявність алелів *Pina-D1b* та *Pinb-D1a* характерна для сортів пшениці США (Matus-Cadiz et al., 2008), звідки і походить донорна лінія Glupro, носій цілої заміщеної 6В

хромосоми та функціонального гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *diccoides* на ній, яка у нашій роботі є вихідною батьківською лінією (Distelfeld et al., 2006).

Метод інфрачервоної спектрометрії, за яким вимірювали фізичний показник твердозерності, показав, що всі лінії і батьківські форми мають не більше 45 одиниць твердозерності, що відповідає групі м'якозерних сортів пшениці. Крім того зернівки, в яких було виявлено комбінацію алелів *Pina-D1b Pinb-D1a* (медіана = 37) мали статистично достовірну вищу твердозерність ($p < 0,05$) ніж зернівки, в яких було виявлено комбінацію алелів *Pina-D1a Pinb-D1b* (медіана = 14), що добре узгоджується з літературними даними, отриманими на північно американських пшеницях (Matus-Cadiz et al., 2008).

РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ ГЕНА *GPC-B1* ВІД *TRITICUM TURGIDUM* SSP. *DICOCCOIDES* НА ВМІСТ БІЛКА ТА МІНЕРАЛЬНИХ ЕЛЕМЕНТІВ У ЗЕРНІВКАХ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

Визначення вмісту білка в дослідних лініях–носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. Визначення вмісту загального білка в зернівках дослідних ліній пшениці F₅ покоління проводили паралельно двома сучасними методами: прямим експрес методом інфрачервоної спектрометрії (NIR) та арбітражним вимірюванням загального нітрогену у зернівках методом К'ельдаля з подальшим перерахунком у вміст загального білка.

Серед проаналізованих 44 ліній методом К'ельдаля: 12 мали загальний вміст білка вище 14%; 30 ліній – вище 12,5%; і 2 лінії – вище 12%. Максимально високий вміст білка виявлено у лінії №10 – 16,18%, а мінімальний – у лінії №17 – 12,14%. В середньому спостерігався приріст на 14,4% відносно материнського сорту Куяльник. При цьому вміст білка у материнського сорту Куяльник становив 11,85%, а у батьківської лінії Glupro – 15,84%.

Підсумковий графік визначення білка за методом К'ельдаля в дослідних лініях-носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* і порівняння із вмістом у батьківських формах наведено на рис. 6.

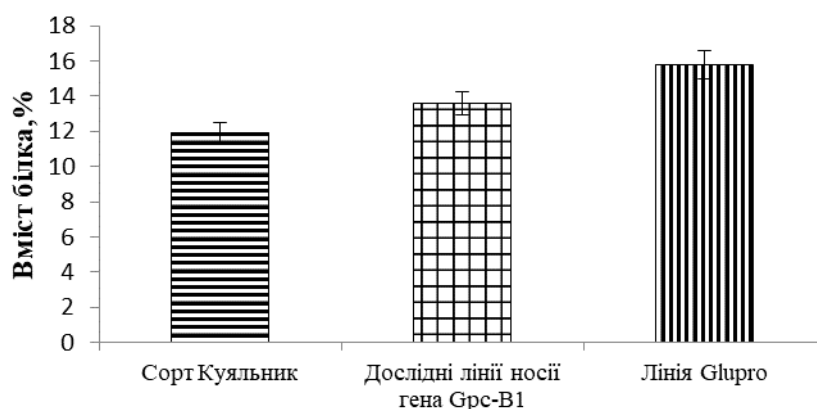


Рис. 6. Графік результатів визначення вмісту білка методом К'ельдаля.

Серед проаналізованих 16 ліній методом (NIR), масова частка білка склала від 14,23% до 16,81%, тоді як у сорту Куяльник ми спостерігали вміст білка 13,49%. У лінії Glupro масова частка білка становила 16,9%. Найбільший вміст білка серед ліній був виявлений у лінії №7 і склав 16,81%. Найменший вміст білка спостерігався у лінії №21 і склав 14,23%, що в будь-якому випадку достовірно більше ніж у вихідного материнського сорту Куяльник. В середньому серед дослідних ліній спостерігається приріст білка на 13,93% порівнянні з вихідним сортом Куяльник. Графік порівняння вмісту білка у дослідних лініях і вихідних формах наведено на рис. 7.

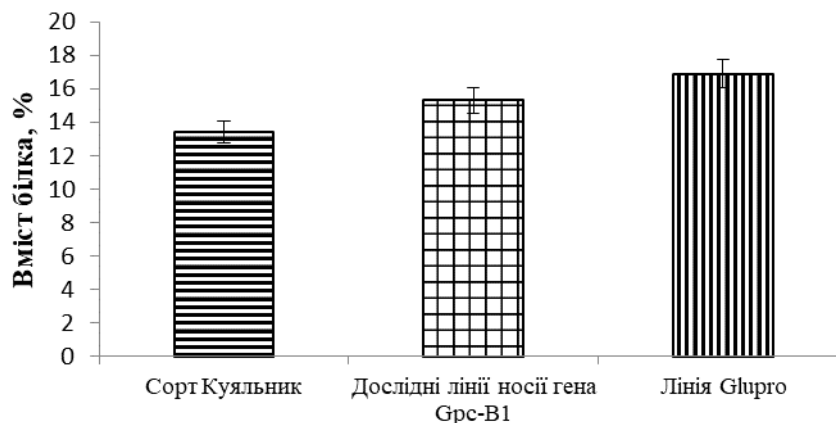


Рис. 7. Графік результатів визначення вмісту білка методом NIR.

Отримані дані аналізу за двома методами перевірки вмісту білка збігаються і чітко вказують на те, що дослідні лінії-носії гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoide* мають підвищений вміст загального білка у зерні в середньому на 14% в порівнянні з вихідним материнським сортом Куяльник.

Контроль вмісту мінеральних елементів у лініях-носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicocoides*. Збалансований вміст мікроелементів у зерні пшениці є не лише важливим для формування високих посівних якостей насіння, але й для забезпечення поживної цінності збіжжя. Чинний державний стандарт ДСТУ 3768:2010 регламентує безпечні для життя і здоров'я людини рівні деяких мікроелементів у зерні пшениці. У даній роботі вимірювання вмісту елементів у зернішках проводили методом мас-спектрометрії з індуктивно зв'язаною плазмою ICP-MS.

У дозрілих зернішках F_4 покоління 8-ми сімей, де контролем слугував материнський сорт Куяльник, виявлено, що середній вміст цинку серед дослідних зразків складає 23,25 мг/кг сухої маси, що на 78% більше, ніж у сорту Куяльник. Максимальне накопичення цинку спостерігалось у сім'ї №94.4, і складало 33 мг/кг, що на 155% більше ніж у контрольного сорту.

Показники вмісту заліза у сім'ях були дещо вищими, порівняно із значеннями для цинку. Середній вміст Fe серед дослідних зразків склав 52,3 мг/кг сухої речовини, що, в свою чергу, більше на 61% ніж у вихідного сорту Куяльник. Максимальний вміст заліза спостерігали у сім'ї №51.5 – 69 мг/кг, а мінімальний – у сім'ї №158.5 – 40 мг/кг.

Середній вміст мангану серед дослідних зразків, склав 50,7 мг/кг сухої речовини, що на 55% більше ніж у вихідного сорту Куяльник. Максимальний вміст мангану спостерігався у сім'ї №18.2 – 65 мг/кг, а мінімальний – у сім'ї №158.5 з показником 45 мг/кг.

Зважаючи на біологічну значимість інших 2-х валентних катіонів, особливу увагу звертали на мідь, магній та кальцій. Середня кількість магнію, у порівнянні з вихідною формою, була більша на 46%, кальцію – на 24%, а міді – на 64%. Особливих змін у вмісті інших елементів не спостерігалось.

Отже, за результатами ICP-MS аналізу по Zn, Fe, Mn, Cu, Mg та Ca в усіх дослідних сім'ях визначено їх підвищений вміст, в порівнянні з вихідним сортом Куяльник. Це підтверджує попередні дослідження (Tabbitta et al., 2013; Uauy et al., 2006), що ген *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* забезпечує реутилізацію біологічно важливих елементів у зерні.

У 2016 році був проведений аналогічний аналіз проб насіння рослин F₅ покоління. Для досліджень брали зернівки у молочній фазі дозрівання. Контролем була вихідна материнська форма – сорт Куяльник.

Вміст цинку в зразках в середньому становив 27,6 мг/кг сухої речовини, що на 28% більше ніж у контролі. Максимальний вміст спостерігався у зразку №98.3 – 33 мг/кг.

Середній вміст заліза у зразках 2016 року становив 28,7 мг/кг сухої речовини, тоді як у контролі – 27,0 мг/кг (різниця 8%). Максимальний вміст заліза спостерігався у зразку №51.5 – 32,0 мг/кг, а мінімальний у №104.5 – 27,0 мг/кг.

Середній вміст марганцю серед дослідних зразків, склав 64,6 мг/кг, що на 31% більше ніж у контролі. Максимальний вміст спостерігався у зразку №125.5 – 77 мг/кг, тоді як мінімальний – у зразку №94.4 – 59 мг/кг сухої речовини.

Окрім того, нам вдалося провести вимірювання кількості Cu і Mg у дослідних пробах. У зразках в середньому вміст міді перевищував контроль на 35%, тоді як вміст магнію – на 5%.

Одним із важливих мікроелементів для пшениці є селен. Він виступає складовим компонентом у понад 30-ти життєво важливих біологічно активних сполуках організму людини і входить в активні центри ферментів системи антиоксидантного захисту організму, метаболізму нуклеїнових кислот, ліпідів, гормонів. Середній вміст селену в дослідних зразках склав 0,207 мг/кг сухої речовини, що на 117% більше ніж у сорту Куяльник, а його максимальний вміст було зафіксовано у зразку №18.2 – 0,41 мг/кг сухої речовини (у 4,5 разів більше контролю).

За результатами досліджень 2015 і 2016 років встановлено, що присутність гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* у зразках м'якої озимої пшениці, співвідносячись зі спостереженнями інших дослідників на ряді зернових колосових культур (Сакмак et al., 2010; Krejčova et al., 2012), зумовлює статистично (на рівні 0,05) значуще підвищення рівня накопичення

важливих біологічно важливих елементів живлення – заліза, цинку, марганцю, міді, селену, а також магнію.

РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ВРОЖАЙНОСТІ ТА СЕЛЕКЦІЙНИХ ПОКАЗНИКІВ ЛІНІЙ-НОСІЇВ ГЕНА *Gpc-B1* ВІД *TRITICUM TURGIDUM* SSP. *DICOCCOIDES*

Даний етап дослідження ліній пшениці є досить важливим, адже батьківська лінія Glurgo є низькорослою і маловрожайною, хоч і має високий вміст білка і мікроелементів. Материнський сорт Куяльник – це середньоросла високоврожайна озима пшениця, районована в Україні. Тому, основною цілю було відібрати лінії високопродуктивні і фенотипово схожі на сорт Куяльник, але з підвищеним вмістом білка та мікроелементів у зерні.

Селекційні показники, знімалися у польових умовах, а контроль за лініями проходив регулярно впродовж усього вегетаційного періоду. Перезимівля рослин у старших поколіннях зазвичай проходила добре. Лінія Glurgo, маючи ярий тип розвитку, висівалася у квітні.

Всі лінії-носії гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicocoides* були стійкими до вилягання, враховуючи, що висота рослин коливалася від 60 до 80 см. Одна із характеристик, яку відслідковували була наявність остей у колосів. Усі ліній, у тому числі і батьківські форми, були остистими.

Після дозрівання пшениці, зерно було обмолочене і зважене. Визначення вмісту загального білка у зерні проводилося методом інфрачервоної спектроскопії, а індекс седиментації – методом SDS-30.

Середня врожайність по Київській області озимої м'якої пшениці в 2017 році склала 36,1 ц/га. Врожайність батьківських форм була: сорту Куяльник – 55,6 ц/га, а лінії Glurgo – 30,7 ц/га. Серед 13-ти ліній пшениці, носіїв гена *Gpc-B1*, можна обрати п'ять з найкращою врожайністю, що наближається до сорту Куяльник. Це лінія №14 – 50,5 ц/га, №38 – 44,9 ц/га, №41 – 49 ц/га, №67 – 54,5 ц/га і №68 – 47,5 ц/га. Середня врожайність ліній склала 43 ц/га, що переважає таку по регіону та на 40% вище ніж у вихідної лінії Glurgo. Отримані результати збіжжя є тільки першим етапом у дослідженні фактору продуктивності дослідних ліній пшениці у польових умовах.

На додаток, оцінювався вміст запасного білка методом інфрачервоної спектроскопії. У вихідних форм він складав: сорт Куяльник – 10,8%, тоді як у лінії Glurgo – 14,9%. Серед 13-ти ліній пшениці, носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicocoides*, вміст білка більше 14% спостерігався у 6-ти, а саме №39 – 14,4% , №45 – 14,0%, №64 – 14,1%, №66 – 14,4%, №75 – 14,3% і №86 – 14,1%. Згідно держстандарту за показником якості зерна по вмісту білка, дані лінії відносяться до 1 класу. Порівнюючи вміст білка цих 6-ти ліній з сортом Куяльник, в середньому вміст білка був вище на 30%, що є вражаючим досягненням. Лініями, в яких вміст білка склав не менше 12,5%, були: №14 – 13,2%, №38 – 12,9%, №41 – 13,4%, №67 – 12,5%, №68 – 13,0%, №80 – 13,3% і №81 – 13,8%, відносяться до 2 класу зерна. У даному

разі збільшення вмісту загального білка відбулося в середньому на 21%. Проаналізувавши результати по вмісту білка в лініях-носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* за 2016 і 2017 роки, помітно, що цільовий ген дійсно позитивно впливає на вміст білка в дослідних лініях, а дана властивість успішно передається в наступні покоління.

Надалі було проведено аналіз хлібопекарської якості зерна пшениці методом непрямої оцінки «сили» борошна – індексом седиментації SDS-30. Серед 13-ти ліній індекс седиментації SDS-30 у більшості зразків був більше 80 мл, за виключенням лінії №39 в якій він склав 50 мл. Високий індекс седиментації SDS-30, вказує на високу хлібопекарську якість борошна.

Дослідні лінії-носії гена *Gpc-B1*, поєднуючи в собі найкращі властивості обох батьків, були стійкими до полягання, середньорослими, з помірною врожайністю, але кращою за середню 2017 року по регіону. Вміст загального білка в їх зерні був на 20-30% вище ніж у вихідного сорту Куяльник.

РОЗДІЛ 7. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

В розділі наведено узагальнення відомостей наукової літератури та результатів власних експериментів, стосовно ефективності використання генетичного фактору *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* для поліпшення ознак якості зерна пшениці м'якої озимої. Розроблений комплексний підхід до аналізу рослин різних поколінь, дає можливість всебічно оцінити і відібрати генотипи, що є не лише носіями даного гена, але й такими, що забезпечують яскравий фенотиповий прояв цільових ознак у добре адаптованому місцевому генетичному оточенні. Відпрацьована біотехнологія добору ліній разом з маркер-допоміжною селекцією була ефективною у поліпшенні ознак якості зерна пшениці (підвищення вмісту білка, корисних мікроелементів) у поєднання з високими господарсько цінними показниками самих рослин. За нашою технологією створено та вивчено 160 дослідних ліній, з яких відібрано 13-ть як особливо цінних і перспективних для подальших селекційних робіт.

ВИСНОВКИ

Виконані комплексні дослідження генетичних ефектів гена *Gpc-B1*, інтродукованого з *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, дозволили започаткувати технологію добору ліній м'якої озимої пшениці, у яких поліпшена якість зерна. Застосована біотехнологія маркер-залежної селекції забезпечила створення новітнього селекційного матеріалу пшениці з підвищеним вмістом білка та корисних мікроелементів у зерні у поєднанні з високими господарсько цінними властивостями рослин.

1. Розроблено домінуючу та кодомінуючу молекулярно-генетичні системи ДНК-маркерів для виявлення гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в рослинах м'якої озимої пшениці.

2. Розроблено чотири кодомінантні молекулярно-генетичні системи ДНК-маркерів до SSR локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219*, що розташовані на 6В хромосомі і обраховано частоту рекомбінації локусів, яка становить для *Xgwm508* = 2,94 ± 1,28 %, *Xgwm193* = 3,96 ± 1,51%, *Xgwm626* = 2,98 ± 1,29%, *Xgwm219* = 6,77 ± 2,08%.
3. В результаті проведеного аналізу алелів генів глютенінів рослин пшениці F₅ покоління було відібрано 16 найбільш цінних ліній, що містять оптимальну для хлібопекарської якості алельну формулу локусу *Glu-1* (*Glu-A1a* або *Glu-A1b*, *Glu-B1al*, *Glu-D1d*).
4. При аналізі алельного стану пуроіндолінових генів у рослинах F₅ покоління, носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, було виявлено 17-ть ліній з 44-х, що мали алельний стан аналогічний до материнського сорту Куяльник, а також 12-ть унікальних ліній, що несли комбінацію алелів *Pina-D1b*, *Pinb-D1a*, не притаманну сортам української селекції
5. Комплексний аналіз вимірювання вмісту загального білка зернівок у рослин F₅ покоління методом К'ельдаля та NIR, встановив, що завдяки гену *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* підвищується вміст білка на 14% у порівнянні з вихідним сортом Куяльник.
6. Аналіз рослин F₄ і F₅ поколінь на вміст біологічно важливих елементів методом ICP-MS, встановив, що присутність гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* зумовлює статистично (на рівні 0,05) значуще підвищення рівня накопичення у зернівках заліза, цинку, марганцю, міді, селену та магнію.
7. Оцінювання врожайності та селекційних показників ліній пшениці F₆ покоління, носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, встановило їх стійкість до полягання та середню врожайність на рівні 43 ц/га.
8. Розроблена технологія відбору ліній пшениці озимої з геном *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, направлена на поліпшення ознак якості зерна, була впроваджена у вітчизняних селекційних програмах Інституту фізіології рослин і генетики НАН України та Селекційно генетичного інституту – Національному центрі насіннєзнавства та сортівивчення НААН України (акти впровадження від 28.03.2018 та 01.04.2018).

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Дослідження генотипів пшениці м'якої з перенесеним геном *Gpc-B1* від *T.turgidum* ssp. *dicoccoides* / [С. Ю. Похилько, А. В. Трояновська, А. І. Степаненко, О. Ю. Урбанович, О. М. Дуган, О. І. Рибалка, Б. В. Моргун]. // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. – 2016. – №2016. – С. 132–136. (Особистий внесок здобувача: розроблено та оптимізовано кодомінантну і домінантну системи молекулярних маркерів для визначення гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* та розроблено молекулярні системи до локусів

Xgwm626, Xgwm508, Xgwm193, Xgwm219, а також проведено аналіз за даними системами сімей F_3 покоління, робота над текстом статті)

2. ICP-MS analysis of bread wheat carrying the *Gpc-B1* gene of *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* / [S. Y. Pokhylko, V. V. Schwartau, L. M. Mykhalska, O. M. Dugan, B. V. Morgun]. // *Biotechnologia acta*. – 2016. – No.5. – P. 64–69. (Особистий внесок здобувача: проведено планування дослідження, відбір та підготовка зразків до аналізу, обрахунок результатів, написання тексту статті) Входить до міжнародних наукометоричних баз даних: CrossRef, Directory of Open Access Journals (DOAJ), Google Scholar, Chemical Abstracts Service (CAS), Open Academic Journals Index (OAJI), JournalTOCs, Index Copernicus тощо.

3. Генетичне різноманіття пуринодолінових генів серед ліній пшениці м'якої, носіїв *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* / [Б. В. Моргун, С. Ю. Похилько, В. М. Починок, В. П. Дуплій, О. М. Дуган, О. О. Христан, А. І. Степаненко]. // *Фізіологія рослин і генетика*. – 2017. – №3. – С. 229–236. (Особистий внесок здобувача: відбір зразків для аналізу, виділення ДНК та проведення ПЛР аналізу, робота над текстом статті) Входить до міжнародних наукометоричних баз даних: Thompson Scientific, РИНЦ.

4. Комплексний аналіз вмісту загального білка в зерні м'якої пшениці, яка містить ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* / [С. Ю. Похилько, В. В. Швартау, В. М. Починок, Л. М. Михальська, О. М. Дуган, Б. В. Моргун]. // *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. – 2017. – №1. – С. 52–57. (Особистий внесок здобувача: проведено планування дослідження, відбір зразків та підготовка зразків для аналізу, написання тексту статті)

5. Визначення алельного стану генів *Glu-1* в гібридних сім'ях, носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* / С. Ю. Похилько, А. І. Степаненко, О. М. Дуган, Б. В. Моргун. // *Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць*. – 2017. – Т.21. – С. 168–173. (Особистий внесок здобувача: відбір зразків для аналізу, виділення загальної ДНК та проведення ПЛР аналізу, аналіз отриманих результатів, робота над текстом статті)

6. Степаненко А.І. Виявлення цінних алелів високомолекулярних глютенів (ВМГ) пшениці з використанням молекулярних маркерів // А. І. Степаненко, Б. В. Моргун, С. Ю. Похилько // III Міжнародна наукова конференція «Регуляція росту і розвиток рослин: фізіолого-біохімічні і генетичні аспекти» (Харків, 11-12 листопада, 2014 року) – С. 60-61. (Особистий внесок здобувача: прийняття участі в розробці систем молекулярних маркерів для виявлення високомолекулярних глютенів)

7. Трояновская А.В. Определение ценных аллелей гена *Gpc-B1* в генотипах мягкой пшеницы // А. В. Трояновская, С. Ю. Похилько, Б. В. Моргун, А. И. Степаненко, А. И. Рибалка, С. С. Полищук // II Международная научная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы : материалы конференции (Минск, 13-16 октября, 2015) – С.128. (Особистий внесок здобувача: розроблено та оптимізовано систему молекулярних маркерів для визначення гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*)

8. Скринник М. М. Розробка кодомінантної системи маркерів для визначення гена *Gpc-B1* в гібридах м'якої пшениці // М. М. Скринник, С. Ю. Похилько, А. І. Степаненко // *Біологія: від молекули до біосфери: тези доповідей X Міжнародної конференції молодих учених* (Харків, 2-4 грудня, 2015) – С. 41.

(Особистий внесок здобувача: розроблена та оптимізована кодомінантна система визначення гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* та проведення ПЛР аналіз зразків пшениці, робота над текстом тез)

9. Похилько С. Ю. Мікроелементний склад м'якої пшениці з геном *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* // С.Ю. Похилько, А.В. Трояновська, А. І. Степаненко, О. М. Дуган, О. І. Рибалка, Б. В. Моргун // Біотехнологія XXI століття: тези доповідей X Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченої 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга (Київ, 22 квітня 2016 року) – С. 75. (Особистий внесок здобувача: проведено планування дослідження, відбір та підготовка зразків до аналізу, написання тексту тез)

10. Похилько С. Ю. Аналіз білкових фракцій озимої пшениці носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*// С. Ю. Похилько, Б. В. Моргун, А. І. Степаненко, О. М. Дуган // I Міжнародна науково-практична інтернет конференція «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації» (Київ, 14-15 грудня 2016 року) – С. 439-445. (Особистий внесок здобувача: відбір та підготовка зразків до аналізу, безпосереднє прийняття участі в аналізі, написання тексту тез)

11. Похилько С. Ю. Алельний склад пуринодолинових генів у гібридних сім'ях пшениці м'якої, носіях *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* // С. Ю. Похилько, А. І. Степаненко, О. М. Дуган, Б. В. Моргун // Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Тернопільські біологічні читання – 2017» (Тернопіль, 20-22 квітня 2017 року) – С.287-291. (Особистий внесок здобувача: відбір зразків для аналізу, виділення ДНК та проведено ПЛР-аналізу, робота над текстом тез)

12. Похилько С. Ю. Виявлення цінних алелей високомолекулярних глютенінів у гібридних сім'ях носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* // С. Ю. Похилько, А. І. Степаненко, О. М. Дуган, Б. В. Моргун // Матеріали XI Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 21 квітня 2017 року) – С.63. (Особистий внесок здобувача: відбір зразків для аналізу, виділення загальної ДНК, проведення ПЛР аналізу, написання тексту тез)

13. Похилько С. Ю. Аналіз вмісту загального білка в гібридних сім'ях носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* методом інфрачервоної спектрометрії // С. Ю. Похилько, А. І. Степаненко, В. М. Починок, О. М. Дуган, Б. В. Моргун // Матеріали Третьої конференції молодих вчених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, 16-18 травня 2017 року) – С.76 (Особистий внесок здобувача: відбір та підготовка зразків до аналізу, безпосередня участь в аналізі, написання тексту тез)

14. Pokhylko S. Influence of gene *Gpc-B1* of *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* on grain protein content in bread wheat // S. Pokhylko, V. Schwartau, V. Pochinok, L. Mykhalska, O. Dugan, B. Morgun // The 3rd international symposium on Eurasian biodiversity (Minsk, 05-08 July 2017) – P.417. (Особистий внесок здобувача: проведено планування дослідження, відбір зразків для аналізу, аналіз даних, брала участь в написанні тексту тез)

15. Михальська Л.М. Дослідження вмісту білка в гібридних лініях пшениці – носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*// Л. М. Михальська,

С. Ю. Похилько, В. В. Швартау, О. М. Дуган, Б. В. Моргун // Матеріали VI Міжнародної конференції «Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти» (Львів, 4-6 жовтня 2017 року) – С.34-35. (Особистий внесок здобувача: проведено планування експерименту, проведено відбір і підготовка зразків для аналізу, написання тексту тез)

АНОТАЦІЯ

Похилько С. Ю. Технологічні аспекти біофортificaції м'якої пшениці геном *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», МОН України, Київ, 2018.

Дисертаційна робота присвячена біотехнологічним аспектам біофортificaції озимої м'якої пшениці геном *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, що підвищує вміст білка та мінеральних елементів.

Розроблено молекулярно генетичні маркерні системи для комплексного аналізу та відбору рослин з популяції м'якої озимої пшениці, носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

З 160-ти дослідних сімей F_2 покоління, було відібрано 44-и ліній F_5 покоління, гомозиготних за цільовим геном. Вони були комплексно охарактеризовані по генам пуринодолінів та глютенінів, проведено вимірювання вмісту макро- та мікроелементів, визначено вміст загального білка у зерні та зрештою відібрано 13-ть ліній, які є цінним і перспективним матеріалом для подальших селекційних робіт.

Проведено аналіз врожайності та фізіологічних показників ліній пшениці, носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, який показав, що лінії є стійкими до полягання, середньорослими з середньою врожайністю, високим вмістом та якістю запасного білка.

Ключові слова: *Triticum aestivum*, ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, біофортificaція, ДНК-маркери, підвищений вміст білка і макро- та мікроелементів.

АННОТАЦИЯ

Похилько С. Ю. Технологические аспекты биофортификации мягкой пшеницы геном *Gpc-B1* от *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. - На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 - биотехнология. - Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт имени Игоря Сикорского», МОН Украины, Киев, 2018.

Диссертация посвящена биотехнологическим аспектам биофортификации озимой мягкой пшеницы геном *Gpc-B1* от *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, который повышает содержание белка и минеральных элементов в зерне.

Разработаны молекулярно генетические маркерные системы для комплексного анализа и отбора образцов мягкой пшеницы, носителей гена *Gpc-B1* от *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. С их помощью для SSR локусов *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219*, расположенных на 6В хромосоме, было рассчитано частоту рекомбинации, которая составила для *Xgwm508* = $2,94 \pm 1,28\%$, *Xgwm193* = $3,96 \pm 1,51\%$, *Xgwm626* = $2,98 \pm 1,29\%$, *Xgwm219* = $6,77 \pm 2,08\%$.

Из 160-ти семей F_2 поколения, методическим ежегодным анализом было отобрано 44 линии F_5 поколения, гомозиготных по гену *Gpc-B1*, перенесенным из *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Проведен анализ аллельного состояния пуриноидиновых генов F_5 поколения линий пшеницы, носителей гена *Gpc-B1* от *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, а также был измерен физический показатель твердозерности. Выявлено 17 линий, имеющих такое же аллельное состояние генов, как у исходного сорта Куяльник, а также обнаружены уникальные генотипы, несущие комбинацию *Pina-D1b*, *Pinb-D1a*, которую не было выявлено ранее в сортах украинской селекции. Статистическая обработка данных показала, что сочетание аллелей *Pina-D1b* *Pinb-D1a* статистически достоверно ($p < 0,05$) обеспечивало большую твердозерность, чем у растений, с аллелями *Pina-D1a* *Pinb-D1b*.

В ходе выполнения работы был проведен анализ аллельного состояния генов глютенинов озимых линий пшеницы F_5 поколения и отобрано 16-ть наиболее ценных, содержащих оптимальную для хлебопекарского качества аллельную формулу локуса *Glu-1* (*Glu-A1a* или *Glu-A1b*, *Glu-B1a1*, *Glu-D1d*).

Проанализированы линии пшеницы F_4 и F_5 поколений на содержание макро- и микроэлементов в зерне методом ICP-MS. Было установлено, что присутствие гена *Gpc-B1* от *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в линиях пшеницы приводит к статистически (на уровне 0,05) значимому повышению уровня накопления биологически важных элементов питания – железа, цинка, марганца, меди, селена, а также магния.

Проведен комплексный анализ определения содержания общего белка в зерне растений F_5 поколения методом Кьельдаля и NIR. В среднем содержание белка в линиях, которые были носителями гена *Gpc-B1* из *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, повышалось на 14% по сравнению с исходным сортом Куяльник. В результате было отобрано 13-ть линий, перспективных для дальнейшей работы.

Разработанная технология отбора по урожайности и физиологическим показателям позволила в F_6 поколении носителей гена *Gpc-B1* от *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* определить линии устойчивые к полеганию, среднерослые и со средней урожайностью, которая даже превышала

среднюю урожайность сортов озимой пшеницы 2017 года в Киевской области, и на была 40% выше чем у исходной линии Glupro.

Нами был проведен анализ хлебопекарного качества зерна пшеницы методом непрямо́й оценки «силы» муки – индексом седиментации SDS-30. У большинства линий пшеницы он был больше 80 мл, что считается очень хорошим показателем. Высокий индекс седиментации SDS-30, указывает на отменное хлебопекарное качество муки.

Суммируя все показатели разработанной технологии отбора можно отметить, что линии-носители гена *Gpc-B1* от *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* являются уникальным генетическим материалом, который сочетает в себе лучшие свойства родителей и в дальнейшем будет использоваться для создания новых высокоперспективных сортов пшеницы.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, ген *Gpc-B1* от *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, биофортификация, ДНК-маркеры, повышенное содержание белка и макро- и микроэлементов.

SUMMARY

Pokhylko S. Yu. Technological aspects of bread wheat biofortification of *Gpc-B1* gene from *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. - Manuscript.

Thesis to obtain the scientific degree of candidate of biological sciences by specialty 03.00.20 – biotechnology. - National Technical University of Ukraine ‘Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute’, MES of Ukraine, Kyiv, 2018.

The dissertation is devoted to the biotechnological aspects of winter bread wheat biofortification by the *Gpc-B1* gene introgressed from *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, which increases the content of protein and minerals in grain.

Molecular-genetic marker systems for the complex analysis and selection of bread wheat hybrids, the carriers of *Gpc-B1* gene from *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, have been developed.

The 44 lines of F₅ generation, homozygous in target gene were selected from 160 plants of F₂ generation.

The generation of F₅ hybrid lines was thoroughly characterized by the puroindolins and glutenins genes. The macro- and micronutrient content analysis was performed. The content of total protein in grain was determined, and eventually, 13 hybrid lines were selected for the future work.

The analysis of yield and physiological parameters of lines-carriers of *Gpc-B1* gene from *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* showed that the lines were resilient to lodging, medium-growing with medium yields.

Key words: *Triticum aestivum*, gene *Gpc-B1* from *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, biofortification, DNA markers, high content of protein, macro- and microelements.