



Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 633.111.1:575.2

© 2019

ВИКОРИСТАННЯ ІНДУКОВАНОГО МУТАГЕНЕЗУ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ЯРОЇ З КРОХМАЛЕМ ТИПУ ВАКСІ

С.Ю. Діденко¹, О.В. Голік², Л.І. Реліна³, Л.А. Вечерська⁴

¹кандидат сільськогосподарських наук

²доктор сільськогосподарських наук

³кандидат біологічних наук

Інститут рослинництва імені В.Я. Юр'єва НААН

просп. Московський, 142, м. Харків, 61060, Україна

e-mail: ¹sydidenko1976@gmail.com, ²golik.oleg.v.@gmail.com, ³lianaisaakovna@gmail.com,

⁴ludmila_vecherska@gmail.com

Надійшла 31.05.2019

Мета. Визначити ефективні дози γ -опромінення зерна пшениці для формування безамілозних її генотипів, створити на цій основі лінії для подальшої селекції сортів пшениці з крохмалем типу ваксі. **Методи.** Біофізичні, біохімічні, розрахунково-аналітичні, морфометричні. Як мутагенний чинник використано γ -опромінення ⁶⁰Co у різних дозах (100; 150 та 200 Гр (Грей)). Лінії пшениці опромінювали з метою поліпшення їх адаптаційного потенціалу до природних умов України. Добре адаптований до умов нашої країни сорт пшениці Харківська 30 опромінювали з метою індукції мутації ваху. **Результати.** Установлено ефективні дози γ -опромінення для створення безамілозних ліній пшениці м'якої ярої. Підібрано специфічні праймери до генів ваксі в усіх трьох геномах гексаплоїдної пшениці. Для кожної пари праймерів визначено оптимальну температуру ампліфікації. За допомогою молекулярних маркерів відібрано мутантні генотипи пшениці з безамілозним типом крохмалю. На основі мутантних генотипів і місцевих сортів створено та передано у лабораторію селекції пшениці ярої 2 лінії з крохмалем типу ваксі. **Висновки.** Проведені дослідження підтверджують ефективність використання індукованого мутагенезу для створення генотипів пшениці м'якої ярої з безамілозним типом крохмалю. На основі мутантних зразків із змінним фракційним складом крохмалю створено нові лінії пшениці м'якої ярої з комплексом цінних господарських ознак — Лютесценс 12/16 і Лютесценс 30/16. Перша лінія характеризується скоростиглістю, тривалість вегетаційного періоду — 90–93 доби, стійка до вилягання, її середня врожайність — 2,2–3 т/га, вміст білка — 13,1–14,2%, амілопектину в крохмалі — 99,8–99,9%. У другій лінії вегетаційний період — 89–91 доба, вона стійка до вилягання, висота рослин — 50–52 см,

середня врожайність — 2,3–3,1 т/га, вміст білка — 13,3–14,4%, амілопектину в крохмалі — 99,8–99,9%.

Ключові слова: опромінення, амілопектин, генотип, селекція, гени, праймери, температура ампліфікації.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201909-06>

Борошно пшениці з крохмалем типу ваксі (крохмаль, вміст амілози в якому не перевищує 1%) в усьому світі є предметом детального вивчення [1–4]. Завдяки унікальним властивостям цього борошна (підвищеної водопоглинальної здатності, дрібному розміру крохмальних гранул, який зумовлює високу засвоюваність у шлунково-кишковому тракті тварин і людини, та ін.) його можна використовувати у харчовій, фармацевтичній та багатьох інших галузях промисловості [5–7].

Незважаючи на зацікавленість у цій сировині з боку підприємців, в Україні існує лише один сорт такої пшениці — Софійка, селекції О.І. Рибалки (СГ—НЦНС) озимого типу розвитку [8]. Ярої пшениці ваксі в Україні досі не було створено.

Загальновідомо, що використання γ -променів дає змогу розширити генетичне різноманіття організмів та отримати генотипи рослин з якістю зерна (насамперед крохмалю), яка цікавить селекціонера і технолога.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Крохмаль є базовим (70%) компонентом ендосперму пшениці. Від його кількості та фракційного складу прямо залежать технологічні якості продуктів харчування. Також у світі існує величезний ринок крохмалю типу ваксі з різних рослинних джерел, який використовують як желеутворювальний агент, загусник, стабілізатор та ін. [9]. Фізичні та хімічні аспекти синтезу крохмалю та його сополімерів — амілози та амілопектину детально описано у багатьох оглядових роботах [10–12].

Під терміном «мутагенез» у селекції рослин розуміють процес індукції мутацій у геномі. Завдяки використанню мутагенезу було поліпшено або створено близько 3000 сортів різних культур. В останнє століття мутаційну селекцію та її методи вважають потужним інструментом для досягнення багатьох цілей, серед яких розширення генетичного різноманіття за багатьма параметрами (якістю продукції, стійкістю до хвороб і шкідників, солестійкістю та ін.), отримання мутацій

дискретних генів, зокрема тих, що зумовлюють фракційний склад крохмалю без плейотропного впливу на весь генотип [13]. Проте в Україні цей напрям практично не досліджено, що й зумовило актуальність роботи.

Мета досліджень — визначити ефективні дози γ -опромінення зерна пшениці для формування безамілозних її генотипів, створити на цій основі лінії для подальшої селекції сортів пшениці м'якої ярої з крохмалем типу ваксі.

Матеріали та методи досліджень. Для отримання мутантних генотипів пшениці м'якої ярої зі зміненим співвідношенням амілоза — амілопектин у крохмалі вихідним матеріалом був сорт пшениці м'якої ярої Харківська 30 і стандартний сорт Харківська 18 селекції Інституту рослинництва імені В.Я. Юр'єва НААН, який характеризується високим потенціалом урожайності, стійкістю проти хвороб і шкідників, пластичністю. Донорами генів ваксі були лінії пшениці, надані Університетом штату Небраска (США) і включені до Національного банку генетичних ресурсів рослин України: 99ID529 var. *erythrosperrum* (UA0106163); 99ID536, var. *lutescens* (UA0106479); 99ID546 var. *lutescens* (UA0106480) та 98–134 var. *lutescens* з колекції лабораторії селекції пшениці ярої.

Як мутагенний чинник використано γ -опромінення ^{60}Co у різних дозах (100; 150 та 200 Гр (Грей)). Лінії пшениці опромінювали з метою поліпшення їх адаптаційного потенціалу до природних умов України. Добре адаптований до умов нашої країни сорт пшениці Харківська 30 опромінювали з метою індукції мутації *waxy*. Контроль — повітряносухе насіння сорту Харківська 30. Виділення ДНК з 3-денних проростків проводили за допомогою BioSprint workstation for purification of total DNA from plant tissue, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) зі спеціально обраними праймерами — за загальноприйнятою методикою [14].

Фракційний склад крохмалю індивідуальних зернівок оцінювали за модифікованою

методикою з використанням 1N розчину натрію гідроксиду, 1N розчину оцтової кислоти та 0,2%-го розчину J₂ у КJ. Для аналізу використовували по 2 подрібнені зернівки з кожного індивідуального колоса.

Зернівки контрольних (неопромінених) рослин забарвлювались у цій системі у блакитно-фіолетовий колір, що підтверджує звичайне для пшениці співвідношення між амілозою та амілопектином (приблизно 30:70 відповідно).

Результати досліджень. За допомогою цього методу в потомстві опромінених рослин 3-го покоління виявлено окремі унікальні рослини, колір зерна яких відрізнявся від стандартного, а саме, був буро-червоним, притаманним крохмалю типу ваксі. Відомо, що J₂ у КJ адсорбується на молекулах амілопектину, надаючи їм характерного буро-коричневого забарвлення.

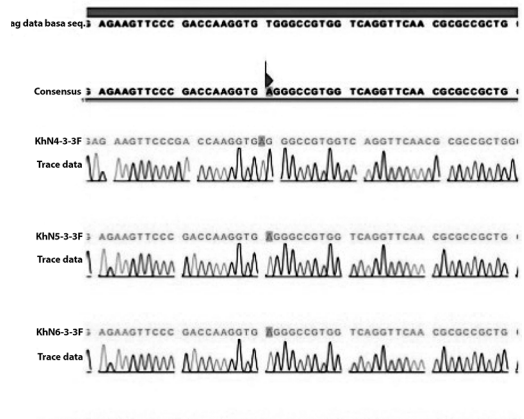
Ці унікальні рослини використано для подальших досліджень. Після виділення ДНК із 3-денних проростків за допомогою BioSprint workstation for purification of total DNA from plant tissue проведено серію ПЛР зі спеціально обраними праймерами [14]. Для кожного з них було визначено оптимальну температуру для специфічної ампліфікації (табл. 1).

Продукти ампліфікації використано для подальшого секвенування та розшифровки результатів за допомогою програми CLC Main Workbench.

Результати секвенування та подальшої обробки цих результатів дали змогу виявити кілька замін послідовності нуклеотидів у мутантних рослин порівняно з контрольними рослинами та базою даних. Ці заміни

1. Праймери до генів wx та оптимальні температури для специфічної ампліфікації (2012 р.)

Локус	Праймер	Оптимальна температура для специфічної ампліфікації, °C
WxA1	Wx7A2	76
	Wx7A3	80
	Wx7A4	76
WxD1	Wx7D2	80
	Wx7D3	76, 80
WxB1	Wx4A6	76
	Wx4A8	72, 76



Розшифровка нуклеотидної послідовності продуктів ПЛР ДНК мутантної рослини (F3, γ-опромінення в дозі 150 Гр) з праймером Wx7A4

нуклеотидів зумовлювали припинення синтезу амілози і, відповідно, надавали буро-червоного забарвлення гідролізату. Причиною появи таких замін стало γ-опромінення у дозі 150 Гр. Так, на рисунку показано одну з таких мутацій (заміну азотистої основи тимін на аденін), яка вплинула на зміну характеру синтезу сополімерів крохмалю.

Дібрані у такий спосіб мутантні рослини пшениці сорту Харківська 30 лінії 99ID546, 99ID529 та інші було включено у систему схрещувань. На основі доборів з цих гібридних комбінацій створено вихідний матеріал для селекції перших в Україні сортів пшениці м'якої ярої з безамілозним типом крохмалю. Визначено морфологічні параметри найперспективніших ліній, виділених в їхньому потомстві (табл. 2).

За результатами досліджень, лінії пшениці м'якої ярої, крохмаль яких майже не містить амілози, за ознакою «маса колоса» значно перевищують (на 0,4 г) лінії-носії рецесивних гомозигот ваксі, які були батьківськими компонентами у схрещуваннях. За ознакою «маса зерна з колоса» експериментальні лінії перевищують вихідні лінії на 0,2–0,4 г і наближаються до зареєстрованого сорту Харківська 30.

Морфологічні параметри цих ліній (висота рослини, довжина верхнього міжвузля, довжина колоса) мають проміжний рівень прояву між цими ознаками у ліній-носіїв

2. Морфологічні параметри гібридів пшениці м'якої ярої, які характеризуються крохмалем wx-типу (середнє за 2013–2016 рр.)

Сорт (лінія)	Висота рослини, см	Довжина, см		Маса, г	
		верхнього міжвузля	колоса	колоса	зерна з колоса
Харківська 30 мут./99ID536	60,1±2,3	9,4±0,27	8,4± 0,25	1,9±0,07	1,0±0,03
99ID546 мут./Харківська 18	54,3±2,4	8,6±0,34	7,5±0,33	1,9± 0,06	0,9±0,02
Харківська 30 мут./99ID546	75,1±3,4	8,9±0,42	9,9±0,39	1,9±0,07	1,0±0,04
99ID546×Харківська 30 мут.	49,7±2,3	7,8±0,36	8,6±0,35	1,7±0,08	0,9±0,03
99ID529 мут./98-134	49,7±2,3	7,8±0,36	8,6±0,35	1,9±0,08	0,9±0,03
99ID529	49,1±2,5	7,2±0,36	7,1±0,35	1,3±0,07	0,6±0,03
99ID546	74,4±3,3	7,9±0,41	8,8±0,40	1,5±0,07	0,8±0,05
Харківська 30 (норма)	81,3±4,0	13,5±0,59	11,5± 0,56	2,1±0,1	1,2±0,06

рецесивних гомозигот ваксі (99ID529, 99ID546) та сорту Харківська 30.

Водночас спостерігається менша різниця між морфологічними параметрами ліній, отриманих з восковидних гібридів, і сорту зі звичайним типом крохмалю, якщо материнським компонентом гібрида є сорт зі звичайним типом крохмалю. І навпаки, якщо материнський компонент гібрида — лінія-носії рецесивної гомозиготи ваксі, то його морфологічні параметри наближаються до характерних для ліній. Виявлено досить виражений реципрокний ефект, що дало змогу способом добору батьківських компонентів створити лінії, а надалі і сорти, які майже не поступаються зареєстрованим сортам пшениці м'якої ярої за урожайністю та основними морфологічними параметрами, та мають зерно з безамілозним типом крохмалю.

За результатами оцінки комплексу цінних господарських ознак зразків пшениці м'якої ярої, створених за допомогою індукованого мутагенезу, було виділено лінії, які під номерами Лютесценс 12/16 та Лютесценс 30/16 передано в лабораторію селекції пшениці ярої Інституту рослинництва імені В.Я. Юр'єва НААН для проходження конкурсного сортовипробування.

Лінія Лютесценс 12/16 (99ID546 мут./Харківська 18) характеризується скоростиглістю, тривалістю вегетаційного періоду — 90–93 доби, вегетаційний період сорту Харківська 18 — 100–105 дб. Стійка до вилягання, висота рослин — 54–58 см. Середня врожайність — 2,2–3 т/га. Урожайність сорту-стандарту Харківська 18 — 2,5–3,4 т/га. Уміст білка — 13,1–14,2%, амілопектину в крохмалі — 99,8–99,9%. Стійкість проти твердої сажки — 7 балів, бурої листової іржі — 6, борошнистої роси — 7, личинки пшеничної та гессенської мух — 5 балів.

Лінія Лютесценс 30/16 (99ID529 мут./98–134) порівняно з сортом-стандартом ще скоростигліша, тривалість вегетаційного періоду — 89–91 доба. В умовах зміни клімату у бік більш посушливого ознака скоростиглості стає актуальнішою в умовах східного лісостепу України. Стійка до вилягання, висота рослин — 50–52 см. Середня врожайність — 2,3–3,1 т/га. Уміст білка — 13,3–14,4%, амілопектину в крохмалі — 99,8–99,9%. За стійкістю проти основних хвороб і шкідників — на рівні сорту Харківська 18, твердої сажки — 7-ми балів, бурої листової іржі — 6-ти, борошнистої роси — 7-ми, личинки пшеничної та гессенської мух — 5-ти балів.

Висновки

Проведені дослідження підтверджують ефективність використання індукованого мутагенезу для створення генотипів пшениці м'якої ярої із безамілозним типом

крохмалю. На основі мутантних зразків зі зміненим фракційним складом крохмалю створено нові лінії пшениці м'якої ярої з комплексом цінних господарських

ознак — Лютесценс 12/16 і Лютесценс 30/16. Перша лінія характеризується скоростиглістю (тривалість вегетаційного періоду — 90–93 доби), стійкістю до вилягання, її середня врожайність — 2,2–3 т/га, вміст білка — 13,1–14,2%, амілопектину

в крохмалі — 99,8–99,9%. У другій лінії вегетаційний період — 89–91 доба, вона стійка до вилягання, висота рослин — 50–52 см, середня врожайність — 2,3–3,1 т/га, вміст білка — 13,3–14,4%, амілопектину в крохмалі — 99,8–99,9%.

Диденко С.Ю.¹, Голик О.В.², Релина Л.И.³, Вечерская Л.А.⁴

Институт растениеводства имени В.Я. Юрьева НААН, просп. Московский, 142, г. Харьков, 61060, Украина; e-mail: ¹sydidenko1976@gmail.com, ²golik.oleg.v.@gmail.com, ³lianaisaakovna@gmail.com, ⁴ludmila_vecherska@gmail.com

Использование индуцированного мутагенеза для создания пшеницы мягкой яровой с крахмалом типа вакси

Цель. Установить эффективные дозы γ -облучения зерна пшеницы для формирования безамилозных ее генотипов, создать на этой основе линии для дальнейшей селекции сортов пшеницы с крахмалом типа вакси. **Методы.** Биофизические, биохимические, вычислительно-аналитические, морфометрические. В качестве мутагенного фактора использовано γ -облучение ⁶⁰Со в различных дозах (100; 150 и 200 Гр (Грей)). Линии пшеницы облучали с целью улучшения их адаптационного потенциала к природным условиям Украины. Хорошо адаптированный сорт пшеницы Харьковська 30 облучали с целью индукции мутации *ваху*. **Результаты.** Установлены эффективные дозы γ -облучения для создания безамилозных линий пшеницы мягкой яровой. Подобраны специфичные праймеры к генам вакси во всех трех геномах гексаплоидной пшеницы. Для каждой пары праймеров определена оптимальная температура амплификации. С помощью молекулярных маркеров были отобраны мутантные генотипы пшеницы с безамилозным типом крахмала. На основе мутантных генотипов и местных сортов созданы и переданы в лабораторию селекции пшеницы яровой 2 линии с крахмалом типа вакси. **Выводы.** Проведенные исследования подтвердили эффективность использования индуцированного мутагенеза для создания генотипов пшеницы мягкой яровой с безамилозным типом крахмала. На основе мутантных образцов с измененным фракционным составом крахмала созданы новые линии пшеницы мягкой яровой с комплексом ценных хозяйственных признаков — Лютесценс 12/16 и Лютесценс 30/16. Первая линия характеризуется скороспелостью, длительностью вегетационного периода — 90–93 суток, стойкостью к полеганию, ее средняя урожайность — 2,2–3 т/га, содержание белка — 13,1–14,2%, амілопектина в крохмалі — 99,8–99,9%. У второй линии вегетационный период — 89–91 сутки, она

стойкая к полеганию, высота растений — 50–52 см, средняя урожайность — 2,3–3,1 т/га, содержание белка — 13,3–14,4%, амілопектина в крохмалі — 99,8–99,9%.

Ключевые слова: облучение, амілопектин, генотип, селекция, гены, праймеры, температура амплификации.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201909-06>

Didenko S.¹, Holik O.², Relina L.³, Vecherska L.⁴
¹⁻⁴Plant Production Institute n.a. V. Ya. Yuriev of NAAS, 142 Moskovskiy Ave. Kharkiv, Ukraine, 61060; e-mail: ¹sydidenko1976@gmail.com, ²golik.oleg.v.@gmail.com, ³lianaisaakovna@gmail.com, ⁴ludmila_vecherska@gmail.com

Use of induced mutagenesis for creation of soft spring wheat with starch of waxy type

The purpose. To establish efficient doses of γ -irradiation of grain of wheat for formation of its amylose-free genotypes, and to create on this basis a line for the further selection of grades of wheat with starch of waxy type. **Methods.** Biophysical, biochemical, computing-analytical, morphometric. As mutagen factor they used γ -irradiation of ⁶⁰Co in different doses (100; 150 and 200 Gr (Gray)). Lines of wheat irradiated with the purpose of improvement of their adaptive potential to natural settings of Ukraine. Well adapted grade of wheat Kharkivska 30 was irradiated with the purpose of induction of waxy mutation. **Results.** Effective doses of γ -irradiation for creation of amylose-free lines of soft spring wheat were established. They selected specific primers to waxy genes in all three genomes of hexaploid wheat. For each pair of primers the comfort temperature of amplification was specified. By means of molecular markers mutant genotypes of wheat with amylose-free type of starch were selected. On the basis of mutant genotypes and local grades they created and transmitted in laboratory of selection of spring wheat 2 lines with waxy starch. **Conclusions.** The carried out researches have confirmed efficiency of use of the induced mutagenesis for creation of genotypes of soft spring wheat with amylose-free type of starch. On the basis of mutant samples with the changed distillation characteristic of starch new lines of soft spring wheat with a complex of valuable economic attributes — Liutescens 12/16 and Liutescens 30/16 are created. The first line is characterized by early growth, duration of vegetative

period — 90–93 days, durability to lodging, average productivity — 2,2–3 t/hectare, protein content — 13,1–14,2%, amylopectin in starch — 99,8–99,9%. At the second line vegetative period — 89–91 days, resistant to lodging, height of plants — 50–52 cm, average productivity — 2,3–3,1 t/hectare, protein

content — 13,3–14,4%, amylopectin in starch — 99,8–99,9%.

Key words: irradiation, amylopectin, genotype, selection, genes, primer, temperature of amplification.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201909-06>

Бібліографія

1. Graybosh R.A. Waxy wheats: origin, properties and prospect. *Food science and technology*. 1998. V. 9. P. 135–142.
2. Abdel-Aal E.-S. M., Hucl P., Chibbar R.N. et al. Physicochemical and Structural Characteristics of Flours and Starches from Waxy and non-waxy Wheats. *Cereal Chemistry*. 2002. V. 79, № 3. P. 458–464. <https://doi.org/10.1094/cchem.2002.79.3.458>
3. Bhattacharya M., Erazo-Castrejon S., Doehlert D.C., McMullen M.S. Staling of Bread as Affected by Waxy Wheat Flour Blends. *Cereal Chemistry*. 2002. V. 79, № 2. P. 178–182. <https://doi.org/10.1094/cchem.2002.79.2.178>
4. Hayakawa K., Tanaka K., Nakamura T. et al. End Use of Waxy Wheat Flour in Various Grain-Based Foods. *Cereal Chemistry*. 2004. V. 81, № 5. P. 666–672. <https://doi.org/10.1094/cchem.2004.81.5.666>
5. Qin P., Ma C., Wu R. et al. Effect of waxy wheat flour blends on the quality of fresh and stale bread. *Agricultural Sciences in China*. 2009. V. 8, Is. 4. P. 401–409. [https://doi.org/10.1016/s1671-2927\(08\)60225-4](https://doi.org/10.1016/s1671-2927(08)60225-4)
6. Kowalski R.J., Siyuan Wang A.M., Joyner (Melito) H., Ganjyal G.M. Waxy wheat flour as a freeze-thaw stable ingredient through rheological studies. *Food and Bioprocess Technology*. 2017. V. 10, Is. 7. P. 1281–1296. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1899-y>
7. Bajaj R., Singh N., Kaur A. Effect of native and gelatinized starches from various sources on sponge cake making characteristics of wheat flour. *J. Food Sci Technol*. 2019. V. 56, № 2. P. 1046–1055. doi: 10.1007/s13197-019-03632-w
8. Рибалка О.І., Поліщук С.С., Морзун Б.В. Нові напрями в селекції зернових культур на якість зерна. *Вісник аграрної науки*. Спецвипуск. 2018. № 11. С. 120–133. doi: [org/10.31073/agrovisnyk201811-16](https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201811-16)
9. Alcazar-Alayi S.C., Almeida Meirelesi M.A. Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. *Food Science and Technology*. 2015. V. 35, № 2. P. 215–236. dx.doi.org/10.1590/1678-457X.6749
10. Smith A.M. The biosynthesis of starch granules. *Biomacromolecules*. 2001. V. 2, № 2. P. 335–341. dx.doi.org/10.1021/bm000133c.PMid:11749190
11. Tester R.F., Karkalas J., Qi X. Starch-Composition, fine structure and architecture. *J. of Cereal Science*. 2004. V. 39, № 2. P. 151–165. dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2003.12.001
12. Pérez S., Bertoft E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: a comprehensive review. *Starch/Staerke*, 2010. V. 62, № 8. P. 389–420. dx.doi.org/10.1002/star.201000013
13. Shu Q.Y., Forster B.P., Nakagawa H. Plant Mutation Breeding and Biotechnology. CABI: Oxfordshire, UK. 2012. 608 p.
14. Slade A.J., Fuerstenberg S.I., Loeffler D. et al. A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nature biotechnology*. 2005. V. 23. P. 75–81. <https://doi.org/10.1038/nbt1043>