

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

На правах рукопису

СТЕПАНЕНКО Антон Ігорович

УДК 601.4:577.21:633.111:633.16

**РОЗРОБКА СИСТЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ
МАРКЕРІВ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ ЯКІСНИХ ОЗНАК У ПШЕНИЦІ
ТА ЯЧМЕНЮ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2015

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України (м. Київ)

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

Дробик Надія Михайлівна

Тернопільський національний педагогічний
університет імені Володимира Гнатюка,
декан хіміко-біологічного факультету, завідувач
лабораторії екології та біотехнології

кандидат біологічних наук

Андрєєв Ігор Олегович

Інститут молекулярної біології і генетики НАН
України, старший науковий співробітник відділу
генетики клітинних популяцій

Захист відбудеться «4» червня 2015 року об ____ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 26.202.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: вул. Академіка Заболотного, 148, м. Київ, 03143, Україна.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: вул. Академіка Заболотного, 148, м. Київ, 03143.

Автореферат розіслано «__» _____ 2015 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук



К.В. Листван

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Пшениця (*Triticum aestivum* L.) та ячмінь (*Hordeum vulgare* L.) – одні із найважливіших продовольчих зернових культур, які займають перше і четверте місце у світі за посівними площами відповідно (FAOSTAT, 2014). Продукти переробки зерна пшениці та ячменю становлять основу харчового раціону населення багатьох країн, в тому числі, і України (Шелепов та ін., 2013).

Зерно та борошно пшениці використовують для виготовлення хліба різних сортів, круп, хлібобулочних та бісквітних виробів, різноманітної за рецептами та технологіями випічки залежно від національних особливостей різних народів та розмаїття смаків. Кожний продукт харчування з пшениці, щоб бути смачним, якісним, поживним повинен мати свої специфічні технологічні вимоги до властивостей зерна чи борошна, з яких він виготовлений. А ці властивості у свою чергу мають бути закладені селекціонерами у генотипах сортів пшениці та реалізовані в процесі вирощування культури. Науковці, спираючись на сучасні досягнення генетики, біотехнології, селекції, спроможні не лише поліпшувати існуючі показники якості зерна та борошна пшениці, а й цілеспрямовано додавати нові, раніше невідомі властивості (Моргун та ін., 2012; Рибалка та ін., 2012; Sharma et al., 2012; Sherman et al., 2014). Особливо актуальним є інтенсифікація та поліпшення селекційного процесу за рахунок впровадження у нього біотехнологічних та молекулярно-генетичних підходів, зокрема, використання молекулярних маркерів, на яких базується MAS (marker assisted selection) селекція (Heslot et al., 2012; Bernardo et al., 2013; Randhawa et al., 2013; Mir et al., 2014).

Однією із глобальних проблем сьогодення є питання поліпшення якості зерна пшениці. Особливо це актуально для України, яка заявляє про себе на світовому ринку постійно зростаючим об'ємом зерна, що експортується. На жаль, українська пшениця у загальній масі поступається за якістю зерна кращим світовим сортам та часто у повній мірі не задовольняє внутрішній ринок рівнем якості пшеничного борошна (Рибалка та ін., 2011; Рибалка та ін., 2012).

Широке використання у селекції м'якої озимої пшениці одноманітного генетичного матеріалу, крім прогресу у підвищенні продуктивності сортів, викликало звуження їх генетичної основи та збільшення спорідненості генофонду. Це призвело до того, що переважна більшість вітчизняних сортів має вузький технологічний напрямок використання (Рибалка та ін., 2012). Окрім того, створення нових сортів з унікальними властивостями значно обмежується відсутністю ефективного молекулярного супроводу селекції у більшості селекційних центрів України.

У свою чергу, створення сортів пивоварного ячменю є надзвичайно складним процесом, який, насамперед, потребує обов'язкового контролю цілої низки ознак, більшість з яких є критичними для якості готового продукту (Castro et al., 2013; Friedt et al., 2013; Verstegen et al., 2014; Sato et al., 2014). В

Україні широкого поширення набули пивоварні сорти ячменю зарубіжної селекції, які витісняють сорти української селекції. Вітчизняні сорти практично не представлені на ринку солоду. Причиною цього є недосконалість програм із створення пивоварних сортів, які складно отримати методами лише класичної селекції (Гораш та ін., 2008). В світі сформувався цілий розділ сучасної селекції ячменю, що базується на використанні молекулярних маркерів. Досліджуються конкретні молекулярні маркери, що причетні до генетичного контролю певних цінних ознак, які в деяких випадках можуть бути QTL (Xu et al., 2013). Впровадження подібних підходів в українській селекції є першочерговою задачею для створення сортів саме пивоварного напрямку.

Отже, розробка та впровадження біотехнологічних систем на основі ДНК-маркерів у вітчизняних селекційних центрах пшениці та ячменю дозволить інтенсифікувати і поліпшити процес створення нових сортів, що і обумовило актуальність досліджень за темою роботи.

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

Дисертаційну роботу виконано на базі відділу молекулярної генетики Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України у рамках державних бюджетних тем «Розробка систем молекулярних маркерів для відбору корисних ознак у зернових культур» (номер держреєстрації 0113U003101, 2013-2015 рр.) та «Дослідження функціонування та адаптації рослин в умовах біотичних та абіотичних стресів за допомогою молекулярних маркерів» (номер держреєстрації 0112U001735, 2012-2016 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи була розробка біотехнологічних систем на основі молекулярно-генетичних маркерів для детекції якісних ознак у пшениці та ячменю.

Для вирішення поставленої мети були сформульовані такі завдання:

1) провести підбір оптимальних біотехнологічних підходів для виявлення алельних варіантів генів *Glu-1*, які кодують високомолекулярні глютеніни (ВМГ) пшениці, житнього транслокативного матеріалу і генів, які детермінують поліфенолоксидазну активність пшеничного зерна, та трьох локусів, які визначають важливі пивоварні ознаки ячменю;

2) провести розробку мультиплексних полімеразних ланцюгових реакцій (ПЛР) за допомогою підібраних систем молекулярно-генетичних маркерів;

3) оцінити адекватність розроблених ПЛР для виявлення цінних алелів пшеничних генів з використанням білкового аналізу та біохімічних методів;

4) дослідити стан розповсюдження цінних алелів досліджуваних генів пшениці серед українського та зарубіжного сортового матеріалу даної культури;

5) виявити наявність алелів генів, які обумовлюють екстрасильні показники борошна в українських харчових продуктах;

6) дослідити рівень розповсюдження цінних алелів генів, які визначають пивоварні ознаки ячменю, серед українського та зарубіжного сортового матеріалу даної культури;

7) розробити методологію впровадження у селекційні програми біотехнологічних підходів, запропонованих у дисертаційній роботі.

Об'єкт дослідження – поліморфізм генів, які визначають якісні ознаки зерна пшениці та ячменю.

Предмет дослідження – системи молекулярних маркерів для виявлення цінних алелів генів, які детермінують якісні ознаки пшениці та ячменю.

Методи дослідження: виділення та очищення сумарної ДНК з рослинного матеріалу, спектрофотометричне вимірювання ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) з різними типами ДНК-маркерів, електрофорез ДНК та продуктів ампліфікації в агарозному гелі, електрофорез у поліакриламідному гелі фракцій гліадинів та глютенінів зерна пшениці, вимірювання поліфенолоксидазної активності пшеничного зерна, статистичні та біоінформатичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведена молекулярно-генетична оцінка у вітчизняних сортах розповсюдження алелів генів, які визначають поліфенолоксидазну активність зерна пшениці. Дана оцінка нових перспективних сортів озимої пшениці вітчизняної селекції за локусом *Glu-1* та наявністю пшенично-житніх транслокацій. Виявлено наявність нового алелю локусу *Glu-B1* у вітчизняного сорту пшениці Київська остиста. Вперше охарактеризовано поширені українські харчові продукти на основі борошна пшениці на наявність генів, які визначають високі технологічні показники. Вперше досліджено рівень активності поліфенолоксидазних ферментів зерна вітчизняних сортів та досліджено кореляцію рівня активності поліфенолоксидаз з генотипами сортів пшениці.

Вперше охарактеризовано вітчизняні сорти ячменю на наявність цінних алелів генів *Itr1* та *Lox-1*, які визначають стійкість пива до помутніння та активність ліпоксигенази. Вперше у сорту Jersey виявлено новий алель гена *Itr1*. Окреслено коло сортів-донорів, які містять бажані для пивоварних сортів алелі генів *bmy1*, *Itr1* та *Lox-1*.

Практичне значення одержаних результатів. Вперше впроваджено у прикладну селекцію в Україні маркерні системи на основі мультиплексних ПЛР для комплексної оцінки гібридів та сортів пшениці на наявність генів житніх транслокацій у пшениці, генів *Glu-1* та генів, які визначають активність поліфенолоксидазних ферментів зерна. Наведена у роботі характеристика сортів пшениці є корисною для відбору донорів цінних алелів генів, які детермінують якісні ознаки пшениці. Розроблені біотехнологічні системи можуть бути використані для планування генетико-селекційних схем схрещування та генотипування сортів. Це дозволяє інтенсифікувати створення нових елітних екстра-сильних та спеціалізованих за використанням сортів м'якої пшениці.

Характеристика сортів ячменю за генами, які детермінують три пивоварні ознаки, дозволить відібрати сорти-донори, що мають цінні генотипи. В подальшому їх залучення буде корисним у процесі створення вітчизняних

сортів пивоварного ячменю з контролем перенесення бажаних алелів генів, використовуючи розроблені біотехнологічні системи.

Отримані результати досліджень використовуються в курсі «Молекулярна біологія» та «Молекулярні основи клонування» для студентів факультету біотехнології і біотехніки НТУУ «КПІ», також можуть бути використані у лекційних курсах та лабораторно-практичних роботах з дисциплін «Молекулярна генетика», «Молекулярна біотехнологія» і «Основи селекції» для студентів біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням Степаненка Антона Ігоровича. Наведені в рукописі результати отримано здобувачем особисто або за безпосередньої участі при виконанні експериментів.

Концепцію роботи, план і методологію експериментальних досліджень, основні результати і висновки роботи сформульовані та обговорені дисертантом разом з науковим керівником, в.о. завідувача відділу молекулярної генетики, к.б.н. Моргуном Б.В., завідувачем відділу генетичних основ селекції СГІ-НЦСН д.б.н. Рибалкою О.І.

Автором особисто здійснено виділення рослинної ДНК; підібрано біотехнологічні підходи для виявлення поліморфізму цільових генів; розроблено і проведено уніплексні та мультиплексні ПЛР з різними праймерами; проведено екстрагування і розділення гліадинової та глютенінової фракції білків пшениці; здійснено визначення поліфенолоксидазної активності зерна пшениці; оформлено представлені у роботі результати; впроваджено методологічні аспекти використання розроблених біотехнологічних систем у селекційних закладах. Автором особисто відібрано і критично проаналізовано великий обсяг сучасної вітчизняної та зарубіжної літератури за темою проведеного наукового дослідження.

Аналіз результатів дослідження здійснено разом з науковий керівником к.б.н. Моргуном Б.В., д.б.н. Рибалкою О.І., с.н.с. відділу генетичного поліпшення рослин ІФРГ НАН України д.б.н. Чугунковою Т.В.

Апробація результатів дисертації. Результати роботи були представлені на семінарі відділу молекулярної генетики ІКБГІ НАН України, Міжнародній науковій конференції «Сучасні аспекти генетичної інженерії рослин» (Київ, 30 травня-1 червня 2011 року), II міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Фундаментальні і прикладні дослідження в біології» (Донецьк, 19-22 вересня 2011 року), XII Молодіжній науковій конференції «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 11 квітня 2012 року), VI Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія ХХІ століття» (Київ, 5 квітня 2012 року), VII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія ХХІ століття», присвяченій 115-й річниці заснування НТУУ «КПІ» (Київ, 24 квітня 2013 року), II конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, 24-25 грудня 2013 року), III Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, 15-16 травня

2014 року), VIII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття», присвяченій 200-й річниці з дня народження Тараса Шевченка (Київ, 25 квітня 2014 року), Міжнародній науково-практичній конференції молодих науковців «Проблеми та перспективи досліджень рослинного світу» (Ялта, 13-16 травня 2014 року), VI з'їзді ВТГіС і асоційованих генетичних симпозіумів (Ростов-на-Дону, 15-20 червня 2014 року), IX Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Умань, 22-26 вересня 2014 року), Всеукраїнській науковій конференції молодих вчених «Інновації в сучасній селекції та генетиці сільськогосподарських культур» (Одеса, 28-30 жовтня 2014 року), III Міжнародній науковій конференції «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні та генетичні аспекти» (Харків, 11-12 листопада 2014 року).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 19 друкованих праць, у тому числі 7 статей, 6 з них у фахових виданнях, перелік яких затверджений ДАК України, та 12 тез доповідей у збірниках матеріалів наукових конференцій.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація складається з переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, чотирьох експериментальних розділів, узагальнення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, додатків. Роботу викладено на 167 сторінках друкованого тексту, враховуючи 32 рисунка та 15 таблиць. Перелік цитованої літератури містить 247 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури розглянуто численні методи аналізу поліморфізму ДНК, які базуються на різноманітні ДНК-маркерів. Наведено сучасні тенденції впровадження біотехнологічних та молекулярно-генетичних підходів на основі молекулярних маркерів у селекційний процес, зокрема, докладно розглянуто системи для виявлення поліморфізму генів, які кодують високомолекулярні глютеніни пшениці, гени, які детермінують поліфенолоксидазну активність зерна пшениці, а, також, підходи до виявлення пшенично-житніх транслокацій у пшениці. Окремо наведено дані про стан використання молекулярних маркерів для отримання сортів ячменю пивоварної якості. Наведено характеристики ячменю та пшениці як об'єктів дослідження, показано актуальність впровадження систем молекулярних маркерів у прикладну селекцію даних культур.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліджували 143 сорти пшениці та 99 сортів ячменю вітчизняної та зарубіжної селекції, які були надані в рамках договорів про співробітництво з ІФРГ НАН України (м. Київ), СГІ-НЦНС НААН України (м. Одеса) та

Інститутом рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України (м. Харків). Для впровадження та валідації систем молекулярних маркерів використовували вибірки селекційних ліній пшениці з ІФРГ НАН України та СГІ-НЦНС НААН України. Виявлення алелів генів поліфенолоксидазної активності проводили у 38 ліній білозерної озимої м'якої пшениці та 64 синтетичних (AABBDD типу) ліній пшениці, наданих СГІ-НЦНС НААН України. Вибірка харчових продуктів, що досліджувалися, включала в себе: 24 зразки пшеничного борошна вітчизняного та російського виробництва, 14 зразків вітчизняної та зарубіжної локшини, 7 продуктів із замороженого тіста.

Виділення сумарної рослинної ДНК здійснювали модифікованими ЦТАБ методами (Stewart et al., 1993; Somma, 2006). Після виділення проводили спектрофотометричне (на фотометрі BioPhotometer (Eppendorf) v. 1.35) та електрофоретичне дослідження загальної ДНК.

Для контролю якості виділеної ДНК пшениці в мультиплексних ПЛР використовували референтні гени *actin* (Genbank accession AB181991), *ga3pd* (Genbank accession FN429985) та *TaTM20* (Genbank accession DQ323065), які є генами домашнього господарства для даних культур (Kim et al., 2008; Himi et al., 2011).

Виявлення цільових генів та їх цінних алелів здійснювали шляхом уніплексних та мультиплексних ПЛР з використанням специфічних праймерів (Сиволап та ін., 2011; Rogowsky et al., 1992; Erkkila et al., 1998; Saal et al., 1999; Khlestkina et al., 2004; Butow et al., 2004; Hirota et al., 2005; Chai et al., 2006; He et al., 2007; Liu et al., 2008; Ye et al., 2011). Реакційні суміші включали: специфічні праймери, по 2 мкл буфера для ПЛР 10× DreamTaq™ Green Buffer (Thermo Scientific), по 0,2 мМ кожного дезоксирибонуклеотид-3-фосфата (Thermo Scientific), 0,5-0,75 одиниці полімерази DreamTaq™ DNA Polymerase (Thermo Scientific), 50-100 нг сумарної ДНК, деіонізовану воду Milli-Q до кінцевого об'єму 20 мкл. Підбір умови реакції та оптимальний склад реакційної суміші здійснювалося для кожної системи окремо. Реакції ампліфікації проводили у термоциклерах Arctic Thermal Cycler (Thermo Scientific) та Mastercycler gradient (Eppendorf). Гідроліз ампліконів гена *Lox1* ендонуклеазою RsaI (Thermo Scientific) та гена *Ppo-A1* ендонуклеазою BamHI (Thermo Scientific) здійснювали згідно інструкції виробника.

Отримані продукти ПЛР або гідролізу розділяли шляхом горизонтального електрофорезу в агарозному гелі в SB буфері при напрузі 3-7 В/см в залежності від розмірів очікуваних ампліконів. Для візуалізації використовували етидій бромід у концентрації 0,5 мкг/мл. Отримані результати документувалися під УФ-світлом фотоапаратом Canon EOS 600D із світлофільтром. Обробку електрофореграм здійснювали за допомогою графічного редактора GIMP.

Виділення та розділення глютенінової фракції білків зерна пшениці здійснювали згідно (Рибалка та ін., 2007), що передбачає екстрагування глютенінової фракції етанолом з наступним розділенням білкових субодиниць у ДСН ПААГ. Виділення та розділення гліадинової фракції білків зерна пшениці здійснювали згідно (Рибалка та ін., 2007), що передбачає екстрагування з

наступним розділенням білкових субодиниць у кислому ПААГ.

Для визначення активності поліфенолоксидазних ферментів зерна пшениці використовували в якості субстрату розчини фенолу (1 г/л) або 10 мМ L-DOPA. Забарвлений розчин вимірювали при довжина хвилі 405 або 490 нм відповідно. Статистичну обробку отриманих цифрових даних здійснювали стандартними методами (Чумак та ін., 2009), які включали розрахунок середнього значення, дисперсії S^2 і стандартного відхилення S , визначення грубих похибок з використанням $3S$ критерію, β -критерію та критерію Романівського з наступним розрахунком надійного інтервалу прямого вимірювання в програмному забезпеченні Microsoft Excel. Біоінформатичний аналіз послідовностей здійснювався за допомогою інструментів National Center for Biotechnology Information та у програмному забезпеченні CLC Main Workbench 7.6.1.

РОЗРОБКА МАРКЕРНИХ СИСТЕМ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АЛЕЛЬНОГО СТАНУ ГЕНІВ *GLU-1* ПШЕНИЦІ

Підбір маркерних систем та розробка мультиплексних ПЛР на їх основі для виявлення алелів генів *Glu-A1*, *Glu-B1* та *Glu-D1*. В результаті аналізу ДНК-маркерів для визначення цінних алелів генів *Glu-1* пшениці були обрані відповідні праймери (Butow et al., 2004; Liu et al., 2008). Перевагою обраних маркерів є їх кодомінантність, що дозволяє їх використання для аналізу гетерогенних ліній пшениці.

Для внутрішнього контролю реакції нами було запропоновано використання праймерів до референтних генів пшениці *TaTM20* та *actin*. Оптимізацію умов реакції проводили за допомогою градієнтної ПЛР. Було визначено оптимальні температури ренатурації праймерів та встановлено, що концентрації праймерів до референтних генів повинні бути різними: для гена *TaTM20* – 0,25 мкМ, а для гена *actin* – 0,15 мкМ.

Дуплексною ПЛР на локус *Glu-A1* можна виявляти сорти з алелем *b* (амплікон 344 п.н.) (рис. 1, А). У сортів з алелем *a* або *c* виявляється амплікон 362 п.н. Амплікон розміром 547 п.н. вказує на адекватність перебігу реакції та про відсутність хибних результатів. Крім того, не дивлячись на незначну відмінність у розмірах ампліконів цільового гена (18 п.н.), є можливим ефективне розділення їх у 2 % агарозному гелі, що підвищує загальну ефективність та рентабельність системи, у порівнянні з використанням ПААГ.

У сортів з алелем *Glu-B1a1* (таких як Селянка, Зорепад, Гурт) спостерігали наявність амплікону 563 п.н., для сортів, які несуть інші алелі локусу – амплікон 520 п.н (рис. 1, Б). Референтний амплікон розміром 934 п.н. вказує на адекватність перебігу реакції.

Виявлення алелів локусу *Glu-D1* базується на дуплексній (одночасне виявлення алелів генів, які кодують субодиниці 5 і 2, та 10 і 12 у сортах і селекційних гібридах м'якої пшениці) (рис. 1, В) та триплексній (розроблена додатково для аналізу ліній тетраплоїдної пшениці та харчових продуктів із

залученням гена *actin* в якості референтного) ПЛР. Для сортів із субодинацями 5+10 спостерігали наявність ампліконів 397 та 281 п.н., із 2+12 – 415 та 299 п.н. Для гетерогенних сортів спостерігали наявність ампліконів усіх типів.

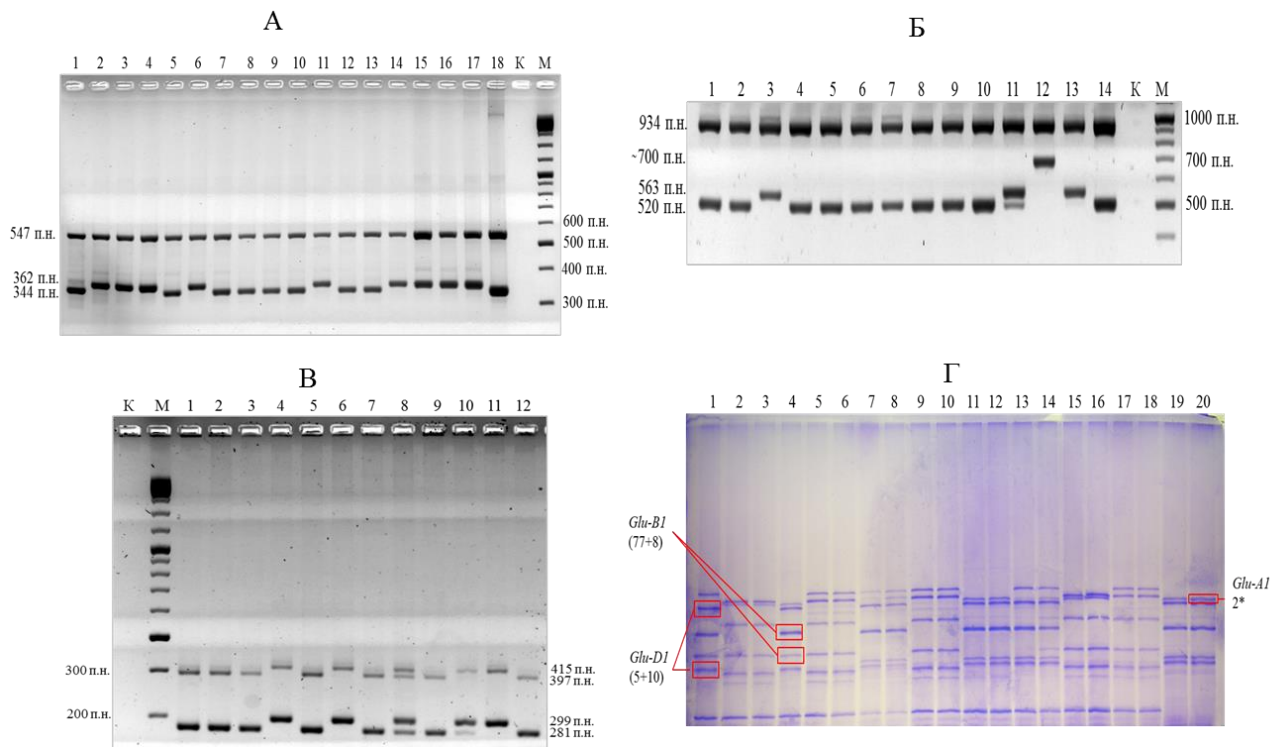


Рис. 1. Типові електрофореграми продуктів ампліфікації ділянок генів *Glu-A1* (А), *Glu-B1* (Б), *Glu-D1* (В) та результати валідації розроблених дуплексних реакцій аналізом фракції глютенінів пшениці (Г)

Виявлення алелів локусу *Glu-D1* базується на дуплексній (одночасне виявлення алелів генів, які кодують субодинаці 5 і 2, та 10 і 12 у сортах і селекційних гібридах м'якої пшениці) (рис. 1, В) та триплексній (розроблена додатково для аналізу ліній тетраплоїдної пшениці та харчових продуктів із залученням гена *actin* в якості референтного) ПЛР. Для сортів із субодинацями 5+10 спостерігали наявність ампліконів 397 та 281 п.н., із 2+12 – 415 та 299 п.н. Для гетерогенних сортів спостерігали наявність ампліконів усіх типів.

Таким чином, розроблені мультиплексні ПЛР дозволяють з високою надійністю диференціювати як сорти, так і гібриди, завдяки тому, що підхід базується на кодомінантній ідентифікації алелів.

Перевірка адекватності розроблених маркерних систем до генів *Glu-A1*, *Glu-B1* та *Glu-D1*. Необхідною умовою впровадження маркерної системи для аналізу сортів та гібридів є її перевірка як на матеріалі різного походження, так і за допомогою інших методів молекулярного та біохімічного аналізу. Зокрема, ми використали аналіз фракції ВМГ методом електрофорезу у ДСН ПААГ.

Визначення наявності білкових субодинаць високомолекулярних глютенінів здійснювалося за допомогою електрофорезу в ДСН ПААГ обраних контрастних сортів пшениці (рис. 1, Г). Додатково валідація систем ДНК

маркерів здійснювалася шляхом аналізу великих вибірок гібридів з різних селекційних центрів та кліматичних зон України. Отримані за використання ДНК-маркерів результати співпадали з результатами аналізу фракцій глютенінів. Таким чином, розроблена біотехнологічна система ДНК-маркерів є високоефективною і надійною, та її можна використовувати для аналізу селекційного матеріалу з метою виявлення цінних алелів локусу *Glu-1* пшениці.

Скринінг зібраної колекції ДНК пшениці за допомогою підібраних систем ДНК-маркерів. В аналізі колекції озимої та ярої м'якої пшениці на розповсюдження алелів локусу *Glu-A1*, було виявлено, що алель *b* міститься у 79 сортах (55,2 % вибірки). У інших сортів можна прогнозувати наявність або нуля алелю, або алелю *a* локусу *Glu-A1*. У сортів Лановий, Хист, Хуторянка, Селянка, Скарбниця, Дюк, Повага, Переяславка, Пивна і Гренні була визначена гетерогенність матеріалу за даним локусом.

За даними (Злацька, 2010) серед вітчизняних сортів було виявлено 6 (Вдала, Зміна, Куяльник, Панна, Селянка, Скарбниця), які несуть алель *Glu-B1a1*. За нашими даними сучасні сорти одеської селекції Доброчин, Жайвір, Запорука, Зиск, Зорепад, Ужинок також є носіями даного рідкісного алелю. Проте, для сортів Запорука, Селянка, Скарбниця, Ужинок спостерігалася гетерогенність досліджуваного матеріалу, тобто поряд з генотипами з *Glu-B1a1*, ідентифікували генотипи з іншими алелями. Також, *Glu-B1a1* був виявлений у екстрасильних канадських сортів Glenlea і Oslo. Усі виявлені вітчизняні сорти, які містять алель *Glu-B1a1* створені у СГІ-НЦНС НААН України (м. Одеса). Це можна пояснити походженням цих сортів від сорту Одеська червоноколоса, яка за даними (Злацька та ін., 2007) була носієм *Glu-B1a1*.

Для сорту Київська остиста не спостерігали наявності очікуваних ампліконів 563 та 520 п.н. Проте був ідентифікований амплікон розміром близько 700 п.н., що свідчить про генетичну зміну MAR ділянки промотору локусу *Glu-B1*, тобто, про новий алель даного локусу. Подальші дослідження функціонального впливу даного алелю на якість зерна сорту Київська остиста можуть стати початковим етапом для перенесення його у нові перспективні сорти.

В результаті аналізу вибірки сортів пшениці, цінний для хлібопекарської якості алель *Glu-D1d* був виявлений у 121 сорту, що складає 84,6 % вибірки. У 22 сортів (16,4 %) був ідентифікований алель *Glu-D1a*. У сортів Фаворитка та Norin 35 спостерігали наявність алелів обох типів, що свідчить про гетерогенність зернового матеріалу даних сортів. Необхідно відмітити, що алель *Glu-D1a* був характерний лише для сортів київської та миронівської селекції та для низки зарубіжних сортів. У сортах одеської селекції був ідентифікований виключно алель *Glu-D1d*, що підтверджує важливість напрямку створення сортів хлібопекарського спрямування в СГІ-НЦНС НААН України.

Враховуючи дані досліджень за локусом *Glu-1*, можна прогнозувати, що найкращими показниками хлібопекарської якості будуть володіти сорти Доброчин, Жайвір, Запорука, Зиск, Зміна, Зорепад, Куяльник, Панна, Селянка,

Скарбниця та Ужинок, які мають наступний алельний склад *Glu-A1b* (або *a*), *Glu-B1a1* та *Glu-D1d*. Крім того необхідно відмітити значне насичення сучасних сортів української селекції (зокрема, одеської) алелями локусу *Glu-1*, які відповідають за позитивний вплив на якість борошна.

Апробація маркерних систем для виявлення алелів локусу *Glu-1* у харчових продуктах, які містять пшеничний матеріал. Серед досліджуваного борошна пшениці та продуктів із замороженого тіста було виявлено гетерогенність усіх зразків за локусом *Glu-A1*. У локшині вітчизняних та російських торгівельних марок «КМФ», «Макфа», «Тая», «Хуторок» та «Чумак» наявні декілька алелів гена, проте у локшині марок «Букатіні» (ТЦ «Ашан»), ТМ «Циндао», «Pasta di Puglia», «Sedanini Rigati» та «Spaghetti» не було виявлено алелю *Glu-A1b*. Варто особливо відмітити, що для елітних італійських та вітчизняних локшин характерна гомогенність пшеничного матеріалу за локусом *Glu-A1*, окрім ТМ «Riscossa Pastificio».

Алель *Glu-B1a1* був ідентифікований у 11 зразках борошна переважно у вигляді домішок. Крім того алель *al* виявлено у 3 зразках локшини та в усіх продуктах із замороженого тіста. Наявність алелю *al* призводить до підвищення хлібопекарської якості борошна, а отже можна прогнозувати, що борошно з ним є більш цінним для випікання формового хліба.

Було виявлено 13 гомогенних зразків за локусом *Glu-D1* (алель *d*). Всі інші зразки, окрім локшини з твердих сортів, мали як алель *d*, так і алель *a*. Локшина Удон «JS» виявилася практично гомогенною за алелем *a*.

Дані по дослідженню алелів генів, які визначають якісні показники борошна пшениці у харчових продуктах свідчать про значну гетерогенність вихідного матеріалу, що використовується для виробництва локшини та продуктів із замороженого тіста. В борошні виявлено ряд алелів, які негативно впливають на хлібопекарські властивості, проте є бажаними для інших напрямів використання.

СИСТЕМИ ДНК-МАРКЕРІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПШЕНИЧНО-ЖИТНІХ ТРАНСЛОКАЦІЙ

Розробка мультиплексних ПЛР для визначення наявності та локалізації пшенично-житніх транслокацій 1AL.1RS, 1BL.1RS і модифікованої 1RSm.1BL. Для детектування пшенично-житніх транслокацій було підбрано чотири підходи (Rogowsky et al., 1992; Saal et al., 1999; Khlestkina et al., 2004; Chai et al., 2006), на основі яких були розроблено 4 дуплексні реакції з праймерами до цільових локусів та праймерами до референтних генів (рис. 2).

Для визначення звичайних та модифікованих транслокацій достатнім є використання двох дуплексних ПЛР до локусу *Xrems1303* та гена *TaTM20*, а також локусу *ω-secalin* та до гена *TaTM20*. Локус *Xrems1303* наявний у сортів (амплікон 290 п.н.), які несуть як звичайну пшенично-житню транслокацію, так і у генотипів з модифікованою пшенично-житньою конструкцією 1RSm.1BL. У

сортів, які не містять пшенично-житніх транслокацій, при ампліфікації фрагменти довжиною 290 п.н. не утворюються (рис. 2, А). Результати дуплексної ПЛР з праймерами до локусу *ω-secalin* свідчать про наявність цього локусу (амплікон 400 п.н.) лише у сортів, які містять звичайну пшенично-житню транслокацію (рис. 2, А). Розроблені реакції є ефективними для аналізу селекційних гібридів з модифікованою пшенично-житньою транслокацією.

Для визначення хромосомної локалізації плеча 1RS житньої хромосоми 1R було розроблено і оптимізовано дуплексну ПЛР на локус *SCM9*. Для даної системи очікували появу амплікону 226 п.н. у сортів носіїв 1AL.1RS, 206 п.н. – 1BL.1RS. Для сортів без транслокації спостерігали відсутність сигналу. В якості референтного використовували ген *TaTM20* (амплікон 934 п.н.) (рис. 2, В).

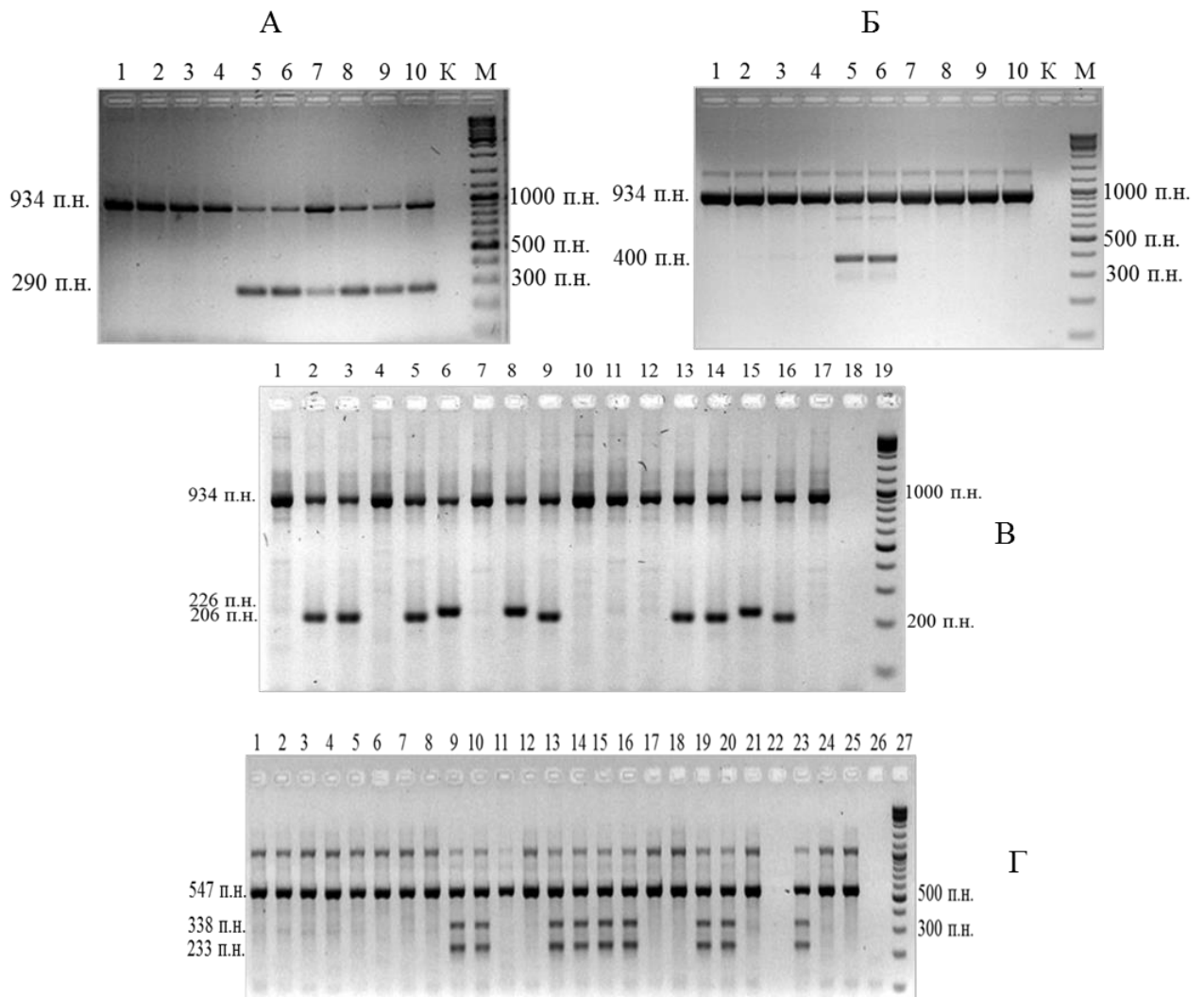


Рис. 2. Типові електрофореграми продуктів дуплексних ПЛР для виявлення пшенично-житніх транслокацій

З літературних джерел (Yediay et al., 2010) відомо, що у випадку, коли донором транслокації виступав сорт Salmon, можна спостерігати у сортів з 1BL.1RS транслокацією амплікон довжиною 226 п.н. Тому, для підтвердження достовірності першої реакції використовували додаткову пару праймерів PAWS5 та PAWS6 (Rogowsky et al., 1992). Кінцева концентрація усіх праймерів

у реакції була однакова. Для сортів-носіїв 1AL.1RS очікували появу ампліконів 338 та 233 п.н., для 1BL.1RS – відсутність ампліконів. В даному випадку в якості референтного доцільно використовувати ген *actin* з очікуваним ампліконом розміром 547 п.н.

Валідація розроблених мультиплексних підходів аналізом фракції гліадинів. Нами з метою валідування систем ДНК маркерів для виявлення пшенично-житніх транслокацій був застосований аналіз запасних білків зернівки гліадинів. Спочатку, використовуючи розроблені дуплексні полімеразні ланцюгові реакції, були відібрані зразки сортів-носіїв плеча 1RS жита (сорт Колумбія, Чорнява, Фаворитка, Спасівка, Гілея, Золотоколосо, Смуглянка та Новокиївська), сорт-дворучка Хуторянка (містить у своєму складі генотипи як з транслокацією, так і без), сорти Ятрань 60 та Куяльник, які не мають транслокацій. Типова електрофореграма розділення фракції гліадинів зернівки наведена на рис. 3.

Специфічним маркером для локусу *Gli-A1* (плече 1AS), який альтернативно заміщується транслокацією плеча 1RS житньої хромосоми 1R, є гліадиновий компонент, позначений на рис. 3 стрілкою зліва. У генотипів з транслокацією 1AL.1RS цей компонент відсутній. Специфічним маркером для локусу *Gli-B1* є гліадиновий компонент, позначений на рис. 3 стрілкою праворуч. У генотипів з транслокацією 1BL.1RS цей компонент відсутній.

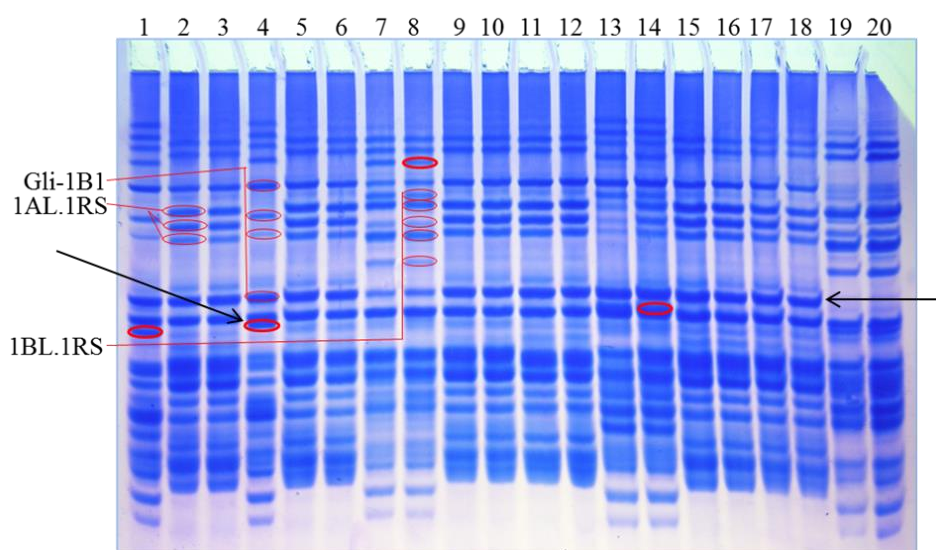


Рис. 3. Аналіз фракції гліадинів контрастних сортів пшениці

Результати отримані за допомогою ДНК маркерів були підтверджені аналізом фракції запасних білків. Наявність кількох незалежних підходів на основі специфічних праймерів, чіткість результатів та простота аналізу ДНК виділеної з будь-якої частини рослини відкриває нові конкурентно спроможні привабливі перспективи застосування ДНК-маркерів для виявлення й ідентифікації пшенично-житніх транслокацій у сортах і великих вибірках гібридів пшениці.

Скринінг зібраної колекції ДНК пшениці на наявність житнього інтрогресивного матеріалу за допомогою підібраних маркерних систем. 143-и сорти було досліджено на наявність локусу *SCM9* жита. Для підтвердження достовірності отриманих результатів використовували пару праймерів PAWS5 та PAWS6.

Загалом, з 143 сортів у 31 сорту було виявлено різні типи пшенично-житніх транслокацій, що складає 21,7 % загальної вибірки сортів. З них у 21 сорті (14,7 %) була виявлена 1AL.1RS транслокація, а у 10 (7 %) – 1BL.1RS.

29 сортів з транслокаціям створені у київському та миронівському селекційних центрах, і лише сорт Княгиня Ольга – в одеському. Це може свідчити про можливу стійкість сортів з півночі України до несприятливих біотичних та абіотичних факторів навколишнього середовища.

Транслокації були виявлені як у сортах, які вже десятиріччя вирощуються на території України, так і серед нових зареєстрованих у 2014 році, що показує існуючі напрямки роботи із створення сортів з пшенично-житніми транслокаціями в селекційних центрах північної та центральної України. Проте, в нових сортах одеської селекції житнього транслокативного матеріалу не було виявлено. За даними автора (Рибалка, 2011) це пояснюється значним зниженням показників хлібопекарської якості у сортів з транслокаціями в умовах степового клімату в Україні.

У порівнянні з результатами (Власенко, 2008) виявили більшу кількість сортів з транслокацією 1AL.1RS, що можна пояснити незначним впливом даного типу транслокацій на хлібопекарські властивості зерна пшениці.

Ідентифікація житнього транслокаційного матеріалу у харчових продуктах та сировині пшеничного походження. Житній транслокативний матеріал був виявлений у 23 зразках борошна з 24-х. У 5 зразках (20,8 %) виявлено наявність суто 1AL.1RS транслокації, з них у 2-х зразках транслокація визначена в незначних кількостях. У 5 зразках (20,8 %) ідентифіковано 1BL.1RS транслокацію, у 4-х зразках – у вигляді домішок. В інших зразках (58,4 %) були ідентифіковані обидва типи транслокацій. Інтрогресивний матеріал також був визначений у 5 продуктах з 7-ми із замороженого тіста (71,4 %) та в 6 зразках з 14-ти локшини (42,9 %).

Отримані дані свідчать про дуже широке сучасне використання сортів з транслокаціями для отримання борошна та харчових продуктів з нього. Разом це вказує на гетерогенність вихідного зернового матеріалу, який використовується для отримання борошна. Враховуючи, що транслокації мають негативний вплив на якість борошна, можна прогнозувати знижені показники хлібопекарської якості окремих марок борошна при виробництві здоби.

ВИЯВЛЕННЯ АЛЕЛІВ ГЕНІВ *PPO*, ЯКІ ОБУМОВЛЮЮТЬ АКТИВНІСТЬ ПОЛІФЕНОЛОКСИДАЗНИХ ФЕРМЕНТІВ У ЗЕРНІ ПШЕНИЦІ

Розробка мультиплексних ПЛР для визначення алельного стану генів *Ppo-A1* та *Ppo-D1*. Для ефективної детекції усіх можливих відомих алелів генів були обрані маркери PPO33 (кодомінантний тип, ген *Ppo-A1*) та PPO29 (домінантний тип, ген *Ppo-D1*). Для розробки систем ДНК-маркерів, які будуть ефективними для впровадження у прикладну селекцію, було запропоновано ввести в реакцію праймери до референтного гена *TaTM20*. Оптимізація умов ПЛР здійснювалася шляхом градієнтної ПЛР, за результатами якої були встановлені оптимальні параметри процесу для маркеру PPO33. Для маркеру PPO29 було запропоновано використання техніки низхідної ПЛР.

Відповідно для маркеру PPO33 (He et al., 2007) очікували прояву ампліконів розміром 290 та 481 п.н. для алелів *Ppo-A1a* та *Ppo-A1b*. Однак, ми спостерігали амплікони 391 та 582 п.н., які відповідають послідовності гена *Ppo-A1* з Генетичного банку (National Center for Biotechnology Information). Для деяких сортів (зокрема Гілея, Гурт, Заграва) спостерігали наявність двох ампліконів, що може свідчити про гетерогенність матеріалу (рис. 4, А).

Для дослідження гетерогенних сортів був проведений гідроліз продуктів ампліфікації ендонуклеазою *VamHI*. За результатами реакції спостерігали розрізання ампліконів 391 та 582 п.н. на очікувані фрагменти. Це свідчить про відповідність отриманих ампліконів ділянкам гена *Ppo-A1*.

При використанні маркера PPO29 спостерігали очікуваний амплікон 490 п.н., який свідчить про наявність алелю *b* гена *Ppo-D1*. У всіх сортах виявляли амплікон розміром 934 п.н., який свідчить про достовірність реакції.

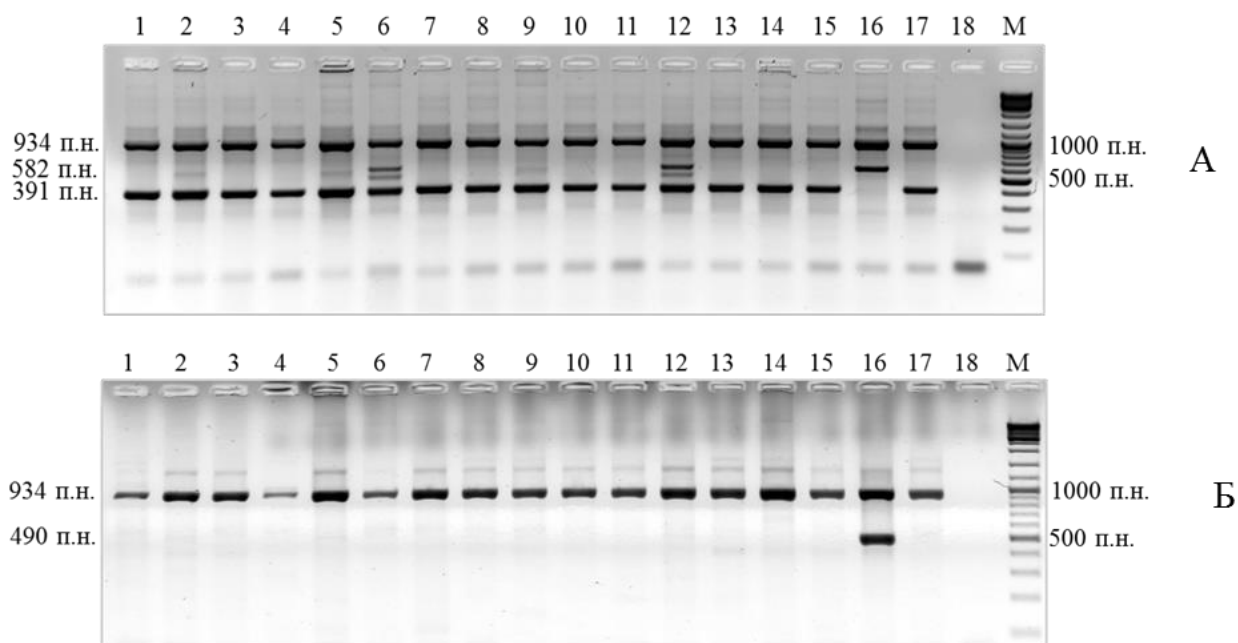


Рис. 4. Типові електрофореграми результатів ампліфікації ділянок генів *Ppo-A1* (А) та *Ppo-D1* (Б)

Отримані результати доводять ефективність маркерних систем та можливість впровадження їх у прикладну селекцію.

Алелі генів *Ppo-A1* та *Ppo-D1* у сортах, селекційних та синтетичних лініях пшениці. Скринінг вибірки сортів пшениці вітчизняної селекції здійснювали за допомогою розроблених мультиплексних ПЛР.

З літератури (He et al., 2007) відомо, що за низьку ПФО активність відповідають алелі *Ppo-A1b* та *Ppo-D1a*. В результаті дослідження вибірки 143 сортів було виявлено алель *Ppo-A1b* лише у сортах Єдність та Білява, що складає 2,4 % загальної вибірки. У 26 сортів (18,2 % разом) спостерігали гетерогенність матеріалу, тобто наявність одночасно обох алелів гена. Гетерогенність була виявлена як в українських сортах (Антонівка, Зимоярка, Миронівська 808, Панна, Фаворитка, Хуторянка та інші), так і в сортах зарубіжного походження (Аранка, Гренні, Трізо, Тюбальт, Chinese spring, Nirit, Norin 16, Norin 29), що свідчить про наявність алеля низькоактивної поліфенолоксидази у сортах з різних селекційних центрів. Окрім того, гетерогенність виявлена як в старовинних (напр. Миронівська 808), так і в сучасних сортах. В інших сортах наявний алель *Ppo-A1a*, який визначає високий рівень активності ПФО.

У 49 сортах вибірки (34,3 %) був визначений алель *Ppo-D1a*, який обумовлює низькоактивну ПФО, у решти – алель *Ppo-D1b*. У сорту Українська 246 спостерігали наявність алелів обох типів. Отримані дані, свідчать про більшу частоту розповсюдження алелю низької активності гена *Ppo-D1*, що можна пояснити ймовірним більш раннім потраплянням сорту-носію даного алелю в генетичний пул вітчизняного селекційного матеріалу.

Розроблені маркерні системи були апробовані на вибірці білозерних ліній та амфіплоїдів, для яких було встановлено рівень розповсюдження алелів генів *Ppo*.

Аналіз активності поліфенолоксидазних ферментів зерна пшениці. Для підтвердження результатів молекулярно-генетичних систем, за допомогою яких сорти пшениці були поділені на групи враховуючи алельний склад *PPO* генів, було проведено виявлення активності поліфенолоксидаз зерна контрастних сортів та білозерних ліній пшениці з використанням в якості субстрату фенолу та L-DOPA. Результати вимірювання активності поліфенолоксидаз наведені на рис. 5.

Отримані дані свідчать про кореляцію результатів обох аналізів для всіх сортів, окрім сорту Недра, для якого в реакції з фенолом спостерігали високу активність поліфенолоксидаз, а для L-DOPA – середню активність, що співвідноситься з гіпотезою (Naqvi et al., 2013) про можливу наявність декількох типів поліфенолоксидазних активностей у зерні пшениці.

Сорти та лінії з генотипом *Ppo-A1b*, *Ppo-D1a* показали достовірно низький рівень активності поліфенолоксидаз. Необхідно відмітити, що сорти Хуторянка, Гренні, Chinese spring (*Ppo-A1a/b*, *Ppo-D1a*) також виявили низький рівень активності, на відміну від сортів Аранка, Торчинська та Фаворитка (*Ppo-A1a/b*, *Ppo-D1b*), які виявили середню активність ферментів. Це показує, що

гетерогенність сортів за геном *Ppo-A1* веде до зниження активності поліфенолоксидазних ферментів, і підтверджує, що *Ppo-D1b* є алелем високоактивної поліфенолоксидази.

Сорти з генотипами *Ppo-A1a*, *Ppo-D1a* та *Ppo-A1a*, *Ppo-D1b* володіли достовірно високим рівнем активності поліфенолоксидазних ферментів (за виключення сорту Недра). Проте серед обох генотипів є сорти з практично однаковим рівнем активності (Куяльник, Подолянка та Смуглянка). Це однозначно свідчить про головну роль алелю *Ppo-A1a* у створенні високої активності поліфенолоксидазних ферментів зерна пшениці та допоміжну роль алелю *Ppo-D1a*. Алель *Ppo-D1a* має яскравий фенотиповий прояв лише при наявності алелів *Ppo-A1b* або при гетерогенності матеріалу.

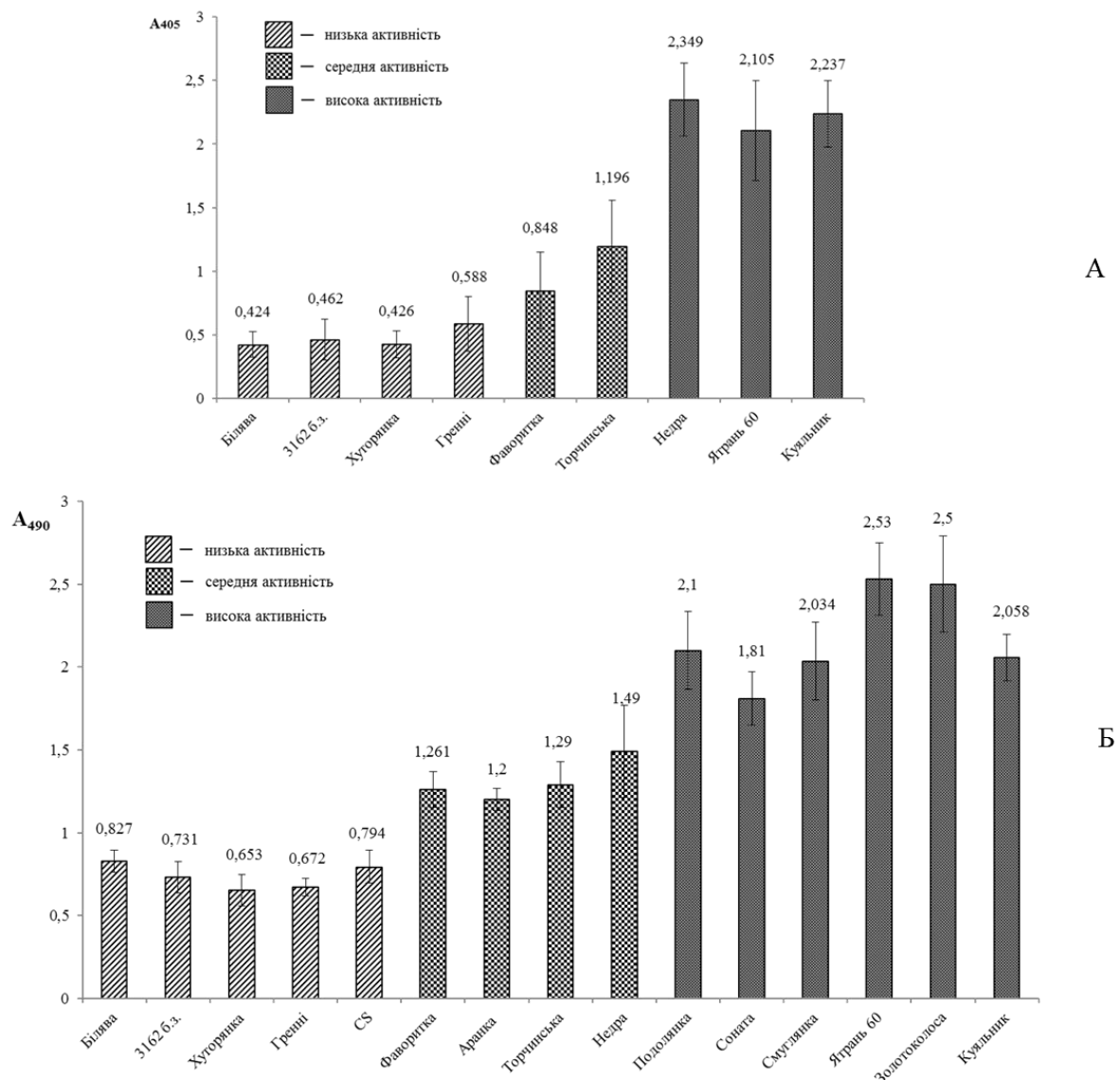


Рис. 5. Порівняння значень оптичної густини поглинання для сортів з різними генотипами за генами *PPO* (субстрат 1 % фенол – А; субстрат 10 мМ L-DOPA – Б)

Таким чином, біохімічне дослідження активності поліфенолоксидаз зерна

корелює з результатами, отриманими з використанням систем ДНК-маркерів, а отже робить ці підходи ефективними в оцінці сортів та селекційних гібридів.

Алелі генів високої та низької активності поліфенолоксидазних ферментів пшениці у харчових продуктах. Було виявлено, що 8,3 % зразків борошна, 21,4 % зразків локшини та 57,1 % продуктів із замороженого тіста є гетерогенними за геном *Pro-A1a*, тому, можна прогнозувати для них стійкість до потемніння і знебарвлення. Решта зразків несли алель високої активності *Pro-A1a*. Зразків, які несуть лише алель низької активності *Pro-A1b*, не було знайдено.

Окрім того, всі досліджувані зразки харчових продуктів (окрім локшини з твердих сортів пшениці, для яких не очікували появи позитивного сигналу) є носіями алелю *Pro-D1b*, який обумовлює високу активність поліфенолоксидаз зерна пшениці. Ці дані свідчать про високу активність ПФО у харчових продуктах, а, отже, про їх потенційну здатність до потемніння.

ДОСЛІДЖЕННЯ МАРКЕРНИХ СИСТЕМ ДО ГЕНІВ, ЯКІ ВИЗНАЧАЮТЬ ПИВОВАРНУ ЯКІСТЬ ЯЧМЕНЮ

Розробка мультиплексних ПЛР для виявлення гаплотипів *SE+ve* та *SE-ve* ячменю. Для виявлення алелів *SE+ve* та *SE-ve* гена *Itr1*, були розроблені дві дуплексні ПЛР з двома наборами специфічних праймерів (Ye et al., 2011) із залученням в якості референтного гена *ga3pd*. Наявність амплікону розміром 455 п.н. спостерігали для сортів *SE+ve* з використанням першого набору праймерів, а для *SE-ve* – з використанням другого набору (рис. 6, А).

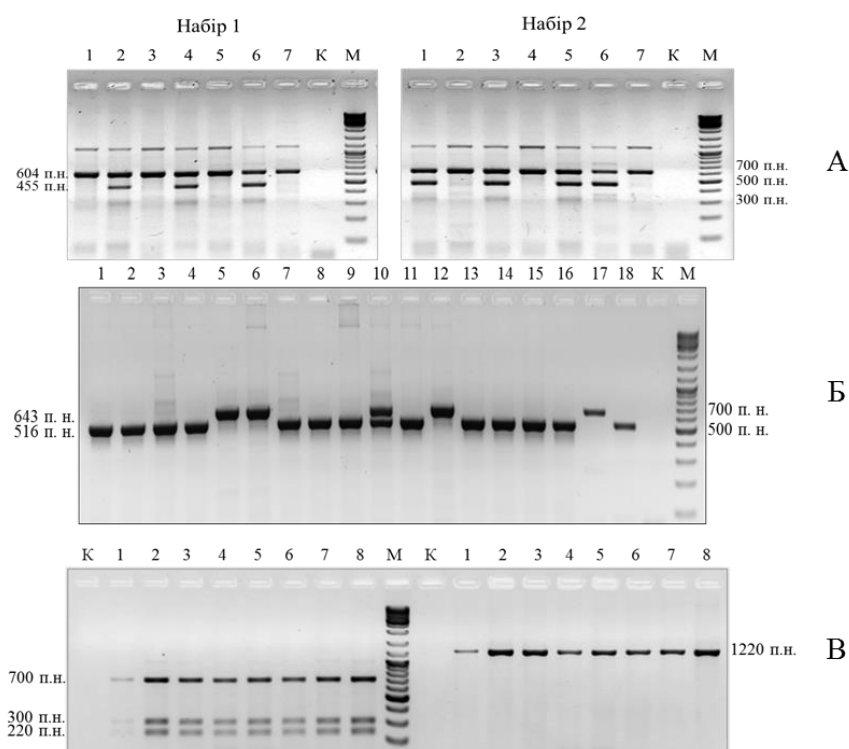


Рис. 6. Типові електрофореграми результатів ПЛР для виявлення алелів генів *Itr1* (А), *bmy1* (Б) та *Lox-1* (В)

Скринінг колекції загальної ДНК ячменю за допомогою розроблених підходів на наявність алелів генів *Itr1*, *bmy1* та *Lox-1*. Серед 99 сортів ячменю алель *SE+ve* гена *Itr1* був ідентифікований у 73 зразках, з яких 65 сортів були гомогенними, а 8 – гетерогенними. Алель *SE-ve* було знайдено у 25 сортах. Зразки ячменю з алелем *SE+ve* непридатні для солодування і пивоваріння, оскільки містять СМє протеїн, який погіршує якість пива при його зберіганні. Серед українських сортів було ідентифіковано 12 носіїв алелю *SE-ve* (18,5 % вибірки вітчизняних сортів), серед зарубіжних – 13 (39,4 % вибірки зарубіжних сортів).

Для сорту Jersey не було виявлено типових ампліконів ні для першого набору праймерів, ані для другого, хоча виявлявся типовий амплікон референтного гена, що виключає хибний результат. Це свідчить про поліморфність гена *Itr1* у даного сорту та наявність альтернативного алелю гена. Враховуючи те, що сорт Jersey відноситься до пивоварних, новий алель гена може бути цінним для селекції вітчизняних пивоварних сортів, хоча і потребує подальшого вивчення.

Отримані результати в порівнянні з даними Державного реєстру сортів рослин придатних для поширення в Україні у 2014 році та характеристиками виробників виявили, що 6 сортів, зазначені як фуражні, та 19 сортів, зазначені як пивоварні, несуть алель *SE-ve*. Разом з тим, 42 сорти, якість яких визначається як пивоварна є носіями алелю *SE+ve*. Таке широке розповсюдження несприятливого для пивоварних сортів алелю можна пояснити можливістю запобігання утворення або видалення осаду з готового пива з використанням хімічних та фізичних методів, які впливатимуть, однак, негативно на якість готового продукту.

За даними дослідів виявилось, що 62 сорти ячменю (62,6 % загальної кількості) мали алель *Bmy1.b*, 30 сортів (30,4 % колекції) містили алель *Bmy1.a*, а у 7-ми сортів (7 % загальної кількості представників колекції) було визначено гетерогенний стан гена *Bmy1*. Сортів ячменю з алелем *Bmy1.c* у колекції не знайдено.

Якщо враховувати розподіл сортів за територіальним фактором, то виявилось, що 36 вітчизняних (54,5 %) та 26 зарубіжних (78,8 %) сортів ячменю мають алель *Bmy1.b*. Це свідчить про значне поширення цінного для пивоваріння алелю *Bmy1.b* у сортах зарубіжної селекції ячменю. Подальший пошук перспективних для пивоваріння алелів гена *Bmy1* буде доцільно проводити з залученням мутантних ліній і диких типів ячменю, які б містили алель *Bmy1.c*.

Із 84 категоризованих за якістю сортів із досліджуваної колекції ячменю 22 сорти позиціонуються як фуражні та 64 – як пивоварні. Фуражні сорти розділяються на такі три групи: сорти з алелем *Bmy1.a* (8 сортів), сорти з алелем *Bmy1.b* (11 сортів) та сорти гетерогенні (3 сорти). З іншого боку, пивоварні сорти налічували 46 сортів з алелем *Bmy1.b* (74,2 %), 13 сортів за ПЛР-аналізом показали алель *Bmy1.a* (20,3 % сортів, відповідно), а 3 сорти мали обидва алелі (4,5 % категоризованих пивоварних сортів).

Аналіз колекції ячменю не виявив рецесивного алельного стану *LoxA*. Тому, всі досліджувані сорти будуть мати активну ліпоксигеназу-1, яка може негативно впливати на смакову якість пива.

Враховуючи алельні стани генів *Bmy1* та *Itr1* у сортів колекції ячменю та їх категорію якості (пивоварний/харчовий/фуражний) за Державним реєстром (сукупність біохімічного, морфо-анатомічного та фізіологічного аналізів), можна виділити ряд пивоварних сортів, які будуть корисними донорами у селекції пивоварного ячменю. Оптимальний сорт-донор має бути пивоварним за Державним реєстром та містити алелі *Bmy1.b* та *SE-ve*.

Отже, розроблена система оцінки пивоварних ознак з використанням ДНК-маркерів є перспективною для впровадження у сучасну українську селекцію ячменю пивоварної якості.

ВИСНОВКИ

Розроблено біотехнологічні системи для комплексної оцінки поліморфізму генів, які детермінують важливі ознаки у зернових культур. Системи спрямовані на виявлення алелів генів, які кодують високомолекулярні глютеніни пшениці, генів житнього транслокаційного матеріалу у геномі пшениці, генів, що визначають поліфенолоксидазну активність пшеничного зерна, і трьох генів, які відповідають за пивоварні ознаки ячменю.

1. Підібрано ефективні системи ДНК-маркерів для виявлення цільових генів та їх алелів, які прості у використанні та економічно рентабельні.

2. Для аналізу великих вибірок зразків оптимізовано експрес-метод виділення сумарної рослинної ДНК та вперше розроблено мультиплексні полімеразні ланцюгові реакції на цільові гени з використанням додаткових пар праймерів до референтних генів пшениці та ячменю (*actin*, *TaTM20*, *ga3pd*).

3. Доведено ідентичність результатів, отриманих за допомогою ДНК-маркерів і білкових маркерів, для генів *Glu-1* та житнього локусу *Sec-1*.

4. Виявлено новий алель локусу *Glu-B1* (700 п.н.) у сорту Київська остиста. Охарактеризовано сорти пшениці вітчизняної та зарубіжної селекції за наявністю пшенично-житніх транслокацій 1RS і алелів локусу *Glu-1* з позитивним впливом на хлібопекарську якість борошна.

5. Вперше охарактеризовано поліморфізм генів *PPO*, які детермінують активність поліфенолоксидазних ферментів зерна, у сортах пшениці вітчизняної селекції. Показано високий рівень гетерогенності сортів пшениці за геном *Pro-A1*.

6. Вперше за допомогою розроблених біотехнологічних систем показано значну гетерогенність пшеничної сировини, яка використовується для виготовлення українських харчових продуктів.

7. За допомогою систем ДНК-маркерів вперше досліджено поліморфізм генів *Itr1* та *Lox-1* у вітчизняних сортах ячменю та визначено основні донори цінних алелів. Для сорту Jersey показано наявність нового алелю гена *Itr1*. Використання ДНК-маркерів дозволило охарактеризувати оригінальні

пивоварні якості ячменю, які не завжди співпадають з даними Державного реєстру сортів рослин України.

8. Впроваджено методологічні аспекти використання розроблених біотехнологічних систем у програми вітчизняних селекціонерів ІФРГ НАН України та СГІ-НЦНС НААН України.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Рекомендовано використання розроблених біотехнологічних систем на наступних етапах селекції пшениці: відбір генотипів з алелями *Glu-A1b*, *Glu-B1a1*, *Glu-D1d* (специфічні дуплексні та триплексні ПЛР), виявлення ліній з транслокацією 1RS (реакція на локус *SCM9* з підтвердженням результатів, використовуючи праймери PAWS5 та PAWS6), ідентифікація модифікованої пшенично-житньої транслокації (ПЛР на локуси *Xrems1303* та *Sec-1*), прогнозування активності поліфенолоксидазних ферментів зерна пшениці (ПЛР на гени *Pro-A1* та *Pro-D1* з додатковим контролем активності ферментів використовуючи реактив L-DOPA).

2. Комплекс з трьох ПЛР для виявлення поліморфізму генів *Itr1*, *Lox-1* та *bmy1* рекомендовано для використання у селекції пивоварного ячменю.

3. Розроблену біотехнологічну систему ПЛР детекції рекомендовано використовувати у комплексі з методом швидкого виділення ДНК.

4. Умови проведення ПЛР та склад реакційних сумішей використовувати відповідно до тих, які запропоновано у дисертаційній роботі.

5. Розроблену біотехнологічну систему запропонувати для контролю якості пшеничного зерна, яке використовується для виробництва борошна.

6. Рекомендувати для використання сорти пшениці та ячменю з перспективними генотипами, визначеними в результаті дослідження, в якості донорів цінних ознак.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових виданнях

1. Скринінг сортів озимої м'якої пшениці на наявність пшенично-житньої транслокації за ДНК маркерами / **А.І. Степаненко**, Б.В. Моргун, Т.В. Чугункова, Н.І. Адаменко, Л.Г. Великожон // Вісн. Укр. Тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2012. – Т. 10, № 2. – С. 311-317. (Особистий внесок здобувача: розробка та оптимізація умов 2-х мультиплексних ПЛР для виявлення звичайного та модифікованого пшенично-житнього матеріалу, виділення загальної ДНК та ПЛР аналіз вибірки сортів і селекційних ліній, які є носіями транслокацій 1RS та 1RSm, написання частини статті).

2. Моргун Б.В. Молекулярно-генетический анализ сортообразцов озимой пшеницы, выращенных в различных экологических зонах Украины / Б.В. Моргун, **А.И. Степаненко**, Т.В. Чугункова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2013. – Т. 15, № 3 (5). – С. 1390-1393.

(Особистий внесок здобувача: розробка та оптимізація умов мультиплексної ПЛР для виявлення *Glu-B1a1*, виділення загальної ДНК та ПЛР аналіз вибірки сортів і селекційних ліній з різних кліматичних та екологічних зон України, написання тексту статті).

3. Молекулярна ідентифікація алеля *Glu-B1a1* у сортах і лініях пшениці / Б.В. Моргун, Т.В. Чугункова, О.І. Рибалка, В.М. Починок, О.І. Тарасюк, **А.І. Степаненко** // Физиология растений и генетика. – 2013. – Т. 45, № 4. – С. 290-295. (Особистий внесок здобувача: розробка та оптимізація умов мультиплексної ПЛР для виявлення *Glu-B1a1*, виділення загальної ДНК та ПЛР аналіз наданої вибірки селекційних ліній, робота над текстом статті).

4. Молекулярне визначення локалізації житніх транслокацій у сортах м'якої пшениці та їх цитологічна характеристика / Б.В. Моргун, **А.І. Степаненко**, О.В. Степаненко, Т.В. Чугункова, І.І. Лялько, Л.Г. Великожон // Физиология растений и генетика. – 2014. – Т. 46, № 4. – С. 319-324. (Особистий внесок здобувача: розробка та оптимізація умов мультиплексної ПЛР на мікросателітний локус *SCM9* для виявлення геномної локалізації пшенично-житніх транслокацій, проведення виділення загальної ДНК з вибірки сортів пшениці, ПЛР-аналіз вибірки сортів пшениці на наявність транслокацій *1AL.1RS* та *1BL.1RS*, написання частини статті).

5. Детекція пшенично-житніх транслокацій за допомогою ДНК-маркерів та електрофорезу білків / **А.І. Степаненко**, О.М. Благодарова, Б.В. Моргун, Т.В. Чугункова, О.І. Рибалка // Вісн. Укр. Тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2014. – Т. 12, № 1. – С. 78-83. (Особистий внесок здобувача: виділення загальної ДНК та білкової фракції гліадинів з 11 сортів пшениці, їх аналіз за трьома локусами за допомогою мультиплексних ПЛР, білковий аналіз фракції гліадинів на наявність транслокацій *1AL.1RS* та *1BL.1RS*, написання тексту статті).

6. Дослідження алельного поліморфізму генів *bmy1* та *loх-1* ячменю, пов'язаних з пивоварними характеристиками зерна/ А.А. Шаверський, **А.І. Степаненко**, Л.Г. Жолнер, С.С. Поліщук, Б.В. Моргун // Наукові вісті НТУУ КПІ. Хімічні і біологічні науки та технології. – 2014. – № 3. – С. 88-94. (Особистий внесок здобувача: виділення загальної ДНК з вибірки сортів ячменю, розробка ПЛР для виявлення алелів гену *bmy1* та *loх-1*, аналіз частини вибірки на наявність алелів генів *bmy1* та *loх-1*, написання частини статті).

7. Алельні варіанти генів поліфенолоксидази *PPO-A1* та *PPO-D1* у сортів озимої пшениці української селекції / **А.І. Степаненко**, Б.В. Моргун, А.В. Трояновська, О.І. Рибалка, Л.Г. Великожон // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. Т. 15: Присвячено 100-річчю від дня народження Нормана Ернеста Борлоуга / Редкол.: В.А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. – К.: Логос, 2014. – С. 238-242. (Особистий внесок здобувача: розробка та оптимізація умов мультиплексної ПЛР на гени *PPO-A1* та *PPO-D1*, виділення загальної ДНК з 82 сортів озимої та ярої пшениці, провів їх аналіз за досліджуваними генами, написання тексту статті).

Тези доповідей

1. Визначення алеля *Glu-B1a1* хлібопекарської якості пшениці методом полімеразної ланцюгової реакції / В.М. Починок, О.М. Радченко, **А.І. Степаненко**, Б.В. Моргун // Тези міжнародної наукової конференції «Современные аспекты генетической инженерии растений», (Київ, 30 травня –

1 червня 2011). – С. 51. *(Особистий внесок здобувача: дослідження проблематики виявлення алелю *al* локусу *Glu-B1* пшениці)*.

2. **Степаненко А.І.** Пошук молекулярних маркерів до генів *LCT1*, *TaTM20* та *Glu-B1a1* для селекції пшениці / **А.І. Степаненко**, Л.Г. Жолнер, Б.В. Моргун // Тези доповідей II міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии», (Донецьк, 19-22 вересня 2011). – С. 234. *(Особистий внесок здобувача: розробка і оптимізація умов ПЛР на гени *TaTM20* та *Glu-B1*, виділення загальної ДНК з 21 сорту озимої та ярої пшениці, проведення їх аналізу за досліджуваними генами, написання тексту тез)*.

3. **Степаненко А.І.** Порівняльна характеристика електрофорезних буферів TAE, TBE і SB для ідентифікації алеля *al* локусу *Glu-B1* пшениці / **А.І. Степаненко**, Б.В. Моргун, В.М. Починок // Тези доповідей VI Всеукраїнської науково-практичної конференції “Біотехнологія XXI століття” (Київ, 5 квітня 2012). – С. 114-115. *(Особистий внесок здобувача: дослідження методологічних аспектів виявлення *Glu-B1a1*, економічні розрахунки доцільності використання різних електрофорезних буферів, написання тексту тез)*.

4. **Степаненко А.И.** Скрининг селекционных образцов пшеницы на наличие аллеля *al* локуса *Glu-B1* / **А.И. Степаненко**, Б.В. Моргун, В.М. Починок // Сборник тезисов XII Молодёжной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 11 квітня 2012). – С. 64-65. *(Особистий внесок здобувача: виділення загальної ДНК з вибірки селекційних ліній, ПЛР на ген *Glu-B1* з метою виявлення алелю *al*, написання тексту тез)*.

5. Вплив алельного поліморфізму гену *Vmy1* ячменю на активність та термостабільність β -амілази / А.А. Шаверський, **А.І. Степаненко**, Л.Г. Жолнер, Б.В. Моргун // Тези доповідей VII Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття», присвяченої 115 річниці заснування НТУУ “КПІ”, (Київ, 24 квітня 2013). – С. 101-102. *(Особистий внесок здобувача: підбір підходів до виявлення алелів гену *Vmy1*, проведення відбору 109 зразків ячменю для аналізу)*.

6. **Степаненко А.І.** Визначення наявності пшенично-житніх транслокацій 1AL.1RS та 1BL.1RS методом мультиплексних ПЛР у сучасних сортах пшениці / **А.І. Степаненко**, О.В. Степаненко, Б.В. Моргун // Матеріали II конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, 24-25 грудня 2013). – С. 30. *(Особистий внесок здобувача: розробка та оптимізація умов мультиплексної ПЛР на мікросателітний локус *SCM9* для виявлення геномної локалізації пшенично-житніх транслокацій, виділення загальної ДНК зі 143 сортів пшениці, їх аналіз шляхом ПЛР на наявність транслокацій 1AL.1RS та 1BL.1RS, написання тексту тез)*.

7. Алелі низькоактивної поліфенолоксидази у сортах озимої пшениці / **А.І. Степаненко**, Б.В. Моргун, А.В. Трояновська, О.І. Рибалка, Л.Г. Великожон // III Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, 15-16 травня 2014). – С. 46-47. *(Особистий внесок здобувача: виділення загальної ДНК з 97 сортів озимої та ярої пшениці і вибірки амфідиплоїдів, проведення ПЛР для виявлення алелів генів *PPO-A1* та *PPO-D1*, написання тексту тез)*.

8. **Степаненко А.І.** Молекулярні маркери у селекції м'якої пшениці в Україні / **А.І. Степаненко**, Б.В. Моргун // Тези доповідей VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія ХХІ століття», присвяченій 200-й річниці з дня народження Т. Г. Шевченка, НТУУ «КПІ» (Київ, 25 квітня 2014). – С. 67-68. *(Особистий внесок здобувача: проведення узагальнення по розробленим біотехнологічним системам та їх практичному впровадженню у сучасний селекційний процес м'якої пшениці, написання тексту тез).*

9. Дослідження алельного поліморфізму гена *Vmy1* у вітчизняних та зарубіжних сортах ячменю / А.А. Шаверський, Л.Г. Жолнер, **А.І. Степаненко**, Б.В. Моргун // Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених «Проблемы и перспективы исследований растительного мира» (Ялта, 13-16 травня 2014). – С. 74. *(Особистий внесок здобувача: виділення загальної ДНК з 113 сортів ячменю, проведення аналізу вибірки на наявність алелів гену vmy1).*

10. Определение аллелей гена *Itr1*, отвечающий за помутнение пива, среди сортов ячменя, зарегистрированных в Украине / **А.И. Степаненко**, Б.В. Моргун, Е.В. Степаненко, С.С. Полищук, О.И. Рыбалка // Материалы VI съезда ВОГиС и ассоциированных генетических симпозиумов (Ростов-на-Дону, 15-20 июня 2014). – С. 155. *(Особистий внесок здобувача: виділення загальної ДНК з 113 сортів ячменю, проведення аналізу вибірки на наявність алелів гену Itr1).*

11. Виявлення цінних алелів генів якісних показників у харчових продуктах з використанням молекулярних маркерів / **А.І. Степаненко**, О.В. Степаненко, Б.В. Моргун, М.М. Скринник / Тези Всеукраїнської наукової конференції молодих вчених «Інновації в сучасній селекції та генетиці сільськогосподарських культур» (Одеса, 28-30 жовтня 2014). – С. 87-89. *(Особистий внесок здобувача: виділення загальної ДНК з вибірки харчових продуктів, аналіз вибірки на наявність алелів генів, які детермінують якісні ознаки, написання тексту тез).*

12. **Степаненко А.І.** Виявлення цінних алелів високомолекулярних глютенінів (ВМГ) пшениці з використанням молекулярних маркерів / **А.І. Степаненко**, Моргун Б.В., Похилько С.Ю. // Тези III Міжнародної наукової конференції «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні та генетичні аспекти», (Харків, 11-12 листопада 2014). – С. 60-61. *(Особистий внесок здобувача: виділення загальної ДНК з 143 сортів пшениці, аналіз вибірки на наявність алелів генів Glu-A1, Glu-B1 та Glu-D1 написання тексту тез).*

АНОТАЦІЯ

Степаненко А.І. Розробка систем молекулярно-генетичних маркерів для детекції якісних ознак у пшениці та ячменю. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, 2015.

Дисертаційну роботу присвячено розробці, валідації і впровадженню біотехнологічних систем молекулярних маркерів для характеристики сортів і гібридів пшениці та ячменю за генами, які детермінують якісні ознаки.

Проведено підбір оптимальних біотехнологічних підходів для виявлення алельних варіантів генів *Glu-1* пшениці, житнього транслокаційного матеріалу,

генів, які детермінують поліфенолоксидазну активність пшеничного зерна, та генів *Itr1*, *bmy1* та *Lox-1*, які визначають важливі пивоварні ознаки ячменю, на основі яких розроблено системи мультиплексних ПЛР з використанням референтних генів пшениці та ячменю.

Валідовано розроблені ПЛР для генів пшениці за допомогою електрофоретичного аналізу відповідних фракцій білків та реакції визначення активності поліфенолоксидазних ферментів зерна. Визначено рівень розповсюдження цінних алелів досліджуваних генів в сортах української і зарубіжної селекції та виявлено новий алель локусу *Glu-B1*. Встановлено значну гетерогенність вихідного пшеничного матеріалу, який використовується для виготовлення українських харчових продуктів.

Розроблено методологічні аспекти використання розроблених біотехнологічних підходів та впровадженню у селекційні програми вітчизняних селекціонерів.

Ключові слова: пшениця, ячмінь, ДНК-маркери, біотехнологічна оцінка якісних ознак, високомолекулярні глютеніни, пшенично-житні транслокації, поліфенолоксидазна активність, пивоварна якість.

АННОТАЦИЯ

Степаненко А.И. Разработка систем молекулярно-генетических маркеров для детекции качественных признаков у пшеницы и ячменя. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 2015.

Диссертационная работа посвящена разработке, валидации и внедрению биотехнологических систем молекулярных маркеров для характеристики сортов и гибридов пшеницы и ячменя по генам, которые определяют качественные признаки.

Проведен подбор оптимальных биотехнологических подходов для выявления аллельных вариантов генов *Glu-1* пшеницы, ржаного транслокативного материала, генов, которые определяют полифенолоксидазную активность пшеничного зерна, и трех локусов важных пивоваренных признаков ячменя, на основе которых разработаны системы мультиплексных ПЦР с использованием референтных генов пшеницы и ячменя.

Валидированы разработанные ПЦР генов пшеницы с помощью электрофоретического анализа соответствующих фракций белков и реакции определения активности полифенолоксидазных ферментов зерна. Определен уровень распространения ценных аллелей изучаемых генов в украинских и зарубежных сортах и показано наличие нового аллеля локуса *Glu-B1*. Выявлено значительную гетерогенность исходного пшеничного материала, который используется для изготовления украинских пищевых продуктов.

Разработаны методологические аспекты использования разработанных биотехнологических подходов для внедрения их в селекционные программы

отечественных селекционеров.

Ключевые слова: пшеница, ячмень, ДНК-маркеры, биотехнологическая оценка качественных признаков, высокомолекулярные глюteniны, пшенично-ржаные транслокации, полифенолоксидазная активность, пивоваренные свойства.

SUMMARY

Stepanenko A.I. Development of systems of molecular genetic markers for the detection of quality traits in wheat and barley. – Manuscript.

Thesis for obtaining the scientific degree of candidate of biological sciences by specialty 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2015.

The thesis is devoted to the development, validation and application of biotechnology molecular markers for characterization of genes responsible for qualitative traits in wheat or barley varieties and hybrids.

We picked up the optimal biotech approaches to identify allelic variants of high molecular weight glutenin (HMWG) genes of wheat, wheat-rye translocations and genes of polyphenol oxidase activities in wheat grains, and 3 important loci of barley brewing features. On the base of those we designed a number of multiplex polymerase chain reactions (PCR) using reference genes in wheat and barley and sometimes coupled with restriction analysis.

With the help of developed molecular markers systems we analyzed Ukrainian and foreign varieties originated from different breeding centers to identify the distribution of alleles of *Glu-1* locus which lead to high baking quality. It was found that allele *Glu-A1b* was present in 79 varieties (55.2%). The allele *Glu-B1a1* was determined in 12 varieties. For the variety Kyivska ostysta a new amplicon of 700 base pairs had been discovered. It indicated the change of genetic make-up of Matrix Attached Region inside the promoter of *Glu-B1* locus, and thus a new allele of this locus. The allele *Glu-D1d* valuable for baking quality was detected in 121 varieties, representing 84.6%. The allele *Glu-D1a* was identified in 22 varieties (16.4%). The *Glu-D1a* allele was expressed in varieties from Kyiv, Myronivka, and abroad. In contrast, the *Glu-D1d* allele was identified in varieties derived from SGI (Odesa) breeding center only.

Four duplex PCRs with specific primers were developed for the detection of wheat-rye translocations. The validation of DNA markers to identify wheat-rye translocations was carried out by analyzing the gliadin grain storage proteins and studying different samples of breeding hybrids. 31 varieties out of collected 143 varieties were found to have wheat-rye translocations of different types, representing 21.7% of the total. Of those, 21 (14.7%) was shown to possess the 1AL.1RS translocation while in 10 varieties (7%) the 1BL.1RS was present.

For efficient detection of all possible known alleles of genes that determine polyphenol oxidase activities of wheat the PPO33 marker (for gene *Ppo-A1*) and the PPO29 marker (for gene *Ppo-D1*) were selected. In the current study the *Ppo-A1b* allele was found in varieties Yednist and Bilyava only, representing just 2.4% of the

total. Heterogeneity of the material was observed in 26 samples (18.2%), i.e. the presence of both alleles of the gene simultaneously. The allele *Ppo-A1a* determining the polyphenol oxidase activity of wheat was detected in the other varieties. The *Ppo-D1a* allele was found in 49 varieties (34.3%), which led to low polyphenol oxidase activity in wheat grain, while the *Ppo-D1b* allele was typical for the other varieties. The white-grained lines and amphiploids were tested using the developed marker systems and the prevalence of alleles of the *Ppo* genes had been shown.

Both phenol as well as L-DOPA was used as substrate for measuring polyphenol oxidase activities in grain of contrasting varieties and white-grained wheat lines. It was showed that varieties and lines of genotype *Ppo-A1b*, *Ppo-D1a* had a quite low level of polyphenol oxidase activities. The varieties containing *Ppo-A1a/b*, *Ppo-D1a* alleles also showed low levels of activity, unlike the varieties with *Ppo-A1a/b*, *Ppo-D1b* alleles. These results stated the heterogenic varieties of *Ppo-A1* gene led to reduced activity of polyphenol oxidase enzymes while at the same time the functional allele *Ppo-D1b* determined the high polyphenol oxidase activity.

The wheat varieties with genotypes *Ppo-A1a*, *Ppo-D1a* and *Ppo-A1a*, *Ppo-D1b* had significantly higher levels of polyphenol oxidase enzymatic activity. However, in both genotypes there were varieties with almost the same level of activity. It showed essentially a major role of *Ppo-A1a* allele in creating high polyphenol oxidase activities in wheat and supportive role of *Ppo-D1a* allele, which clearly revealed its phenotypic effect only if *Ppo-A1b* allele or heterogeneity were present in the material.

Considerable heterogeneity was revealed in the source material of wheat, used for the manufacturing of Ukrainian food.

A number of DNA markers were selected to detect the alleles of *bmy1*, *Lox-1* and *Itr1* genes in barley varieties suitable for brewing. A comprehensive assessment of barley varieties in three important features: thermal β -amylase (gene *Bmy1*), the activity of lipoxygenase-1 (gene *Lox-1*) and accumulation of SE protein (gene *Itr1*), which causes clouding of beer during storage were carried out. By using the conventional and multiplex PCRs the screening of domestic and foreign barley varieties was conducted and the prevalence of allele of studied genes for beer brewing was determined. The system of DNA markers allowed us to identify the best varieties of barley for brewing. These varieties are expected to be involved in breeding schemes with Ukrainian local varieties. The proposed approach intensifies the process of creating new domestic crop varieties with desirable brewing characteristics.

The methodological aspects were developed for using biotechnological systems and implementation in breeding programs of Ukrainian breeders.

Key words: wheat, barley, DNA markers, biotech assessment of qualitative features, high molecular weight glutenins, wheat-rye translocations, polyphenol oxidase activities, brewing quality.