

УДК 633.11:577.114: 577.2.08:631.52

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОТИПОВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ ПО АЛЛЕЛЬНЫМ ВАРИАНТАМ WAXY-ГЕНОВ

<sup>1,2</sup>Абдулина И.Р., <sup>1,2</sup>Вафин Р.Р., <sup>1</sup>Ржанова И.В., <sup>1</sup>Гараева А.Л., <sup>2</sup>Асхадуллин Д.Ф.,  
<sup>2</sup>Асхадуллин Д.Ф., <sup>2</sup>Василова Н.З., <sup>1</sup>Зайнуллин Л.И., <sup>1</sup>Алимова Ф.К.

<sup>1</sup>ФГАО ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,

Казань, e-mail: vafin-ramil@mail.ru;

<sup>2</sup>ГНУ «Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства  
Россельхозакадемии», Казань

Целью настоящей работы являлась молекулярная идентификация перспективных генотипов яровой пшеницы селекции ТатНИИСХ по аллельным вариантам *Waxy*-генов для создания сортов с высокими мукомольно-хлебопекарными и технологическими свойствами зерна. Из 70 проанализированных образцов растений наиболее перспективными генотипами, рассматриваемыми в качестве исходного материала для дальнейшей селекционной работы по созданию сортов яровой пшеницы с крахмалом амилопектинового типа (с низким содержанием амилозы) являются две линии Кк-8/06-6 и О-192/03-5, несущие в своем геноме нулевой *Wx-B1b*-аллель. Для эффективной аллельной дискриминации *Wx-A1g* и *Wx-B1e* от нуль-аллелей *Wx-A1b* и *Wx-B1b* соответственно нами были разработаны оригинальные способы ПЦР- и ПЦР-ПДРФ-генотипирования с дополнительным обоснованием достоверности полученных результатов исследования методом прямого секвенирования амплифицированных фрагментов ДНК.

**Ключевые слова:** *Waxy*, ген, аллель, генотип, пшеница, идентификация, ПЦР, ПДРФ, секвенирование

## MOLECULAR IDENTIFICATION OF SPRING WHEAT GENOTYPES BY ALLELIC VARIANTS OF THE WAXY-GENES

<sup>1,2</sup>Abdulina I.R., <sup>1,2</sup>Vafin R.R., <sup>1</sup>Rzhanova I.V., <sup>1</sup>Garaeva A.L., <sup>2</sup>Askhadullin D.F.,  
<sup>2</sup>Askhadullin D.F., <sup>2</sup>Vasilova N.Z., <sup>1</sup>Zaynullin L.I., <sup>1</sup>Alimova F.K.

<sup>1</sup>Kazan (Volga region) federal university, Kazan, e-mail: vafin-ramil@mail.ru;

«Tatar research institute of agriculture of RAAS, Kazan

The aim of this study was a molecular identification of perspective spring wheat genotypes of the Tatar research institute of agriculture by allelic variants of *Waxy*-genes for creating new cultivars with high flour baking and technological properties of grain. Among the 70 analyzed samples of plants, the most perspective genotypes, considered as a starting material for further breeding to create the cultivars of spring wheat with starch of amylopectin type are two lines Кк-8/06-6 and О-192/03-5 carrying in its genome a null *Wx-B1b*-allele. For efficient allelic discrimination *Wx-A1g* and *Wx-B1e* from null-alleles *Wx-A1b* and *Wx-B1b*, respectively, we have developed original PCR- and PCR-RFLP-genotyping methods with additional justification of reliability the results by direct sequencing of amplified DNA fragments.

**Keywords:** *Waxy*, gene, allele, genotype, wheat, identification, PCR, RFLP, sequencing

Крахмал, являющийся основным компонентом зерновки пшеницы, представлен полисахаридами двух типов – разветвленного амилопектина и линейной амилозы, соотношение которых предопределяет технологические качества крахмала с тенденцией к улучшению мукомольно-хлебопекарных и технологических свойств зерна при снижении концентрации амилозы с 20 до 0% [1, 2, 3, 4, 5, 6].

Амилоза крахмала синтезируется за счет активности гранул-связанной синтазы крахмала (GBSSI), кодируемой 3 генами, получивших название *Waxy*, чьи *b*-аллельные варианты локусов, являющиеся нефункциональными нуль-аллелями, влияют на образование крахмала с пониженным содержанием амилозы (при наличии одного или двух нуль-аллелей), и состоящего только из амилопектина (при наличии всех трех нуль-аллелей) [1, 2, 3, 4, 5].

Наиболее перспективными подходами к оценке аллельного полиморфизма *Waxy*-

генов являются способы идентификации на основе молекулярно-генетических методов исследования – ключевого инструментария в маркер-вспомогательной селекции [1, 2, 3, 4, 5].

Целью настоящей работы являлась молекулярная идентификация перспективных генотипов яровой пшеницы селекции ТатНИИСХ по аллельным вариантам *Waxy*-генов для создания сортов с высокими мукомольно-хлебопекарными и технологическими свойствами зерна.

### Материалы и методы исследования

Молекулярно-генетическая оценка 70 образцов яровой пшеницы преимущественно селекции ТатНИИСХ на предмет идентификации генотипов по аллельным вариантам *Waxy*-генов проведена методами ПЦР- и ПЦР-ПДРФ-анализа на основе общепринятых [4, 5] и разработанных нами способов генотипирования с дополнительным обоснованием достоверности полученных результатов исследования методом прямого секвенирования амплифицированных фрагментов ДНК.

Экстракция геномной ДНК из зерновок растений яровой пшеницы молочно-восковой спелости генерации 2012 г. осуществлена коммерческим набором «ДНК-сорб С» («ЦНИИ эпидемиологии», Россия). Амплификация геномной ДНК проведена

на термоциклерах «Терцик» («ДНК-технология», Россия) и «MyCycler» с градиентом («Bio-Rad», США) с использованием олигонуклеотидных праймеров, перечень которых представлен в таблице.

Условия проведения ПЦР- и ПЦР-ПДРФ-анализа для идентификации аллельных вариантов *Wx*-генов пшеницы

Праймеры	Последовательности праймеров (5'-3')	Локус	Режим амплификации	ПДРФ-анализ
4F	AAGAGCAACTACCAGT	Wx-A1 Wx-B1	×1: 94°C – 4 мин ×40: 94°C – 30 с, 58°C – 30 с, 72°C – 30 с ×1: 72°C – 7 мин	
4R	TCGTACCCGTCGATGAAGTCGA	Wx-D1		
4F-с	CCCCCAAGAGCAACTACCAGT	Wx-A1 Wx-B1	×1: 94°C – 4 мин ×40: 94°C – 30 с, 64°C – 30 с, 72°C – 30 с ×1: 72°C – 7 мин	AcsI 50°C – 3 ч
4R	TCGTACCCGTCGATGAAGTCGA	Wx-D1		
Wx-A1L:	CCCCAAAGCAAAGCAGGAAAC	Wx-A1	×1: 94°C – 4 мин ×40: 94°C – 45 с, 55°C – 30 с, 72°C – 1 мин ×1: 72°C – 7 мин	HindIII 37°C – 3 ч
Wx-A1R	CGGCGTCGGGTCCATAGATC			

Детекция результатов ПЦР- и ПЦР-ПДРФ-анализа выполнена методом горизонтального электрофореза в 2–3% агарозном геле в буфере TBE (pH 8,0), содержащем этидий бромид с последующей визуализацией результатов в ультрафиолетовом трансиллюминаторе ( $\lambda = 310$  нм) геледокументирующей системы Gel Doc (Bio-Rad, США).

Размеры фрагментов ДНК оценены по подвижности в сравнении со стандартными ДНК маркерами. В работе использованы реактивы для молекулярно-биологических исследований производства ООО «СибЭнзим» (Россия).

Секвенирование продуктов амплификации проведено на генетическом анализаторе «ABI PRISM 3500» в НПО «Синтол» (Россия). Выравнивание секвенируемых последовательностей ДНК осуществлено с использованием программы BLAST NCBI.

### Результаты исследования и их обсуждение

По результатам молекулярной идентификации генотипов по аллельным вариантам *Wx*-генов установлено, что из 70 протестированных образцов яровой пшеницы 65 растений (92,8%) имели комбинацию активных аллелей *Wx-A1a/B1a/D1a* (1-ый дикий тип), 3 образца: Кк-11/06-11, Кк-11/06-10 и Кк-69/06-1 (4,4%) – *Wx-A1g/B1a/D1a* (неклассифицированный тип), и лишь 2 линии: Кк-8/06-6 и О-192/03-5 (2,8%) по классификации типов пшеницы с различным содержанием *Wx*-генов относились к 3-му типу (*Wx-A1a/B1b/D1a*) (табл. 2).

Для эффективной аллельной дискриминации *Wx-A1g* и *Wx-B1e* от нуль-аллелей *Wx-A1b* и *Wx-B1b* соответственно нами были разработаны оригинальные способы генотипирования, повышающие точность ДНК-анализа, с дополнительным обосно-

ванием достоверности тестов секвенированием ПЦР-продуктов и депонированием расшифрованных нуклеотидных последовательностей в GenBank NCBI (GenBank A/N: JX649155-JX649158).

Оригинальность предложенного нами способа генотипирования в части аллельной дискриминации *Wx-A1g* от нуль-аллеля *Wx-A1b* заключается в реконструкции прямого праймера 4F [4, 5] путем наращивания его 5'-концевого участка пятизвенным oligo (dC)5 блоком для выравнивания температур плавления реконструированного (4F-с) и обратного (4R) праймеров и подбора оптимальной температуры отжига ( $T_a = 64^\circ\text{C}$ ). Сам же принцип дискриминации данных аллелей основан на учете как наличия амплификации фрагмента локуса *Wx-A1g* размером 257 bp разной степени интенсивности сигнала в постановке ПЦР с праймерами 4F + 4R [4, 5] (рис. 1, а, треки 5–7), так и отсутствия ПЦР-продукта размером 262 bp в предложенном нами способе генотипирования с олигонуклеотидами 4F-с + 4R (рис. 1, в, треки 5–7).

Помимо обоснования достоверности ДНК-тестов секвенированием ПЦР-продуктов дополнительно была проведена процедура ПЦР-ПДРФ-анализа по *Wx-A1*-локусу с праймерами Wx-A1L + Wx-A1R и эндонуклеазным расщеплением рестриктазой *HindIII* [5], также подтвердившая правильность интерпретации выявленных аллелей.

Оригинальность же разработанного нами способа генотипирования в части дискриминации нуль-аллеля *Wx-B1b* от активного *Wx-B1e*-аллеля заключается в подборе

условий ПЦР-ПДРФ-анализа с праймерами 4F-с + 4R и эндонуклеазным расщеплением рестриктазой *AcsI*, генерирующих генотипические профили, в частности, с характерным для *Wx-B1b*-аллеля отсутствием

ПДРФ-фрагмента длиной 84 bp (рис. 2, треки 6–7), или наличием неразрезанного ПЦР-продукта локуса *Wx-B1e*-аллеля размером 266 bp в виду отсутствия у него соответствующего сайта рестрикции (R↑AATTY).

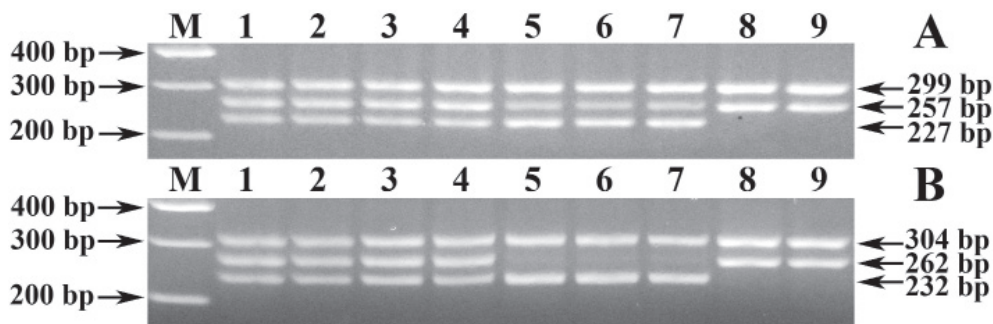


Рис. 1. Электрофореграмма результата ПЦР-идентификации генотипов яровой пшеницы селекции ТамНИИСХ по аллельным вариантам *Waxy*-генов. Обозначения: результаты ПЦР-идентификации с праймерами 4F + 4R (А) и 4F-с + 4R (В). М – ДНК-маркеры 100–1500 bp (СибЭнзим). 1–9 – генотипы с комбинацией *Wx*-аллелей: 1–4 – *Wx-A1a/B1a/D1a*; 5–7 – *Wx-A1g/B1a/D1a*. 8–9 – *Wx-A1a/B1b/D1a*

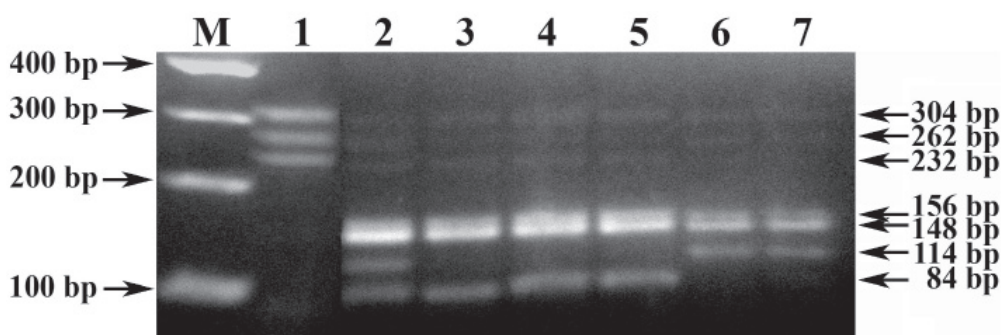


Рис. 2. Электрофореграмма результата ПЦР-ПДРФ-идентификации генотипов яровой пшеницы селекции ТамНИИСХ по аллельным вариантам *Waxy*-генов. Обозначения: М – ДНК-маркеры 50–100 bp (СибЭнзим). 1 – ПЦР-профиль генотипа с комбинацией аллелей *Wx-A1a/B1a/D1a* (304/262/232 bp). 2–7 – *AcsI*-ПДРФ-профиль генотипов с комбинацией *Wx*-аллелей: 2 – *Wx-A1a/B1a/D1a* (156/148/114/84 bp); 3–5 – *Wx-A1g/B1a/D1a* (156/148/84 bp); 6–7 – *Wx-A1a/B1b/D1a* (156/148/114 bp)

Таким образом, из общего числа проанализированных образцов растений (табл. 2) наиболее перспективными генотипами, рассматриваемыми в качестве исходного материала для дальнейшей селекционной работы по созданию сортов яровой пшеницы с крахмалом амилопектинового типа (с низким содержанием амилозы), являются две линии Кк-8/06-6 и О-192/03-5, несущие в своем геноме нулевой *Wx-B1b*-аллель, с последующим введением *Wx-A1b*- и (или) *Wx-D1b*-аллеля путем скрещивания с донорами нуль-аллелей по локусам *Waxy*-генов.

### Заключение

Представленная в настоящей работе информация является фактически первым опубликованным в виде научной статьи упоминанием о достоверном выявлении аллельных вариантов *Wx-A1g* и *Wx-B1b* *Waxy*-генов у генотипов яровой пшеницы отечественной селекции. Разработанные нами способы генотипирования по аллельным вариантам *Waxy*-генов повышают достоверность идентификации в части, касающейся дискриминации активных аллелей *Wx-A1g* и *Wx-B1e* от нуль-аллелей *Wx-A1b* и *Wx-B1b*.

Таблица 2

Молекулярно-генетическая оценка образцов яровой пшеницы на предмет идентификации генотипов по аллельным вариантам *Waxy*-генов

№ п/п	Сорт/линия	<i>Waxy</i> -гены								№ п/п	Сорт/линия	<i>Waxy</i> -гены							
		A1			B1			D1				A1			B1			D1	
		a	b	g	a	b	e	a	b			a	b	g	a	b	e	a	b
1	Казанская Юбилейная	+	-	-	+	-	-	+	-	36	К-27/00-2	+	-	-	+	-	-	+	-
2	К-109/02-5	+	-	-	+	-	-	+	-	37	К-23/00-3	+	-	-	+	-	-	+	-
3	Экада 97	+	-	-	+	-	-	+	-	38	К-414/01-1	+	-	-	+	-	-	+	-
4	К-100/03-2	+	-	-	+	-	-	+	-	39	К-21/00	+	-	-	+	-	-	+	-
5	К-18/03-8	+	-	-	+	-	-	+	-	40	К-58/01-2	+	-	-	+	-	-	+	-
6	К-68/04-5	+	-	-	+	-	-	+	-	41	К-48/04-2	+	-	-	+	-	-	+	-
7	К-130/04-10	+	-	-	+	-	-	+	-	42	К-106/01-2	+	-	-	+	-	-	+	-
8	Злата	+	-	-	+	-	-	+	-	43	К-101/04-3	+	-	-	+	-	-	+	-
9	К-88/02-19	+	-	-	+	-	-	+	-	44	К-112/04-2	+	-	-	+	-	-	+	-
10	К-6/01-2	+	-	-	+	-	-	+	-	45	К-134/04-19	+	-	-	+	-	-	+	-
11	К-5/03-6	+	-	-	+	-	-	+	-	46	К-51/00-3	+	-	-	+	-	-	+	-
12	К-48/03	+	-	-	+	-	-	+	-	47	К-133/05-5	+	-	-	+	-	-	+	-
13	К-100/03-8	+	-	-	+	-	-	+	-	48	К-57/05-6	+	-	-	+	-	-	+	-
14	К-21/02-5	+	-	-	+	-	-	+	-	49	К-117/04-4	+	-	-	+	-	-	+	-
15	К-46/04-9	+	-	-	+	-	-	+	-	50	К-12/04	+	-	-	+	-	-	+	-
16	К-68/04-1	+	-	-	+	-	-	+	-	51	К-99/05-2	+	-	-	+	-	-	+	-
17	К-23/04-1	+	-	-	+	-	-	+	-	52	Кк-8/06-1	+	-	-	+	-	-	+	-
18	К-49/04	+	-	-	+	-	-	+	-	53	Кк-71/06-3	+	-	-	+	-	-	+	-
19	К-7/04-2	+	-	-	+	-	-	+	-	54	Кк-8/06-6	+	-	-	-	+	-	+	-
20	Экада 113	+	-	-	+	-	-	+	-	55	Кк-75/06-3	+	-	-	+	-	-	+	-
21	Экада 109	+	-	-	+	-	-	+	-	56	Кк-11/06-11	-	-	+	+	-	-	+	-
22	К-93/05-2	+	-	-	+	-	-	+	-	57	Кк-11/06-10	-	-	+	+	-	-	+	-
23	К-29/02-5	+	-	-	+	-	-	+	-	58	Кк-69/06-4	+	-	-	+	-	-	+	-
24	К-109/02-13	+	-	-	+	-	-	+	-	59	Кк-6/07-2	+	-	-	+	-	-	+	-
25	К-20/02-2	+	-	-	+	-	-	+	-	60	Кк-69/06-1	-	-	+	+	-	-	+	-
26	К-73/03-4	+	-	-	+	-	-	+	-	61	Кк-71/06-8	+	-	-	+	-	-	+	-
27	К-68/04-4	+	-	-	+	-	-	+	-	62	Кк-75/06-5	+	-	-	+	-	-	+	-
28	К-100/03-9	+	-	-	+	-	-	+	-	63	О-192/03-5	+	-	-	-	+	-	+	-
29	К-7/04-1	+	-	-	+	-	-	+	-	64	О-25/05-2	+	-	-	+	-	-	+	-
30	К-65/05-2	+	-	-	+	-	-	+	-	65	О-206/05-2, д.515-10	+	-	-	+	-	-	+	-
31	К-11/04-8	+	-	-	+	-	-	+	-	66	О-186/04-1	+	-	-	+	-	-	+	-
32	Экада 66	+	-	-	+	-	-	+	-	67	О-464/02-2	+	-	-	+	-	-	+	-
33	Казанская юбилейная (неполег.)	+	-	-	+	-	-	+	-	68	О-513/00-21	+	-	-	+	-	-	+	-
34	К-65/05-1	+	-	-	+	-	-	+	-	69	Эр.255/00-3-1	+	-	-	+	-	-	+	-
35	Симбирцит	+	-	-	+	-	-	+	-	70	О-28/05-2	+	-	-	+	-	-	+	-

## Примечания:

- + – наличие соответствующих аллелей *Waxy*-генов;  
 -- отсутствие соответствующих аллелей *Waxy*-генов.

**Список литературы**

1. Климушина М.В. Об оптимизации систем молекулярного маркирования *Waxy*-генов пшеницы для целей MAS-селекции / М.В. Климушина, П.Ю. Крупин, М.Г. Дивашук, Г.И. Карлов // Сельскохозяйственная биология. – 2010. – № 5. – С. 36–41.

2. Климушина М.В. Распределение аллелей генов *Wx* в коллекции мягкой пшеницы Краснодарского НИИСХ им. П.П. Лукьяненко / М.В. Климушина, Н.И. Гладких, М.Г. Дивашук, Л.А. Беспалова, А.В. Васильев, Г.И. Карлов // Вавиловский журнал генетики и селекции – 2012. – Т. 16. – № 1. – С. 187–192.

3. Петрова И.В. Идентификация *Wx*-генотипов среди сортов озимой мягкой пшеницы / И.В. Петрова, С.В. Чеботарь, А.И. Рыбалка, Ю.М. Сиволап // Цитология и генетика – 2007. – № 6. – С. 11–17.

4. McLauchlan A. Development of robust PCR-based DNA markers for each homeo-allele of granule-bond starch synthase and their application in wheat breeding programs / A. McLauchlan, F.C. Ogbonnaya, B. Hollingsworth, M. Carter, K.R. Gale, R.J. Henry, T.A. Holton, M.K. Morell, L.R. Rampling, P.J. Sharp, M.R. Shariflou, M.G.K. Jones, R. Appels // Australian Journal of Agriculture Research – 2001. – Vol. 52. – № 11–12. – P. 1409–1416.

5. Vanzetti L.S. Genetic variability for waxy genes in Argentinean bread wheat germplasm / L. S. Vanzetti, L.A. Pfluger, M. Rodriguez-Quijano, J.M. Carrillo, M. Helguera // Electronic Journal of Biotechnology. – 2009. – Vol. 12. – № 1. – P. 1–9.

6. Yamamori M. Differential effects of *Wx-A1*, *-B1* and *-D1* protein deficiencies on apparent amylase content and starch pasting properties in common wheat / M. Yamamori, N.T. Quynh // Theor. Appl. Genet. – 2000. – Vol. 100. – P. 32–38.

**References**

1. Klimushina, M.V. About optimization of molecular labeling of wheat *Waxy*-genes for MAS-selection / M.V. Klimushina, P.Yu. Kroupin, M.G. Divashuk, G.I. Karlov // Agricultural Biology 2010. no. 5. pp. 36–41.

2. Klimushina M.V. Distribution of allelic variants of *Wx*-genes in the common wheat collection made at the Krasnodar Lukyanenko Research Institute of Agriculture / M.V. Klimushina, N.I. Gladkih, M.G. Divashuk, L.A. Bespalova, A.V. Vasilyev, G.I. Karlov // Vavilov Journal of Genetics and Breeding 2012. Vol. 16. no. 1. pp. 187–192.

3. Petrova I.V. Identification of *Wx*-genotypes of winter wheat / I.V. Petrova, S.V. Chebotar, A.I. Rybalka, Yu. M. Sivolap // Cytology and Genetics 2007. no. 6. pp. 11–17.

4. McLauchlan A. Development of robust PCR-based DNA markers for each homeo-allele of granule-bond starch synthase and their application in wheat breeding programs / A. McLauchlan, F.C. Ogbonnaya, B. Hollingsworth, M. Carter, K.R. Gale, R.J. Henry, T.A. Holton, M.K. Morell, L.R. Rampling, P.J. Sharp, M.R. Shariflou, M.G.K. Jones, R. Appels // Australian Journal of Agriculture Research 2001. Vol. 52. no. 11–12. pp. 1409-1416.

5. Vanzetti L.S. Genetic variability for waxy genes in Argentinean bread wheat germplasm / L. S. Vanzetti, L.A. Pfluger, M. Rodriguez-Quijano, J.M. Carrillo, M. Helguera // Electronic Journal of Biotechnology. 2009. Vol. 12. no. 1. pp. 1–9.

6. Yamamori M. Differential effects of *Wx-A1*, *-B1* and *-D1* protein deficiencies on apparent amylase content and starch pasting properties in common wheat / M. Yamamori, N.T. Quynh // Theor. Appl. Genet. 2000. Vol. 100. pp. 32–38.

**Рецензенты:**

Абрамова З.И., д.б.н., профессор кафедры биохимии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, г. Казань;

Багаева Т.В., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биотехнологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, г. Казань.

Работа поступила в редакцию 26.11.2012.