

УДК 633.11:577.114: 577.2.08:631.52

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОТИПОВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ ПО АЛЛЕЛЬНЫМ ВАРИАНТАМ НМW СУБЪЕДИНИЦ ГЛЮТЕНИНОВ^{1,2}Абдулина И.Р., ¹Вафин Р.Р., ²Тюлькин С.В., ¹Зайнуллин Л.И., ¹Алимова Ф.К.,
³Асхадуллин Д.Ф., ³Асхадуллин Д.Ф., ³Василова Н.З.¹ФГАО ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань,
e-mail: vafin-ramil@mail.ru;²ФГБУ «Татарская межрегиональная ветеринарная лаборатория», Казань;³ГНУ «Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства
Россельхозакадемии», Казань

Целью настоящей работы являлась молекулярная идентификация перспективных генотипов яровой пшеницы селекции ТатНИИСХ по аллельным вариантам НМW субъединиц глютеинов и апробация разработанного нами способа проведения ПЦР-ПДРФ-генотипирования с электрофорезной детекцией в агарозном геле. В результате молекулярно-генетической оценки 70 образцов яровой пшеницы установлено, что 32 генотипа *Triticum aestivum* имеют ассоциированную с высокими качествами зерна комбинацию субъединиц Ax2*/5 + 10 и могут рассматриваться как наиболее перспективные генотипы для дальнейшей селекционной работы по созданию сортов с высокими мукомольно-хлебопекарными качествами зерна. При апробации предложенного способа проведения ПЦР-ПДРФ, отличающегося от прототипа дополнительным введением этапа ПДРФ-анализа, нами получен обеспечиваемый заявленным способом технический результат, выраженный в эффективной идентификации аллельных вариантов *HMW-GS*, ввиду корректной интерпретации генерируемых ПЦР-ПДРФ-фрагментов.

Ключевые слова: НМW-GS, аллель, генотип, пшеница, идентификация, ПЦР, ПДРФ**MOLECULAR IDENTIFICATION OF SPRING WHEAT GENOTYPES BY ALLELIC VARIANTS OF THE HMW GLUTENIN SUBUNITS**^{1,2}Abdulina I.R., ¹Vafin R.R., ²Tyulkin S.V., ¹Zaynullin L.I., ¹Alimova F.K.,
³Askhadullin D.F., ³Askhadullin D.F., ³Vasilova N.Z.¹Kazan (Volga region) federal university, Kazan, e-mail: vafin-ramil@mail.ru;²Tatar trans-regional veterinarian laboratory, Kazan;³Tatar 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 HMW glutenin subunits and approbation of the PCR-RFLP genotyping method with detection by agarose gel electrophoresis developed by us. In result of the molecular-genetic evaluation of 70 samples of spring wheat was found that 32 *Triticum aestivum* genotypes are associated with high grain quality combination of Ax2*/5 + 10 subunits and can be considered as the most perspective genotypes for further breeding to create varieties with high flour and baking qualities of grain. When testing a proposed PCR-RFLP method which was differed from a prototype by introducing additional stage of the RFLP-analysis, we have obtained technical result expressed in effective identification of allelic variants of *HMW-GS* in view of the correct interpretation of the generated PCR-RFLP fragments.

Keywords: НМW-GS, allele, genotype, wheat, identification, PCR, RFLP

Идентификация генотипов пшеницы по аллельным вариантам НМW субъединиц глютеинов является важным звеном в маркер-вспомогательной селекции сортов с высокими мукомольно-хлебопекарными качествами зерна [1, 2, 3, 4, 5].

Наиболее высокоточными подходами к оценке аллельного полиморфизма НМW субъединиц глютеинов служат способы идентификации на основе молекулярно-генетических методов исследования [1, 2, 3, 4, 5].

Так, одним из подходов к идентификации аллельных вариантов *HMW-GS* пшеницы является способ проведения ПЦР с праймерами: UMN19F + UMN19R (*Ax1/Axnull*-и *Ax2**-аллели), UMN25F + UMN25R (*Dx2*- и *Dx5*-аллели) и UMN26F + UMN26R (*Dy10*- и *Dy12*-аллели) с последующей де-

текцией результатов реакции преимущественно методами капиллярного или вертикального гель-электрофореза в ПААГ [4].

Цель настоящей работы – молекулярная идентификация генотипов яровой пшеницы селекции ТатНИИСХ по аллельным вариантам НМW субъединиц глютеинов и апробация разработанного нами способа проведения ПЦР-ПДРФ-генотипирования с электрофорезной детекцией в агарозном геле.

Материалы и методы исследования

Молекулярно-генетическая оценка 70 образцов яровой пшеницы преимущественно селекции ТатНИИСХ на предмет идентификации генотипов по аллельным вариантам НМW субъединиц глютеинов (*HMW-GS*) проведена методами ПЦР- и ПЦР-ПДРФ-анализа на основе общеизвестного [4] и разработанного нами способов генотипирования.

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

Аmplификация геномной ДНК проведена на термоциклере «PTC-200» (MJ Research) с использованием праймеров [4, 5], перечень которых представлен в табл. 1.

Таблица 1

Условия проведения ПЦР- и ПЦР-ПДРФ-анализа для идентификации аллельных вариантов HMW субъединиц глютенинов пшеницы

Праймеры	Последовательности праймеров (5'-3')	Локус (аллели)	Режим амплификации	ПДРФ-анализ
UMN19F	CGAGACAATATGAGCAGCAAG	Glu-A1 (Ax1/Axnull, Ax2*)	×1:94°C – 4 мин ×40:94°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 30 с ×1:72°C – 5 м	HaeIII 37°C – 2 часа
UMN19R	CTGCCATGGAGAAGTTGGA			
UMN25F	GGGACAATACGAGCAGCAAA	Glu-D1 (Dx2, Dx5)	×1:94°C – 4 мин ×40:94°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 30 с ×1:72°C – 5 мин	HaeIII 37°C – 2 часа
UMN25R	CTTGTTCCGGTTGTTGCCA			
UMN26F	CGCAAGACAATATGAGCAAACT	Glu-D1 (Dy10, Dy12)	×1:94°C – 4 мин ×40:94°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 30 с ×1:72°C – 7 мин	HaeIII 37°C – 2 часа
UMN26R	TTGCCTTTGTCCTGTGTGC			
Axnull-F	ACGTTCCCCTACAGGТАСТА	Glu-A1 (Axnull)	×1:94°C – 4 мин ×40:94°C – 1 мин, 58°C – 1 мин, 72°C – 1 мин ×1:72°C – 7 мин	
Axnull-R	TATCACTGGCTAGCCGACAA			

Детекция результатов ПЦР- и ПЦР-ПДРФ-анализа выполнена методом горизонтального электрофореза в 3% агарозном геле в буфере TBE (рН 8,0), содержащем этидий бромид с последующей визуализацией результатов в ультрафиолетовом трансиллюминаторе ($\lambda = 310$ нм).

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

Выравнивание частичных нуклеотидных последовательностей аллелей HMW субъединиц глютенинов: CLUSTAL W (v. 1.83). ПЦР-ПДРФ-моделирование: NEBcutter v.2.0.

Результаты исследования и их обсуждение

По результатам практических исследований, направленных на апробацию предложенного способа проведения ПЦР-ПДРФ, нами получен обеспечиваемый заявленным способом технический результат, выраженный в эффективной идентификации аллельных вариантов *HMW-GS*, ввиду корректной интерпретации при электрофорезной детекции в агарозном геле генерируемых ПЦР-ПДРФ-фрагментов (рис. 2, 4, 6), сопоставимых с расчетными данными (рис. 1, 3, 5).

Отличительным признаком предложенного способа генотипирования от прототипа [4] является дополнительное введение этапа ПДРФ-анализа с эндонуклеазным расщеплением ампликонов рестриктазой

HaeIII с последующей детекцией результатов анализа методом горизонтального электрофореза в агарозном геле.

В результате молекулярно-генетической оценки на предмет идентификации генотипов по аллельным вариантам *Glu-A1*-локуса HMW субъединиц глютенинов установлено, что из 70 проанализированных образцов яровой пшеницы 13 растений (18,6%) имели субъединицу Ax1, кодируемую аллельным вариантом *Glu-A1a* (Ax1-аллель), а 57 образцов (81,4%) – субъединицу Ax2*, кодируемую аллельным вариантом *Glu-A1b* (Ax2*-аллель) (табл. 2).

При оценке этих же образцов яровой пшеницы по *Glu-D1*-локусу *HMW-GS* выяснено, что 44 растения (62,9%) характеризовались наличием комбинации субъединиц Dx5 и Dy10 (5 + 10), кодируемой аллельным вариантом *Glu-D1d* (Dx5- и Dy10-аллели), а 26 образцов (37,1%) имели комбинацию субъединиц Dx2 и Dy12 (2 + 12), кодируемую аллельным вариантом *GluD1a* (Dx2- и Dy12-аллели) (см. табл. 2).

Распределение же исследуемых генотипов по совокупной комбинации *Glu-A1*-/*Glu-D1*-локусов HMW субъединиц глютенинов было следующим: Ax1/5 + 10 = 12 (17,1%); Ax1/2 + 12 = 1 (1,4%); Ax2*/5 + 10 = 32 (45,7%); Ax2*/2 + 12 = 25 (35,7%) образцов яровой пшеницы; с преобладанием желаемой для селекции на мукомольно-хлебопекарные качества зерна комбинацией субъединиц Ax2*/5 + 10.

Алели	Праймер	UMN19F				
<i>HMW-GS</i>		CGAGACAATA TGAGCAGCAA G				
<i>Ax1</i>	001	CGAGACAATA TGAGCAGCAA GTCGTGGTGC	CGCCCAGGG	TGGATCTTTC	TACCCCGGCG	
<i>Axnull1</i>	001	
<i>Ax2*</i>	001	
		*****	*****	*****	*****	*****
<i>Ax1</i>	061	AGACCACGCC ACCACAGCAA CTCCACCAA	GTATACCTTG	GGGRATACCT	GCACTACTAA	
<i>Axnull1</i>	061	
<i>Ax2*</i>	061	
		*****	*****	*****	*****	*****
						<i>HaeIII</i>
<i>Ax1</i>	121	GAGGTATTA CCTAAGTGT ACTTCTCCGC	AACAGGTTTC	ATACTATCCA	GGCCAAGCTT	
<i>Axnull1</i>	121G.....	
<i>Ax2*</i>	121	
		*****	*****	*****	*****	*****
<i>Ax1</i>	181	CTTCGCAACG GCCAGGACAA GGTCAGCAGC	CAGGACAGG	ACACACAGAA	TACTACCTAA	
<i>Axnull1</i>	121	
<i>Ax2*</i>	181	
		*****	*****	*****	*****	*****
<i>Ax1</i>	241	CTTCTCCGCA ACAGTCAGGA CAATGGCAAC	AACCGGACA	AGGGCAGCA	GGGTACTACC	
<i>Axnull1</i>	121T..	
<i>Ax2*</i>	223T..	
		*****	*****	*****	*****	*****
						Праймер UMN19R
						TCCAAC TCTCCATGGC
<i>Ax1</i>	301	CAACTTCTCC GCAGCAGTCA GGACAGAGC	AACCGGGTA	CTATCCAAC T	TCTCCATGGC	
<i>Axnull1</i>	121R...	
<i>Ax2*</i>	283A...	
		*****	*****	*****	*****	*****
						ПЦР-продукт
						<i>HaeIII</i> -рестрикционное
						картирование
						<i>HaeIII</i> -ПЦР-ПЦРФ
						профили
<i>Ax1</i>	361	AG 362 bp	1-172/173-191/192-362	172/171/19 bp		
<i>Axnull1</i>	361	AG 362 bp	1-172/173-191/192-362	172/171/19 bp		
<i>Ax2*</i>	343	AG 344 bp	1-172/173-191/192-344	172/153/19 bp		
		**				

Рис. 1. Выравнивание фланкируемых с праймерами UMN19F + UMN19R нуклеотидных последовательностей *Ax1*-, *Axnull1*- и *Ax2**-аллелей *Glu-A1*-локуса *HMW* субъединиц глютенинов пшеницы, *HaeIII*-рестрикционное картирование и моделирование *HaeIII*-ПЦР-ПЦРФ-профилей

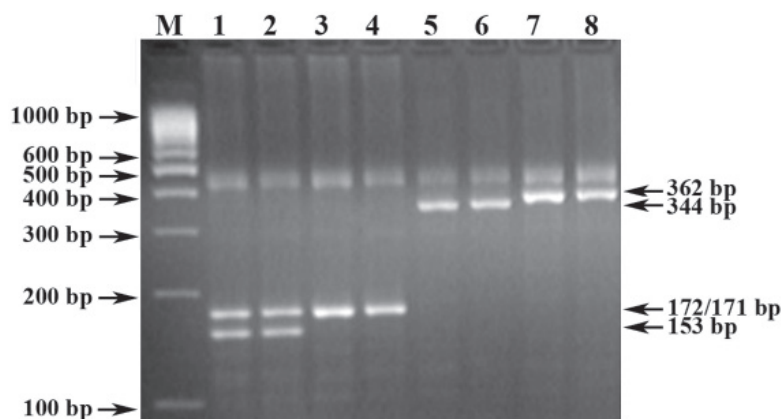


Рис. 2. Электрофореграмма технического результата предложенного способа проведения ПЦР-ПЦРФ и прототипа в постановке ПЦР (праймеры UMN19F + UMN19R) для идентификации аллельных вариантов (*Ax1/Axnull1* и *Ax2**) *HMW* субъединиц глютенинов пшеницы

Обозначения: М) ДНК-маркеры 100 bp (СибЭнзим). 1-4) *HaeIII*-ПЦР-ПЦРФ-анализ (предложенный способ): 1-2) *Ax2**-аллель (172/153/19 bp); 3-4) *Ax1/Axnull1*-аллели (172/171/19 bp). 5-8) ПЦР-анализ (прототип): 5-6) *Ax2**-аллель (344 bp); 7-8) *Ax1/Axnull1*-аллели (362 bp).

Алели	Праймер UMN25F						
HMW-GS	GGGACAATAC GAGCAGCAAA						
Dx2	001	GGGACAATAC GAGCAGCAAA	TCGTGGTGCC	GCCCAAGGGC	GGATCTTCT	ACCCCGGCGA	
Dx5	001
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
Dx2	061	GACCACGCCA CCGCAGCAAC	TCCAACAACG	TATATTTTGG	GGAATACCTG	CACTACTAAA	
Dx5	061
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
							HaeIII
Dx2	121	AAGGTATTAC CCAAGTGTA	CTTCTCCGCA	GCAGGTTTCA	TACTATCCAG	GCCAAGCTTC	
Dx5	121G.....
		*****	*** *****	*****	*****	*****	*****
Dx2	181	TCCGCACCGG CCAGGACAAG	GTCAGCAGCC	AGGACAAAGG	CAACAATCAG	GACAAGGACA	
Dx5	181
		*****	*****	*****	*****	*****	***
							Праймер UMN25R
							TGGCAACCAAC CGGAACCAAG
Dx2	241	ACAAGGGTAC TACCCAACTT	CTCCGCACCA	GCCAGGACCA	TGGCAACCAAC	CGGAACCAAG	
Dx5	223
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
		ПЦР-продукт	HaeIII-рестриционное картирование	HaeIII-ПЦР-ПЦРФ			
Dx2		299 bp	1-171/172-190/191-299	171/109/19 bp			
Dx5		281 bp	1-171/172-190/191-281	171/91/19 bp			

Рис. 3. Выравнивание фланкируемых с праймерами UMN25F + UMN25R нуклеотидных последовательностей Dx2- и Dx5-аллелей *Glu-D1*-локуса *HMW* субъединиц глютенинов пшеницы, *HaeIII*-рестриционное картирование и моделирование *HaeIII*-ПЦР-ПЦРФ-профилей

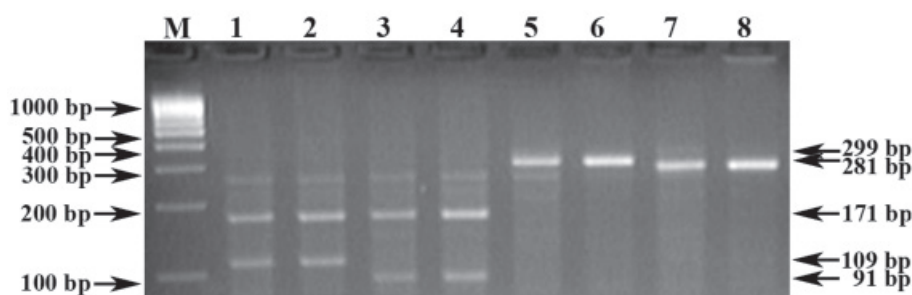


Рис. 4. Электрофореграмма технического результата предложенного способа проведения ПЦР-ПЦРФ и прототипа в постановке ПЦР (праймеры UMN25F + UMN25R) для идентификации аллельных вариантов (Dx2 и Dx5) *HMW* субъединиц глютенинов пшеницы

Обозначения: М) ДНК-маркеры 100 bp (СибЭнзим). 1-4) *HaeIII*-ПЦР-ПЦРФ-анализ (предложенный способ): 1-2) Dx2-аллель (171/109/19 bp); 3-4) Dx5-аллель (171/91/19 bp). 5-8) ПЦР-анализ (прототип): 5-6) Dx2-аллель (299 bp); 7-8) Dx5-аллель (281 bp).

Заключение

Учитывая общеизвестный факт положительного влияния аллельных вариантов *Glu-D1d* и *Glu-Alb* на повышение мукомольно-хлебопекарных качеств и отрицательного влияния аллельных вариантов *Glu-D1a* и *Glu-Ala* *HMW-GS*, приводящих к снижению хлебопекарных свойств пшеницы, можно констатировать, что из

70 исследованных образцов яровой пшеницы 32 генотипа *Triticum aestivum* имеют ассоциированную с высокими качествами зерна комбинацию субъединиц Ax2*/5 + 10 и могут рассматриваться как наиболее перспективные генотипы для дальнейшей селекционной работы по созданию сортов с высокими мукомольно-хлебопекарными качествами зерна.

Таблица 2

Молекулярно-генетическая оценка образцов яровой пшеницы на предмет идентификации генотипов по HMW субъединицам глютеинов

№ п/п	Сорт/линия	HMW-глютеины				№ п/п	Сорт/линия	HMW-глютеины			
		Glu-D1-локус		Glu-A1-локус				Glu-D1-локус		Glu-A1-локус	
		5 + 10	2 + 12	Ax1	Ax2*			5 + 10	2 + 12	Ax1	Ax2*
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	-	+	-	+

Примечание: + – наличие соответствующих субъединиц HMW-глютеинов
 - – отсутствие соответствующих субъединиц HMW-глютеинов

Выражаем благодарность Вафину Рихаду Абдулфатовичу за оказанную финансовую поддержку.

Список литературы

1. Ghazy A.I. Molecular screening of high molecular weight glutenin genes in spring bread wheat genotypes in Saudi Arabia / A.I. Ghazy, A.I. Zanouny, K.A. Moustafa, A.A. Al-Doss // *Journal of Food, Agriculture & Environment*. – 2012. – Vol. 10. – № 1. – P. 157–161.

2. Kocourkova Z. Wheat breeding for the improved bread-making quality using PCR based markers of glutenins / Z. Kocourkova, J. Bradova, Z. Kohutova, L. Slamova, P. Vejl, P. Horcicka // *Czech J. Genet. Plant Breed.* – 2008. – Vol. 44. – № 3. – P. 105–113.

3. Lafiandra D. PCR analysis of x- and y-type genes present at the complex Glu-A1 locus in durum and bread wheat / D. Lafiandra, G.F. Tucci, A. Pavoni, T. Turchetta, B. Margiotta // *Theor. Appl. Genet.* – 1997. – Vol. 94. – P. 235–240.

4. Liu S. New DNA markers for high molecular weight glutenin subunits in wheat / S. Liu, S. Chao, J.A. Anderson // *Theor. Appl. Genet.* – 2008. – Vol. 118. – № 1. – P. 173–183.

5. Moczulski M. Multiplex PCR identification of wheat HMW glutenin subunit genes by allele-specific markers / M. Moczulski, B.P. Salmanowicz // *J. Appl. Genet.* – 2003. – Vol. 44. – № 4. – P. 459–471.

References

1. Ghazy, A.I. Molecular screening of high molecular weight glutenin genes in spring bread wheat genotypes in Saudi Arabia / A.I. Ghazy, A.I. Zanouny, K.A. Moustafa, A.A. Al-Doss //

Journal of Food, Agriculture & Environment. 2012. Vol. 10. no. 1. pp. 157–161.

2. Kocourkova Z. Wheat breeding for the improved bread-making quality using PCR based markers of glutenins / Z. Kocourkova, J. Bradova, Z. Kohutova, L. Slamova, P. Vejl, P. Horcicka // *Czech J. Genet. Plant Breed.* 2008. Vol. 44. no. 3. pp. 105–113.

3. Lafiandra, D. PCR analysis of x- and y-type genes present at the complex Glu-A1 locus in durum and bread wheat / D. Lafiandra, G.F. Tucci, A. Pavoni, T. Turchetta, B. Margiotta // *Theor. Appl. Genet.* 1997. Vol. 94. pp. 235–240.

4. Liu, S. New DNA markers for high molecular weight glutenin subunits in wheat / S. Liu, S. Chao, J.A. Anderson // *Theor. Appl. Genet.* 2008. Vol. 118. no. 1. pp. 173–183.

5. Moczulski M. Multiplex PCR identification of wheat HMW glutenin subunit genes by allele-specific markers / M. Moczulski, B.P. Salmanowicz // *J. Appl. Genet.* 2003. Vol. 44. no. 4. pp. 459–471.

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 14.02.2013.