

ГАЛАЄВА М. В.^{1✉}, ГАЛАЄВ О. В.¹, ПОГРЕБНЮК О. О.¹, ФАЙТ В. І.¹, РАХМАТОВ М.²

¹ Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення, Україна, 65036, м. Одеса, вул. Овідіопольська дорога, 3, ORCID: 0000-0001-8133-5184, 0000-0001-7247-2910, 0000-0001-9994-341X, 0000-0001-7491-2836

² Шведський аграрний університет,

Швеція, SE-23053, Алнарп

✉ mariagal1@ukr.net

ЗАСТОСУВАННЯ KASP-ТЕХНОЛОГІЙ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ АЛЕЛІВ ГЕНІВ ПОЛІФЕНОЛОКСИДАЗИ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

Мета. Характеристика рекомбінантно-інбредних ліній F₇ Лузанівка одеська / Одеська червоноколоса за генами поліфенолоксидази (PPO) з використанням KASP-технологій і виявлення зв'язку алельних відмінностей за генами *Ppo* з агрономічно важливими ознаками м'якої пшениці. **Методи.** Конкурентна алель-специфічна ПЛР (KASP). Фенологічні спостереження, елементи структури врожаю. **Результати.** Оцінено поліморфізм батьківських генотипів і популяції рекомбінантно-інбредних ліній за генами *Ppo-A1* й *Ppo-D1*. Виявлено поліморфізм між батьківськими формами за геном *Ppo-D1* і проведено зіставлення даних KASP-аналізу ліній з результатами оцінювання ліній за восьми агрономічними ознаками пшениці. **Висновки.** Відмінності за алелями гену *Ppo-D1* не впливали на тривалість періоду до колосіння, висоту рослин, кількість зерна з колоса, масу тисячі зерен, кількість продуктивних пагонів на одиницю площі й урожайність. Спостерігалось збільшення маси зерна колоса у ліній зі сприятливим алелем *Ppo-D1a*. Добір генотипів з алелем *Ppo-D1a*, який пов'язаний з низькою активністю ферменту PPO, не має негативного впливу на агрономічно важливі ознаки пшениці.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., рекомбінантно-інбредні лінії, KASP-маркери, PPO.

Пшениця м'яка (*Triticum aestivum* L.) є однією з основних злакових культур у світі. Вона забезпечує 20 % калорій і приблизно 23 % білка, які споживає населення світу. Ключовими параметрами, на які необхідно спиратися при проведенні селекції з метою одержання високопродуктивних сортів пшениці, є врожайність, якість зерна і стійкість до абіотичних та біотичних стресових факторів.

Одним з ферментів, який впливають на якість зерна пшениці, є поліфенолоксидаза

(PPO). Активність поліфенолоксидази (PPO) сильно пов'язана з небажаним потемнінням кінцевих продуктів на основі пшениці таких як локшина [1, 2], макаронні вироби [3] і хліб. PPO каталізують окислення фенолів, що призводить до отримання продуктів темного кольору, небажаних для більшості виробів з пшениці [2, 3]. Тому створення сортів пшениці з низькою активністю PPO є одним із важливих завдань у селекційних програмах. Завдяки зусиллям селекціонерів нові алелі генів *PPO* з мутаціями, що ефективно знижують рівень активності PPO рослин, наразі впроваджуються у різноманітні культури для запобігання ферментативному окисленню харчових продуктів з надією подовжити термін зберігання і зменшити кількість харчових відходів [4, 5].

Багато досліджень на сьогоднішній день доводять, що активність PPO в основному зумовлена генами, розташованими в гомеологічних хромосомах другої групи у пшениці [6]. Члени сімейства аналогічних генів *Ppo-1*, що складається з *Ppo-A1* і *Ppo-D1* локалізовані на довгому плечі хромосом 2A й 2D відповідно [7]. Алельна варіація *Ppo-A1* і *Ppo-D1* пов'язана зі зміною активності PPO у зерні [7–9].

Маркер-супутня селекція (marker assisted selection, MAS) – підхід, який дозволяє за допомогою генетичних маркерів відбирати генотипи, що несуть бажані алелі важливих для дослідника генів. Однонуклеотидний поліморфізм (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) – заміна одного нуклеотиду в будь-якій частині геному в результаті природної мутації є найбільш досліджуваним поліморфізмом у геномі рослин. Одним із найефективніших і найшвидших способів аналізу SNP є технологія KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) – конкурентна алель-специфічна ПЛР з флуоресцентною детекцією, у якій виявляють поліморфізм за допомогою спе-

© ГАЛАЄВА М. В., ГАЛАЄВ О. В., ПОГРЕБНЮК О. О., ФАЙТ В. І.1, РАХМАТОВ М.

цифічних олігонуклеотидів, що містять на 3'-кінці детектовану заміну. Така високопродуктивна геномна маркерна технологія дуже ефективна для м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.). З використанням KASP-маркерів можливо добирати генотипи з бажаними алелями генів *Ppo* і таким чином поліпшувати якість отриманого матеріалу. Проте важливим є під час добору за генами якості не втратити у продуктивності пшениці. До того ж сорти пшениці, які вирощуються на півдні України раніше не досліджували за генами *Ppo* і не відомо сильні чи слабкі алелі генів вони утримують.

Отже, метою цієї роботи була характеристика рекомбінантно-інбредних ліній Лузанівка одеська / Одеська червоноколоса за генами поліфенолоксидази з використанням сучасних KASP-технологій і виявлення зв'язку алельних відмінностей за геном *Ppo* з агрономічно важливими ознаками м'якої пшениці.

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень слугували два батьківські сорти і 99 рекомбінантно-інбредних ліній F₇ Лузанівка одеська / Одеська червоноколоса, що були створені у відділі загальної та молекулярної генетики Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннезнавства та сортовивчення.

ДНК виділяли з використанням «Набору реагентів для виділення ДНК з біологічного матеріалу рослинного походження – Plant Genomic DNA Extraction kit» (ТОВ «Виробнича фірма Сіместа», Україна) згідно інструкції.

KASP-генотипування батьківських сортів і рекомбінантно-інбредних ліній проводили за двома генами поліфенолоксидази *Ppo-A1* та *Ppo-D1*. Інформацію щодо послідовності прай-

мерів і поліморфізмів, які детектуються, наведено у таблиці 1.

ПЛР при виконанні KASP-генотипування проводили в реакційній суміші об'ємом 10 мкл, що містить наступні компоненти: 30 × KASP Primer Mix (містить алель-специфічні праймери: 3 KASP-праймера, спеціальним чином синтезованих для аналізу цільової ділянки з SNP) – 0,14 мкл; KASP V4.0 2X Master mix (LGC Biosearch Technologies, Великобританія) – 5,0 мкл; ДНК досліджуваних генотипів пшениці 15–30 нг / 5 мкл.

Для проведення ампліфікації з детекцією у режимі реального часу програмували CFX96 Real-time PCR Detection System (Bio-Rad, США) наступним чином: 94,0°C – 15 хв, [94,0°C – 20 с, 61,0°C – 60 с] – 10 циклів, [94,0°C – 20 с, 55,0°C – 60 с] – 30 циклів, крок зчитування флуоресцентного сигналу при 37°C протягом 1 хв. Візуалізацію результатів здійснювали за допомогою програми CFX Maestro™, BioRad. Результати генотипування оцінювали на підставі аналізу 2D-графіка алельної дискримінації, на якому по осі X показані стандартизовані дані фінального рівня флуоресценції для першого флуорофору FAM, по осі Y – для другого флуорофору HEX.

Для виявлення зв'язку різних алелів гену поліфенолоксидази з проявом тих або інших господарсько цінних ознак насіння батьківських сортів і 47 ліній висівали восени (8, 10 і 20 жовтня у 2015, 2016, 2017 роки) з розрахунку по 500 схожих зерен на 1 м². Облікова площа ділянки 3 м². Повторність досліду трикратна. Під час вегетації реєстрували дату колосіння візуально за наявності на ділянці 75 % рослин, що колосилися, яку потім трансформували в тривалість періоду до колосіння (ТПК) і підраховували кількість продуктивних пагонів на одиницю площі (КПП).

Таблиця 1. Поліморфізм генів поліфенолоксидази, що детектується з допомогою KASP-маркерів

Локус	Праймер	Поліморфізм FAM/HEX	Алель	Активність PPO
<i>Ppo-A1</i>	FAM: GACGACCTGCACSTTTCT GT	C/T	<i>Ppo-A1a</i> / <i>Ppo-A1b</i>	висока / низька
	HEX: GACGACCTGCACSTTTCTGA			
	Common: CAAACCCACGCAGGGACAAGT			
<i>Ppo-D1</i>	FAM: AAG AGA CCA GCA GAT CGA TG	G/C	<i>Ppo-D1b</i> / <i>Ppo-D1a</i>	Висока / низька
	HEX: AAG AGA CCA GCA GAT CGA TC			
	Common: TACTGGCCTGGCGGTACATGAT			

Під час збирання урожаю визначали урожай зерна з ділянки (УЗ). Після жнив у відібраних 45 рослин кожного генотипу (по 15 рослин з повторення) фіксували висоту рослин (ВР), продуктивне кущіння (ПК), кількість (КЗК) і масу зерна колоса (МЗК), масу 1000 зерен (МТЗ).

Метеорологічні умови за період проведення досліджень включали весь спектр можливих несприятливих факторів середовища, які поширені в Степу України. Це дозволило об'єктивно оцінити вихідний матеріал щодо середньої адаптованості для цих умов, а також надало можливість провести диференціацію РІЛ озимої пшениці за комплексом господарсько-цінних ознак у залежності від року досліджень і присутності різних алелів гену поліфенолоксидази.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики й однофакторного дисперсійного аналізу з використанням пакету програм Microsoft Excel (2007). Для оцінки значущості фактору «генотип» на варіювання ознак, що вивчали, при порівнянні двох вибірок використовували F-критерій Фішера.

Результати та обговорення

Ген *PPO-A1*, розташований на хромосомі 2A пшениці, кодує фермент поліфенолоксидаза. SNP (C > T), виявлений між сортами з різною активністю фермента, утворює два алелі: *Ppo-A1a* і *Ppo-A1b*. Наявність алелю *Ppo-A1a* корелює з високою активністю поліфенолоксидази, а наявність алелю *Ppo-A1b* – з низькою активністю зазначеного ферменту. В наших дослідженнях з використанням KASP-технологій виявлено, що батьківські сорти Лузанівка одеська й Одеська червоноколоса і відповідно всі рекомбінантно-інбредні лінії пшениці несуть несприятливий алель *Ppo-A1a* (рис. 1).

Ген *Ppo-D1* розташований на хромосомі 2D пшениці. Відомі два алелі зазначеного гену *Ppo-D1a* і *Ppo-D1b*. Батьківські форми розрізнялися між собою за геном *Ppo-D1*. Сорт Лузанівка одеська мав сприятливий алель *Ppo-D1a*, що відповідає низькій активності поліфенолоксидази. Сорт Одеська червоноколоса характеризувався несприятливим алелем *Ppo-D1b*, який пов'язаний з високою активністю ферменту.

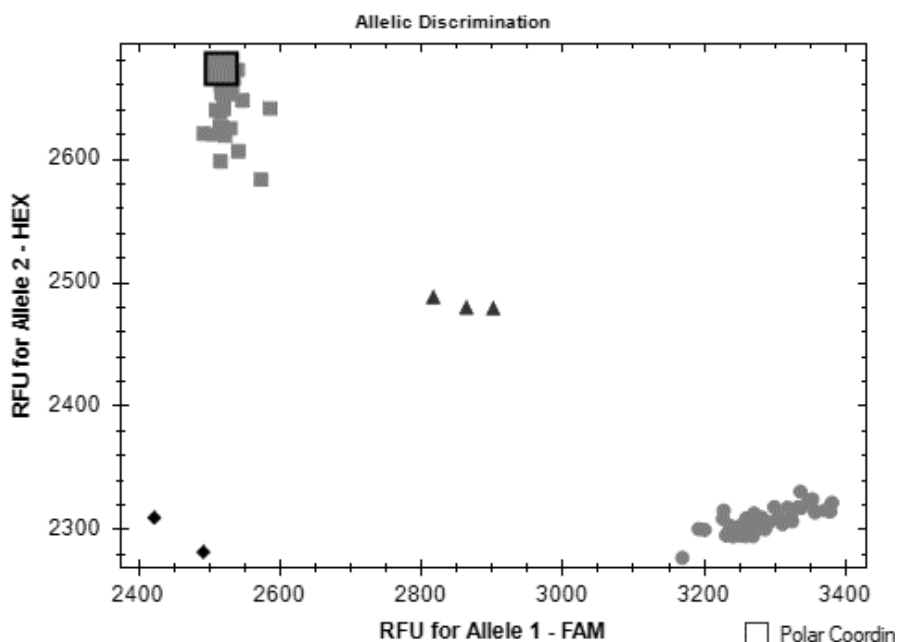


Рис 1. Діаграма генотипування рекомбінантно-інбредних ліній F₇ Лузанівка одеська / Одеська червоноколоса з використанням конкурентної алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції (KASP) з маркером KASP PPOD1. Вісь X – алель 1 (*Ppo-D1b*), що свідчить про флуоресценцію FAM-типу, вісь Y – алель 2 (*Ppo-D1a*), що свідчить про флуоресценцію HEX-типу. Помаранчеві точки – гомозиготні лінії з алелем 1 (високий рівень активності поліфенолоксидази); сині квадрати – гомозиготні лінії з алелем 2 (низький рівень активності поліфенолоксидази); зелені трикутники – гетерозиготні лінії, що містить обидва алелі; чорні квадрати – негативні контролю.

Дані, отримані при KASP-генотипуванні рекомбінантно-інбредних ліній F7 Лузанівка одеська / Одеська червоноколоса за геном *Ppo-D1* представлені на рисунку 1. З досліджених нами рекомбінантно-інбредних ліній 49 ліній характеризувались алелем *Ppo-D1a*, що відповідає низькому рівню активності поліфенолоксидази, 47 – алелем *Ppo-D1b* і 3 лінії були гетерозиготними, тобто мали в своєму складі два алелі зазначеного гену.

Таким чином виявлено поліморфізм за геном *Ppo-D1b* у сортів і ліній української селекції. Використання маркерів до генів *Ppo* у MAS-технологіях дозволить селекціонерам швидко і ефективно добирати матеріал з бажаною ознакою (низька активність ферменту поліфенолоксидази). Проте важливо оцінити, чи не впливатиме подібний добір на інші агрономічно важливі ознаки пшениці, такі як урожай зерна, три-

валість періоду до колосіння, висота рослин тощо. З цієї метою нами було проведено аналіз рекомбінантно-інбредних ліній за рядом господарсько цінних ознак і зіставлено отримані результати польових досліджень з даними KASP-аналізу ліній за геном *Ppo-D1*, за яким були виявлені відмінності між батьківськими сортами й ідентифіковані рекомбінантно-інбредні лінії F7 Лузанівка одеська / Одеська червоноколоса. Результати дослідження наведено у таблиці 2.

Погодні умови у роки досліджень досить сильно відрізнялися, що призводило до значних відмінностей середніх показників урожайності зерна і його складових у рекомбінантно-інбредних ліній. Найбільш сприятливим для вирощування пшениці був 2017 рік, найменш сприятливим – 2018, що відображалось більшою мірою на показниках урожаю зерна і висоті рослин.

Таблиця 2. Середні значення господарсько-цінних ознак груп рекомбінантно-інбредних ліній Лузанівка одеська / Одеська червоноколоса – носіїв різних алелів гену поліфенолоксидази *Ppo-D1*

Ознака	Рік	Алель <i>Ppo-D1b</i>	Алель <i>Ppo-D1a</i>	F _{розрах} ¹
ТПК, діб	2016	8,2	8,0	0,51
	2017	8,3	8,1	1,37
	2018	17,4	17,4	0,02
ВР, см	2016	96	107	3,60
	2017	98	105	2,63
	2018	58	63	2,06
ПК, шт.	2016	1,8	2,0	6,16*
	2017	1,6	1,6	0,04
	2018	1,0	1,0	0,13
КЗК, шт.	2016	33	35	0,86
	2017	43	45	1,10
	2018	25	26	0,05
МЗК, г	2016	1,015	1,100	5,3*
	2017	1,348	1,544	7,1*
	2018	0,842	0,877	0,39
МТЗ, г	2016	33,7	34,7	1,31
	2017	33	35	2,84
	2018	29,7	28,5	0,71
КПП, шт. / м ²	2016	443	421	2,53
	2017	446	457	0,60
	2018	443	444	0,001
УЗ, кг / м ²	2016	0,440	0,468	1,66
	2017	0,553	0,565	0,29
	2018	0,422	0,439	0,76

Примітки: ¹ F – критерій Фішера, * – F_{розрах} > F_{0,05}; ТПК – тривалість періоду до колосіння (відлік від дати 1 травня), ВР – висота рослини, ПК – продуктивне кущіння, КЗК – кількість зерна з колоса, МЗК – маса зерна колоса, МТЗ – маса 1000 зерен, КПП – кількість продуктивних пагонів, УЗ – урожайність.

Відмінності за алелями гену *Ppo-D1* не впливали на тривалість періоду до колосіння впродовж трьох років. Також не виявлено зв'язку відмінностей за геном *Ppo-D1* з такими складовими урожаю як кількість зерна з колоса, маса тисячі зерен і кількість продуктивних пагонів на одиницю площі. Лінії з алелем *Ppo-D1a* характеризувались істотно більшими показниками продуктивного кушіння, проте лише у 2016 році, у сприятливому 2017 і несприятливому 2018 подібна тенденція не спостерігалась.

Виявлено істотні відмінності за масою зерна з колоса в залежності від алельного стану гену *Ppo-D1*. У сприятливі для вирощування пшениці роки МЗК була істотно більшою у ліній з алелем *Ppo-D1a*, що пов'язаний зі зменшенням активності поліфенолоксидази, ніж у ліній з алелем *Ppo-D1b*. Подібна тенденція спостерігалась і у несприятливому 2018 році. Збільшення МЗК у ліній з алелем *Ppo-D1a* призводило і до певного збільшення урожайності у всі три роки досліджень, але відмінності не були достовірними. Отже, у процесі селекції з метою покращення якості зерна можна добирати генотипи з алелем *Ppo-D1a*, що відповідає низькій активності ферменту поліфенолоксидази. Подібний добір не має негативного впливу на агрономічно важливі ознаки і навіть може сприяти збільшенню МЗК і урожайності в певні роки.

Висновки

У результаті дослідження рекомбінантно-інбредних ліній Лузанівка одеська / Одеська

червоноколоса і їх батьківських форм виявлено поліморфізм за геном *Ppo-D1*. Сорт Лузанівка одеська і 49 ліній мали сприятливий алель *Ppo-D1a*, що відповідає низькій активності поліфенолоксидази, сорт Одеська червоноколоса і 47 ліній мали несприятливий алель *Ppo-D1b*, який пов'язаний з високою активністю ферменту.

Проведено зіставлення даних KASP-аналізу рекомбінантно-інбредних ліній за геном *Ppo-D1* із результатами оцінювання ліній протягом трьох років за восьми агрономічними ознаками пшениці: тривалість періоду до колосіння, висота рослини, продуктивне кушіння, кількість зерна з колоса, маса зерна колоса, маса 1000 зерен, кількість продуктивних пагонів і урожайність зерна. Відмінності за алелями гену *Ppo-D1* не впливали на такі ознаки як тривалість періоду до колосіння, висота рослин, кількість зерна з колоса, маса тисячі зерен і кількість продуктивних пагонів на одиницю площі.

Спостерігалось збільшення МЗК у ліній зі сприятливим алелем *Ppo-D1a*, що призводило і до певного збільшення урожайності у всі три роки досліджень. Отже, у процесі селекції з метою покращення якості зерна можна добирати генотипи з алелем *Ppo-D1a*, що відповідає низькій активності ферменту поліфенолоксидази. Подібний добір не має негативного впливу на агрономічно важливі ознаки пшениці і навіть може сприяти збільшенню МЗК і урожайності в певні роки.

References

1. Feillet P., Autran J.C., Icard-Vernière C. Pasta brownness: an assessment. *J Cereal Sci.* 2000. Vol. 32. P. 215–233. doi: 10.1006/jcrs.2000.0326.
2. He X. Y., He Z. H., Zhang L. P., Sun D. J., Morris C. F., Fuerst E. P., Xia X. C. Allelic variation of polyphenol oxidase (PPO) genes located on chromosome 2A and 2D and development of functional markers for the PPO genes in common wheat. *Theor Appl Genet.* 2007. Vol. 115. P. 47–58. doi: 10.1007/s00122-007-0539-8.
3. Simeone R., Pasqualone A., Clodoveo M. L., Blanco A. Genetic mapping of polyphenol oxidase in tetraploid wheat. 2002. *Cell Mol Biol Lett.* Vol. 7. P. 763–769.
4. Holderbaum D. F., Kon T., Kudo T., Guerra M. P. Enzymatic browning, polyphenol oxidase activity, and polyphenols in four apple cultivars: dynamics during fruit development. *HortScience.* 2010. Vol. 45 (8). P. 1150–1154. doi: 10.21273/HORTSCI.45.8.1150.
5. Hystad S. M., Martin J. M., Graybosch R. A., Giroux M. J. Genetic characterization and expression analysis of wheat (*Triticum aestivum*) line 07OR1074 exhibiting very low polyphenol oxidase (PPO) activity *Theor Appl Genet.* 2015. Vol. 128 (8). P. 1605–1615. doi: 10.1007/s00122-015-2535-8.
6. Beecher B. S., Carter A. H., See D. R. Genetic mapping of new seed-expressed polyphenol oxidase genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet.* 2012. Vol. 124 (8). P. 1463–1473. doi: 10.1007/s00122-012-1801-2.
7. Sun Y., He Z., Ma W., Xia X. Alternative splicing in the coding region of Ppo-A1 directly influences the polyphenol oxidase activity in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Funct Integr Genomics.* 2011. Vol 11 (1). P. 1–9. doi: 10.1007/s10142-010-0201-4.
8. Martin J. M., Berg J. E., Hofer P., Kephart K. D., Nash D., Bruckner P. L. Allelic variation of polyphenol oxidase genes impacts on Chinese raw noodle color. *J Cereal Sci.* 2011. Vol. 54. P. 387–394. doi: 10.1016/j.jcs.2011.08.003.

9. Nilthong S., Graybosch R. A., Baenziger P. S. Inheritance of grain polyphenol oxidase (PPO) activity in multiple wheat (*Triticum aestivum* L.) genetic backgrounds. *Theor Appl Genet.* 2012. Vol. 125. P. 1705–1715.

HALAIEVA M. V.¹, HALAIEV O. V.¹, POGREBNIUK O. O.¹, FAIT V. I.¹, RAHMATOV M.²

¹ *Plant Breeding and Genetic Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine,*

Ukraine, 65036, Odesa, Ovidiopolska Doroha, 3

² *Swedish University of Agricultural Sciences,*
Sweden, SE-23053, Alnarp

USE OF KASP TECHNOLOGIES FOR THE IDENTIFICATION OF ALLELES OF POLYPHENOLOXIDASE GENES OF COMMON WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

Aim. Characterization of recombinant inbred lines F₇ Luzanivka odeska/Odeska chervonokolosa by polyphenol oxidase (PPO) genes using KASP technologies and detection of the associations of allelic differences in *Ppo* genes with agronomically important traits of common wheat. **Methods.** Competitive allele-specific PCR (KASP). Phenological observations, elements of yield structure. **Results.** The polymorphism of the parental genotypes and the population of recombinant inbred lines for *Ppo-A1* and *Ppo-D1* genes was evaluated. A polymorphism between parental forms on the *Ppo-D1* gene was detected. A comparison of the data of KASP-analysis of lines with the results of evaluation of lines by eight agronomic traits of wheat was carried out. **Conclusions.** Differences in the alleles of the *Ppo-D1* gene did not affect the traits duration of a period prior to heading, plant height, productive tillering, grain number per spike, thousand-grain weight, productive tiller number per unit area and grain yield. An increase in the grain weight per spike was observed in lines with a favorable *Ppo-D1a* allele. The selection of genotypes with the *Ppo-D1a* allele, which corresponds to the low activity of the PPO enzyme, does not have a negative effect on the agronomically important characteristics of wheat.

Keywords: *Triticum aestivum* L., recombinant inbred lines, KASP markers, PPO.