

УДК 633.11:577.114: 577.2.08:631.52

## ВЫЯВЛЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО ВАРИАНТА *Wx-A1g Waxy*-ГЕНА У ГЕНОТИПОВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ

*И.Р. Абдулина, Р.Р. Вафин, Л.И. Зайнуллин, Ф.К. Алимова*

### Аннотация

Изучен аллельный полиморфизм *Waxy*-генов у 70 генотипов яровой пшеницы преимущественно селекции ТатНИИСХ, где подавляющее большинство образцов (65 растений, 92.8%) относилось к 1-му дикому типу (*Wx-A1a/B1a/D1a*), 2 линии (2.8%) – к 3-му типу (*Wx-A1a/B1b/D1a*), а 3 линии: Кк-11/06-11, Кк-11/06-10 и Кк-69/06-1 (4.4%) – по классификации типов пшеницы с различным содержанием *Waxy*-генов характеризовались признаком неклассифицированного типа (*Wx-A1g/B1a/D1a*) ввиду наличия в их геномах редко встречающегося аллельного варианта *Wx-A1g*, выявленного у отечественных генотипов впервые. Предложен оригинальный способ идентификации аллельных вариантов *Wx-A1*-локуса, повышающий точность ДНК-анализа в части эффективной аллельной дискриминации *Wx-A1g* как от нуль-аллеля *Wx-A1b*, так и от активного аллеля *Wx-A1a* *Waxy*-гена пшеницы мягкой *Triticum aestivum* L.

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

### Введение

Аллельный полиморфизм *Waxy*-генов пшеницы и его ассоциация с мукомольно-хлебопекарными и технологическими свойствами зерна – актуальная область научных исследований, имеющая важное народно-хозяйственное значение [1–6].

Известно, что сочетания *b*-аллельных вариантов *Waxy*-генов в геномах пшеницы, являющихся нефункциональными нуль-аллелями, влияют на образование крахмала амилопектинового типа (с пониженным содержанием амилозы или полным его отсутствием). Изменение же содержания амилозы с тенденцией к снижению ее концентрации с 20% до 0% оказывает значительное влияние на технологические свойства крахмала и муки пшеницы [1–3, 6].

Помимо нефункциональных *b*-аллельных вариантов хорошо изучены также активные *a*-аллели *Waxy*-генов пшеницы, непосредственно кодирующие изоформы гранул-связанной синтазы крахмала (GBSSI), – ключевого фермента в синтезе амилозы, а также открыты другие редкие функциональные аллельные варианты, влияние которых на содержание амилозы в крахмале до конца не изучено [2, 5].

Цель настоящей работы – изучение аллельного полиморфизма *Waxy*-генов у генотипов яровой пшеницы отечественной селекции и разработка способа дискриминации аллельных вариантов *Wx-A1*-локуса *Triticum aestivum* L.

### Материалы и методы исследования

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

Исследованные в настоящей работе образцы яровой пшеницы были любезно предоставлены братьями Д.Ф. Асхадуллиными – селекционерами ГНУ ТатНИИСХ Россельхозакадемии (г. Казань).

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

ПЦР-амплификация геномной ДНК выполнена на термоциклерах «Терцик» («ДНК-технология», Россия) и «MyCycler» с градиентом (Bio-Rad, США) с использованием олигонуклеотидных праймеров, перечень которых представлен в табл. 1.

Табл. 1

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

Нуклеотидные последовательности праймеров (5'-3')	Локус	Режим ПЦР-амплификации	ПДРФ-анализ
4F-с: CCCCCAAGAGCAACTACCAGT 4R: TCGTACCCGTCGATGAAGTCGA	<i>Wx-A1</i> <i>Wx-B1</i> <i>Wx-D1</i>	×1: 94 °С – 4 мин ×40: 94 °С – 30 с, 64 °С – 30 с, 72 °С – 30 с ×1: 72 °С – 7 мин	
<i>Wx-A1L</i> : CCCCAAAGCAAAGCAGGAAAC <i>Wx-A1R</i> : CGGCGTCGGGTCCATAGATC	<i>Wx-A1</i>	×1: 94 °С – 4 мин ×40: 94 °С – 45 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин ×1: 72 °С – 7 мин	<i>HindIII</i> 37 °С 3 ч
<i>Wx-A2L</i> : CGCAGGGGAAGACGTGGT <i>Wx-A2R</i> : CGTTGACGATGCCGGTGATC	<i>Wx-A1</i>	×1: 94 °С – 4 мин ×40: 94 °С – 45 с, 65 °С – 40 с, 72 °С – 50 с ×1: 72 °С – 7 мин	

Детекция результатов ПЦР- и ПЦР-ПДРФ-анализа проведена методом горизонтального электрофореза в 2–3%-ном агарозном геле в буфере ТВЕ (рН 8.0), содержащем этидий бромид с последующей визуализацией результатов в ультрафиолетовом трансиллюминаторе (λ 310 нм) геледокументирующей системы Gel Doc (Bio-Rad, США).

Размеры амплифицированных и гидролизованных 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 выполнено на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 в НПО «Синтол» (Россия).

Выравнивание секвенируемых последовательностей ДНК осуществлено с помощью программы BLAST NCBI.

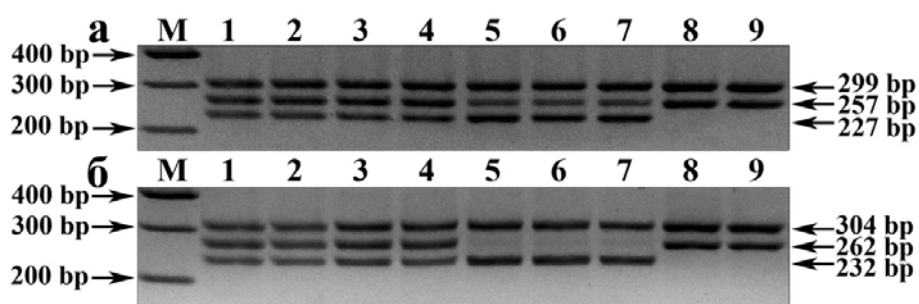


Рис. 1. Электрофореграмма результатов идентификации генотипов яровой пшеницы по аллельным вариантам *Waxy*-генов методом ПЦР. Результаты ПЦР-идентификации с праймерами 4F + 4R (а) и 4F-с + 4R (б). М – ДНК-маркеры 100–1500 bp (СибЭнзим). 1–9 – генотипы с комбинацией *Wx*-аллелей: 1–4 – *Wx-A1a/B1a/D1a*;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

### Результаты и их обсуждение

В результате молекулярной идентификации генотипов по аллельным вариантам *Waxy*-генов выявлены 3 линии яровой пшеницы: Кк-11/06-11, Кк-11/06-10 и Кк-69/06-1 (4.4%), относящиеся по классификации типов пшеницы с различным содержанием *Waxy*-генов к неклассифицированному типу ввиду наличия в их геномах редко встречающегося аллельного варианта *Wx-A1g* с совокупной комбинацией аллелей *Wx-A1g/B1a/D1a*.

Подавляющее же большинство исследуемых образцов (65 растений, 92.8%) принадлежало 1-му дикому типу (*Wx-A1a/B1a/D1a*), и всего лишь 2 линии (2.8%) соотносились к 3-му типу пшеницы (*Wx-A1a/B1b/D1a*).

Следует отметить, что аллельный вариант *Wx-A1g*, впервые описанный Л.С. Ванцетти и др. [5], характеризуется одинаковой с аллелем *Wx-A1a* длиной ПЦР-продукта размером 257 п.н. (рис. 1, а, треки 5–7) в общепринятом способе генотипирования [4, 5], но отсутствием амплификации соответствующего локуса (рис. 1, б, треки 5–7) в предложенном нами подходе, оригинальность которого заключается в реконструкции прямого праймера 4F [4, 5] путем наращивания его 5'-концевого участка пятизвенным oligo (dC)<sub>5</sub> блоком с целью выравнивания температур плавлений реконструированного (4F-с) и обратного (4R) праймеров для подбора оптимальной температуры отжига ( $T_a = 64^\circ\text{C}$ ).

Механизм блокировки амплификации локуса *Wx-A1g*-аллеля с олигонуклеотидами 4F-с + 4R обусловлен наличием для данного аллельного варианта двух неспаренных нуклеотидов в 11-й и 17-й позиции с 3'-конца обратного праймера, что при заданной температуре отжига ( $64^\circ\text{C}$ ) угнетает процесс наработки соответствующего ПЦР-продукта размером 262 п.н.

Сочетанием же общепринятого [4, 5] и предложенного нами способов генотипирования достигается точность ДНК-анализа в части эффективной аллельной дискриминации *Wx-A1g* как от нуля-аллеля *Wx-A1b*, так и активного аллеля *Wx-A1a* *Waxy*-гена.

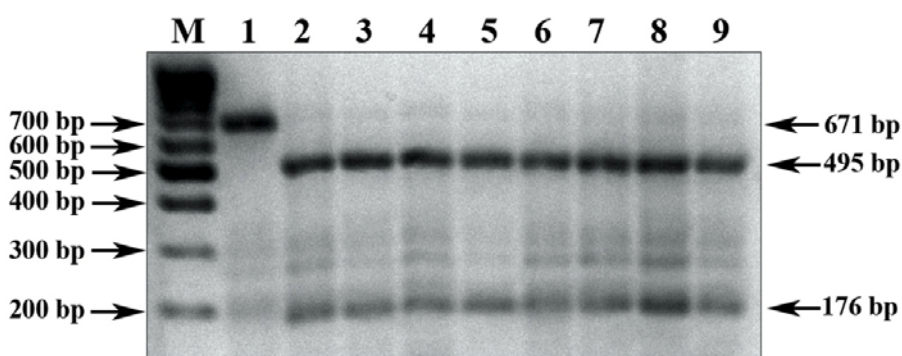


Рис. 2. Электрофореграмма результата идентификации генотипов яровой пшеницы по аллельным вариантам *Wx-A1*-локуса методом ПЦР-ПДРФ. М – ДНК-маркеры 100–1500 bp (СибЭнзим); 1 – ПЦР-продукт аллельного варианта *Wx-A1a Waxy*-гена; 2–4 и 8–9 – ПЦР-ПДРФ-профиль аллельного варианта *Wx-A1a*; 5–7 – ПЦР-ПДРФ-профиль аллельного варианта *Wx-A1g*

Линия	Праймер 4F-с						
	001	061	121	181	241	262 bp	A/N
Кк-71/06-3	001	061	121	181	241	262 bp	JX649155
Кк-11/06-10	001	061	121	181	241	262 bp	JX649156
Кк-11/06-11	001	061	121	181	241	262 bp	JX649157
Кк-69/06-1	001	061	121	181	241	262 bp	JX649158

Рис. 3. Результат выравнивания аллельных последовательностей *Wx-A1a* и *Wx-A1g Waxy*-гена изученных генотипов яровой пшеницы

Для обоснования достоверности ДНК-тестов дополнительно проведена процедура ПЦР-ПДРФ-анализа по *Wx-A1*-локусу с праймерами *Wx-A1L* + *Wx-A1R* [5] и эндонуклеазным расщеплением рестриктазой *HindIII* (рис. 2), а также секвенированы генерируемые с праймерами *Wx-A2L* + *Wx-A2R* [5] ПЦР-продукты линий яровой пшеницы Кк-11/06-11, Кк-11/06-10 и Кк-69/06-1 – носителей *Wx-A1g*-аллеля – с последующим выравниванием (рис. 3) депонированных в GenBank NCBI расшифрованных нуклеотидных последовательностей (GenBank A/N: JX649156-JX649158).

Так, если проведенный ПЦР-ПДРФ-анализ (рис. 2) был информативен в части совокупной дискриминации обнаруженных активных аллелей *Wx-A1*-локуса (*Wx-A1a* и *Wx-A1g*) от нулевого *Wx-A1b*-аллеля, то результат же выравнивания секвенированных последовательностей (рис. 3) имел статус генерального обоснования наличия именно аллельного варианта *Wx-A1g* *Waxy*-гена у трех линий яровой пшеницы селекции ТатНИИСХ.

### Заключение

Таким образом, в ходе молекулярно-генетической оценки образцов яровой пшеницы селекции ТатНИИСХ впервые у генотипов отечественной селекции – линий Кк-11/06-11, Кк-11/06-10 и Кк-69/06-1 – обнаружен *Wx-A1g*-аллель *Waxy*-гена *Triticum aestivum* L.

Предложенный для корректной аллельной дискриминации оригинальный способ геноидентификации в сочетании с общепринятой техникой генотипирования [4, 5] значительно повышает точность ДНК-анализа в части дифференциации активного аллельного варианта *Wx-A1g* от нуля (*Wx-A1b*) и функционального *Wx-A1a*-аллеля *Waxy*-гена.

Точность же идентификации аллельного состояния *Waxy*-генов на основе молекулярно-генетических методов исследования – залог эффективного ведения маркер-вспомогательной селекции по созданию сортов пшеницы с высокими мукомольно-хлебопекарными и технологическими свойствами зерна.

### Summary

*I.R. Abdulina, R.R. Vafin, L.I. Zainullin, F.K. Alimova.* Identification of the *Wx-A1g* Allelic Variant of the *Waxy* Gene in Spring Wheat Genotypes of Russian Breeding.

An allelic polymorphism of the *Waxy* genes in 70 spring wheat genotypes selected primarily by the Tatar Research Institute of Agriculture was studied. The vast majority of the samples (65 plants, 92.8%) belonged to the 1st wild type (*Wx-A1a/B1a/D1a*), 2 lines (2.8%) belonged to the 3rd type (*Wx-A1a/B1b/D1a*), and 3 lines (Кк-11/06-11, Кк-11/06-10 and Кк-69/06-1 (4.4%)) according to the classification of wheat types with various contents of *Waxy* genes were characterized by a sign of unclassified type (*Wx-A1g/B1a/D1a*) due to the presence in their genomes of a rare *Wx-A1g* allelic variant, identified among Russian genotypes for the first time. An original technique for identification of allelic variants of *Wx-A1* locus was proposed. It increases the accuracy of DNA analysis in terms of the effective allelic discrimination of *Wx-A1g* both from the *Wx-A1b* null allele and the *Wx-A1a* active allele of the *Triticum aestivum* L. *Waxy* gene.

**Key words:** wheat, *Waxy* gene, allele, genotype, identification, PCR-RFLP, sequencing.

### Литература

1. Климущина М.В., Крутин П.Ю., Дивашук М.Г., Карлов Г.И. Об оптимизации систем молекулярного маркирования *Waxy*-генов пшеницы для целей MAS-селекции // С.-х. биология. – 2010. – № 5. – С. 36–41.
2. Климущина М.В., Гладких Н.И., Дивашук М.Г., Беспалова Л.А., Васильев А.В., Карлов Г.И. Распределение аллелей генов *Wx* в коллекции мягкой пшеницы Краснодарского НИИСХ им. П.П. Лукьяненко // Вавиловский журн. генетики и селекции. – 2012. – Т. 16, № 1. – С. 187–192.

3. Петрова И.В., Чеботарь С.В., Рыбалка А.И., Сиволан Ю.М. Идентификация *Wx*-генотипов среди сортов озимой мягкой пшеницы // Цитология и генетика – 2007. – № 6. – С. 11–17.
4. McLauchlan A., Ogbonnaya F.C., Hollingsworth B., Carter M., Gale K., Henry R.J., Holton T.A., Morell M.K., Rampling L.R., Sharp P.J., Shariflou M.R., Jones M.E., Appels R. Development of robust PCR based DNA markers for each homoeo-allele of granule bound starch synthase and their application in wheat breeding programs // Austral. J. Agricult. Res. – 2001. – V. 52, No 11–12. – P. 1409–1416.
5. Vanzetti L.S., Pflüger L.A., Rodríguez-Quijano M., Carrillo J.M., Helguera M. Genetic variability for waxy genes in Argentinean bread wheat germplasm // Electron. J. Biotechnol. – 2009. – V. 12, No 1. – P. 1–9. – URL: <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/342>.
6. Yamamori M., Quynh N.T. Differential effects of *Wx-A1*, *-B1* and *-D1* protein deficiencies on apparent amylase content and starch pasting properties in common wheat // Theor. Appl. Genet. – 2000. – V. 100. – P. 32–38.

Поступила в редакцию  
29.11.12

---

**Абдулина Индира Рамильевна** – соискатель кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [indira-abdulina87@yandex.ru](mailto:indira-abdulina87@yandex.ru)

**Вафин Рамиль Ришадович** – доктор биологических наук, научный консультант кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [vafin-ramil@mail.ru](mailto:vafin-ramil@mail.ru)

**Зайнуллин Ленар Ильгизарович** – кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [lenarilgizayn@mail.ru](mailto:lenarilgizayn@mail.ru)

**Алимова Фарида Кашифовна** – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [farida\\_alimova@hotmail.com](mailto:farida_alimova@hotmail.com)