

М. К. Топораш

ПЛР-АНАЛІЗ АЛЕЛЬНОГО СТАНУ *Wx*-ГЕНІВ В ГЕНОТИПАХ
СЕЛЕКЦІЙНИХ ФОРМ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

Науковий керівник: професор, д.б.н. С. В. Чеботар

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
Одеса, Шампанський провулок 2, 65058, Україна E-mail: toporash@ukr.net

N. K Toporash. Pcr analysis of the alleles of wx-loci in genotypes of wheat breeding forms

The aim of work was to reveal the alleles of *Wx*-loci by PCR method in 16 breeding forms of bread wheat that have been selected in Yurjev Plant Production Institute (Kharkov). We have detected the presence of null-allele *Wx-A1b* in genotypes 146-02/5, 146-07/1, 146-07/2; *Wx-B1b* allele — in genotype 146-06/3 and both null-alleles (*Wx-A1b* and *Wx-B1b*) in genotypes of 146-02/1, 146-02/2; in the other lines the alleles *Wx-A1a*, *Wx-B1a*, *Wx-D1a* have been tested. Any form did not contain *Wx-D1b* allele. Forms with null-alleles will be used for creation of wheat variety with low content of amylose in endosperm of grains.

Ключові слова: м'яка пшениця, молекулярно-генетичний поліморфізм, ПЛР, *Wx*-гени.

Вступ

Одним з чинників, які змінюють якість зерна м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) є знижений вміст амілози в ендоспермі. Ця ознака позитивно впливає на хлібопекарську та борошномельну якість пшениці, так як крохмаль зі зниженим вмістом амілози більш чутливий до механічного впливу. При помелі відбувається руйнування крохмальних гранул, що збільшує площу поверхні і призводить до підвищення водопоглинальної здатності і амілолітичної активності борошна, це створює сприятливі умови для високої активності дріжджів в тісті [8]. Є дані про те, що знижений вміст амілози збільшує термін зберігання хлібобулочних виробів, тому що саме амілоза сприяє черствінню хліба [12, 14]. Дослідники сходяться на думці, що тісто приготоване з такого борошна, краще витримує режим заморожування-відтаювання, тобто може бути рекомендовано для приготування виробів із замороженого тіста [5].

Більша частина поживних речовин м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) міститься в ендоспермі, основним компонентом якого є крохмаль. Крохмаль накопичується у вигляді гранул, які складаються з полісахаридів двох типів — розгалуженого амілопектину і лінійної амілози. Вміст амілози становить 20-25 % маси крохмалю, амілопектин займає 70-75 % [10]. Зміна кількості амілози значно впливає на технологічні властивості крохмалю і борошна пшениці.

Ключовим ферментом у синтезі амілози є гранул-зв'язана синтаза крохмалю (GBSSI), також відома як білок *Waxy* [15]. У геномі м'якої пшениці три гомеологічних гена кодують ізоформи GBSSI ферменту. Дані гени, що отримали назву *Wx*, розташовані в хромосомах 7AS (*Wx-A1*), 4AL (*Wx-B1*) і 7DS (*Wx-D1*) [6]. У кукурудзи, ячменю, рису, вівса і пшениці були виявлені мутанти по генам *Wx*, у яких спостерігалось зниження або повна відсутність амілози [7].

Встановлено, що у пшениці кожен з генів *Wx* має декілька алелів: активний алель (*a*), що кодує синтез білка *Waxy*; неактивний (*b* — нуль-алель), при якому синтез функціонального білка *Waxy* відсутній; а також функціональні алелі з різною ферментативною активністю білка *Waxy*. Генотип м'якої пшениці з одним або двома нефункціональними генами (нуль-алелями) синтезує крохмаль зі зниженим рівнем амілози. Така пшениця використовується для виробництва високоякісної локшини, особливо в країнах Південно-Східної Азії, де цей продукт є традиційним [8]. Крім нуль-алелів за всіма *Wx*-локусами, для *Wx*-генів був виявлений ряд інших функціональних алельних варіантів [9, 16]. Вплив даних алелів на вміст амілози в крохмалі пшениці до кінця ще не вивчено.

У колекціях сортів пшениці з різних країн знайдені різноманітні комбінації активних і неактивних алелів *Wx*. Виявлено, що більше 15 % сортів китайської, турецької, аргентинської

і корейської селекції несуть нуль-алель по гену *Wx-A1* [16]. Близько 20 % сортів з нуль-алелем за геном *Wx-B1* спостерігається серед сортів австралійської, індійської та японської селекції [13, 17]. Єдиний в світі сорт, який містить нуль-алель за геном *Wx-D1*, був знайдений в Китаї [14].

За даними російських вчених після аналізу 99 краснозерних сортів м'якої пшениці з колекції Краснодарського НДІСГ імені П. П. Лук'яненко нуль-алелі за *Wx-A1* виявлено лише у двох. Також два сорти несли в своєму геномі алель *Wx-Ble*. Сортів, з нуль-алелем в локусі *Wx-D1*, виявлено не було. Показано, що всі інші сорти досліджуваної колекції несли алелі дикого типу за локусом *Wx-D1* [2].

Вітчизняні науковці також займаються цією проблемою. Дослідження І.В. Петрової щодо ідентифікації *Wx*-генотипів серед українських сортів озимої м'якої пшениці показали, що в зразках з різних селекційних центрів не було детектовано мутацій за *Wx*-генами [3].

Тому з метою одержання пшениці спеціальної групи якості зерна в Україні, почали створювати сорти з низьким вмістом амілози у двох селекційних установах НААН: Селекційно-генетичному інституті — Національному центрі насіннезнавства та сортовивчення (СГІ-НЦНС; м. Одеса) і в Інституті рослинництва імені В.Я. Юр'єва (ІР; м Харків).

Наша робота спрямована на визначення алельного стану *Wx*-генів; за допомогою ПЛР-аналізу в селекційних формах, що отримані в Інституті рослинництва імені В.Я. Юр'єва.

Матеріали та методи досліджень

В роботі використовували методи: виділення ДНК з паростків згідно методики з використанням СТАВ-буферу [1], ПЛР-аналізу, електрофорезу продуктів ампліфікації, методи візуалізації, обчислювання і документування результатів електрофорезу.

ПЛР проводили на приладі T-CY ("CreaCont", Нідерланди) з праймерами, що розроблені McLauchlan з співавторами [11] і Nakamura з співавторами [12], як рекомендовано [11, 12]. Продукти ПЛР розділяли за допомогою електрофорезу в 3 % агарозному гелі в трис-боратному буферному розчині (1xTBE). В якості маркерів молекулярної маси використовували pUC 19/ Msp I (M1) та DNA Ladder Mix (M2).

В роботі досліджували форми озимої м'якої пшениці, які були створені в селекційній програмі в Інституті рослинництва імені В.Я. Юр'єва (м. Харків) та надані завідуючим сектором генетичних ресурсів колосових культур д.с.-г.н. О.Ю. Леоновим. Це 17 селекційних форм озимої м'якої пшениці з популяцій F₃, що одержані від схрещування сортів Донецька 48, Ферругінеум 1239 і Поволзька 86 зі створеними Р. Грейбошем *Wx*-лініями ID529, ID477, ID389 (University of Nebraska, Lincoln, USA).

Контрольні зразки: *Wx* 624/65 та *Wx*623/170 (лінії пшениці з нульовим вмістом амілози) та сорт Куяльник (з нормальним вмістом амілози), надані д.б.н. О.І. Рибалкою (відділ генетичних основ селекції СГІ - НЦНС).

Результати та обговорення

Результати ПЛР-аналізу локусу *Wx-A1*, що представлені на рис. 1 показали наявність мутантного алелю *Wx-A1b* у селекційних форм 146-02/1 146-02/2, 146-02/5, а також у форм 146-07/1, 146-07/2. Виявлені фрагменти ампліфікації за молекулярною масою відповідають фрагментам ампліфікації, які ми отримали за допомогою ПЛР-аналізу контрольних зразків з нульовим вмістом амілози — *Wx* 624/65, *Wx* 623/170 (370 п.н).

При аналізі локуса *Wx-B1* (рис. 2) формами, що несуть нуль-алель виявилися 146-02/1, 146-02/2. ПЛР-спектри, що отримані з праймерами #4F і #4R при дослідженні ДНК цих форм співпадали з продуктами ампліфікації (668 п.н.), що виявляються у контрольних зразків, які мають нуль-алель за *Wx-B1* локусом.

У досліджених в роботі селекційних форм алель *Wx-D1b* не детектовано. Цей алель виявлено тільки у контрольних зразках *Wx*624/65 та *Wx*623/170 (1731 п.н) (рис. 3).

Всі інші селекційні форми, що досліджували в роботі, характеризувалися продуктами ампліфікації, які відповідають алелям *Wx-A1a*, *Wx-B1a*, *Wx-D1a* та співпадають з продуктами

ПЛР, які було детектовано при дослідженні ДНК з сорта Куяльник, для якого характерний нормальний вміст амілози в крохмалі зерна.

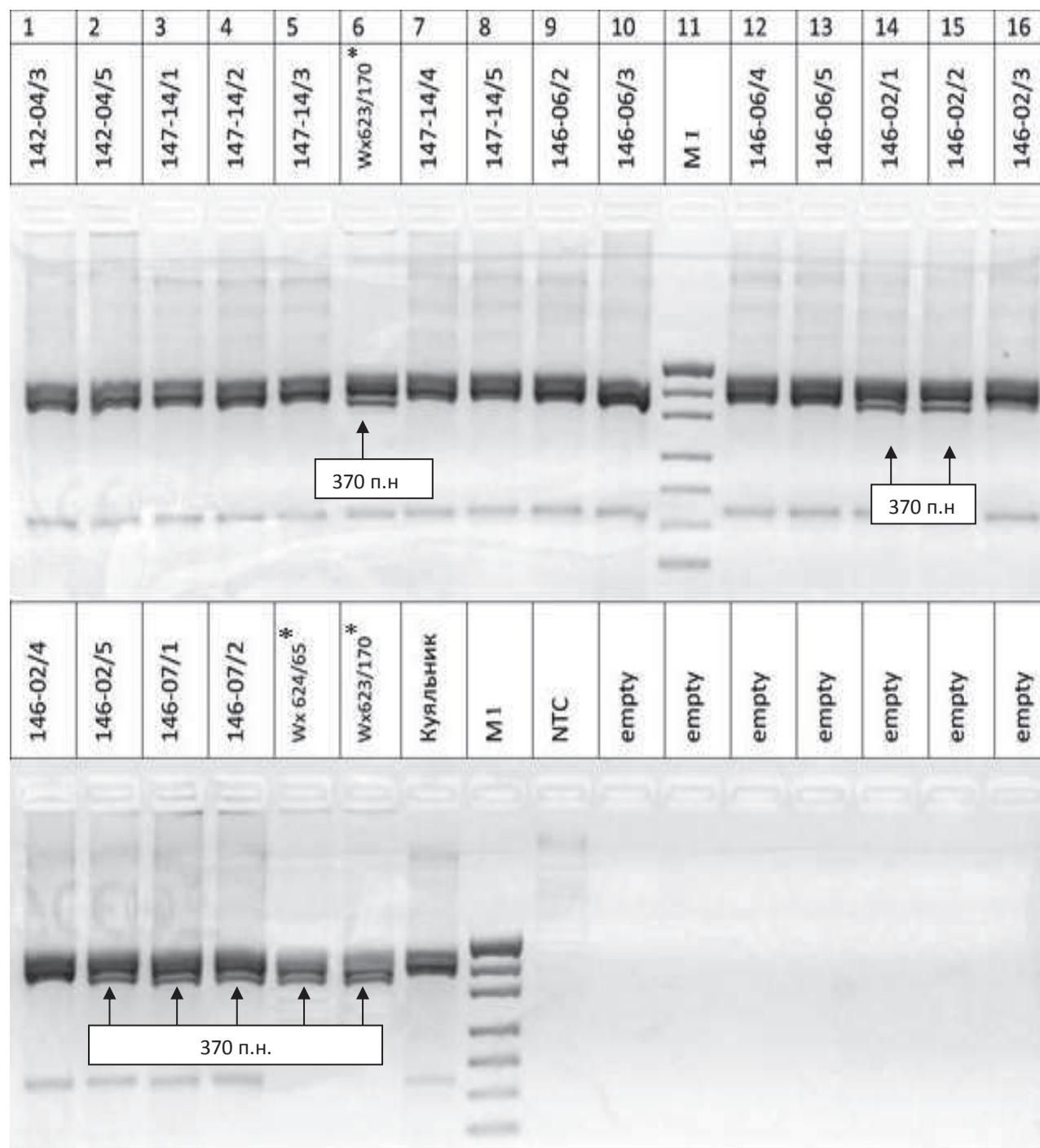


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ПЛР отриманих з використанням локус-специфічних до *Wx-A1* праймерів AFC і AR2. Wx 624/65*, Wx 623/170* — контрольні зразки. M1— маркер молекулярної маси pUC 19/ Msp I

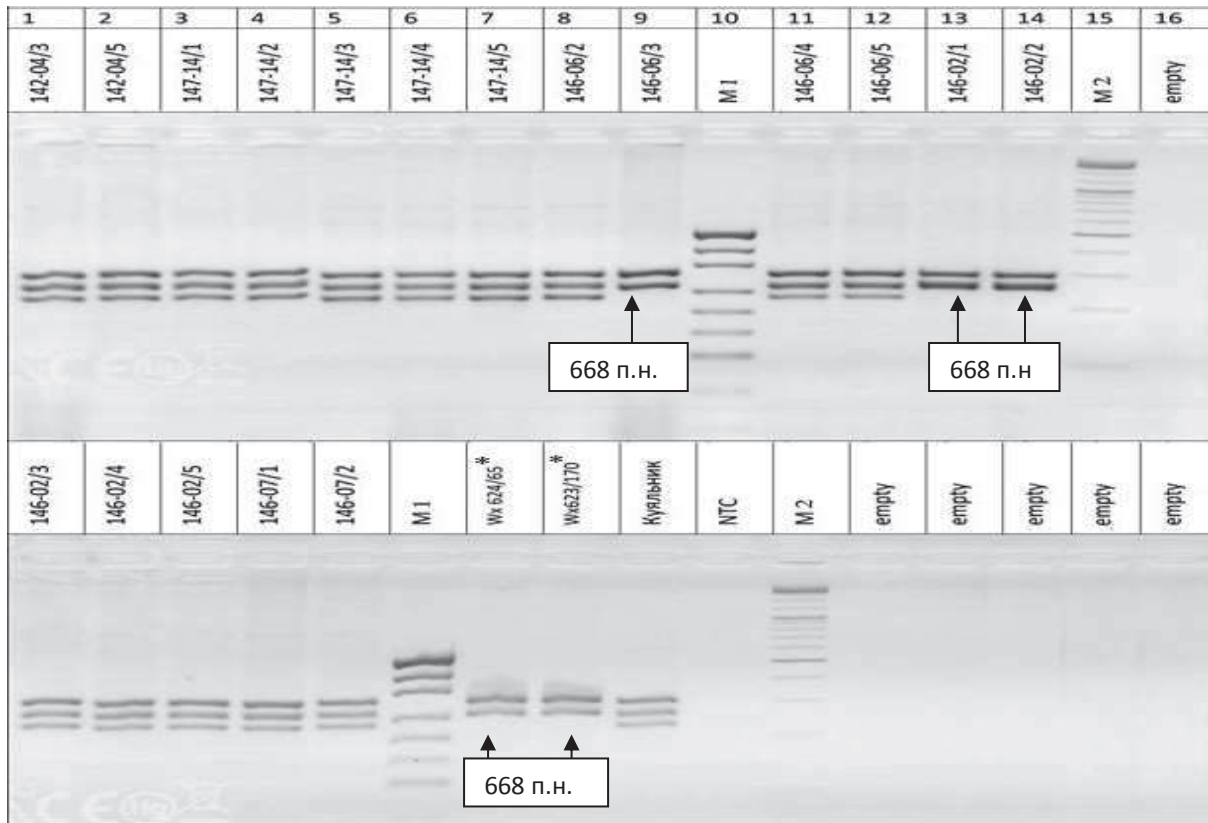


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР отриманих з використанням локус-специфічних до *Wx-B1* праймерів #4F #4R. Wx 624/65*, Wx 623/170* — контрольні зразки. M1 і M2 — маркери молекулярної маси рUC 19/ Msp I і «DNA Ladder Mix»

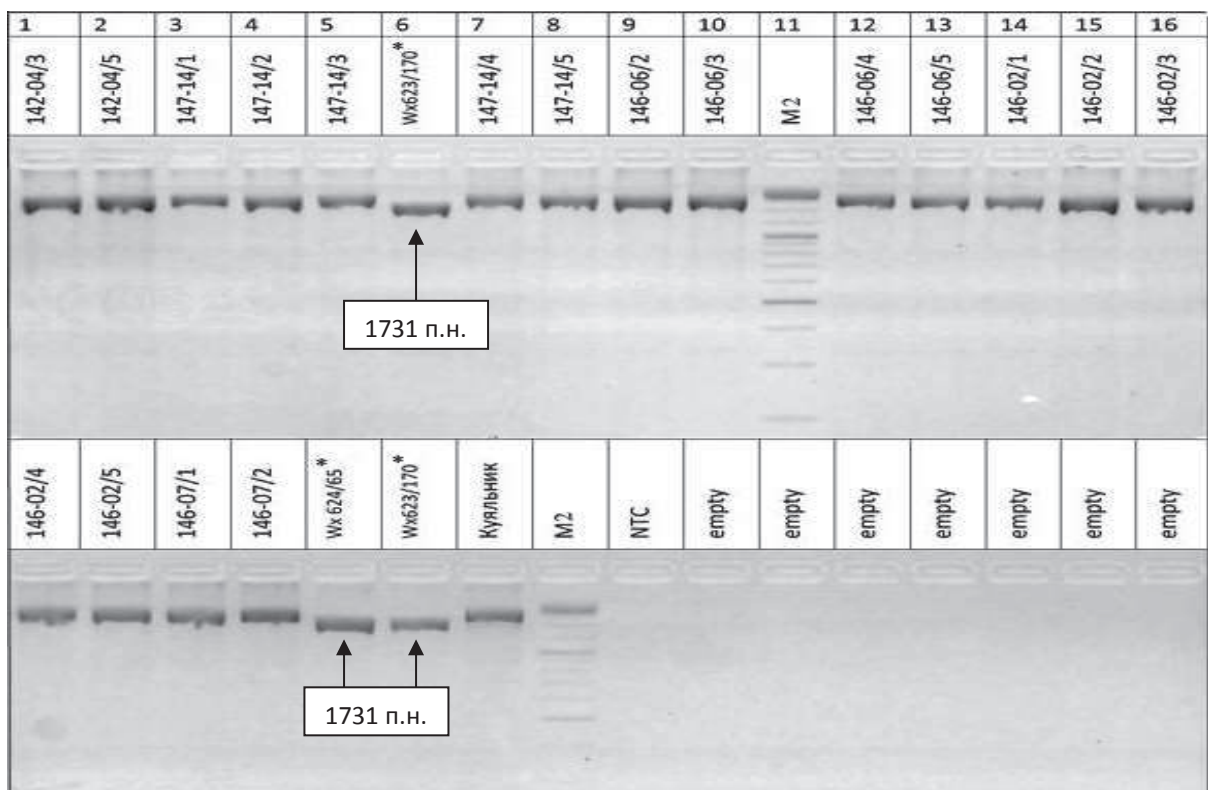


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ПЛР *Wx-D1* локусу отриманих з використанням локус-специфічних праймерів BDFL і 4DRSL. Wx 624/65*, Wx 623/170* — контрольні зразки. M2 — маркер молекулярної маси «DNA Ladder Mix»

Таким чином показано, що деякі представлені форми мають мутантні алелі - *Wx-A1b* (146-02/1, 146-02/2, 146-02/5, 146-07/1, 146-07/2) та *Wx-B1b* (146-02/1, 146-02/2). Отримані дані показують певні позитивні результати у селекції пшениці з низьким вмістом амілози. Але, слід відмітити, що селекціонерами не виділено жодної форми з трьома нуль-алелями за *Wx*-генами. Як ті десять форм з генотипом *Wx-A1b*, *Wx-B1b*, *Wx-D1b*, що відібрані І.В. Петровою [4] за даними молекулярно-генетичного аналізу алелів *Wx*-генів у рослин популяції F₅, яка отримана від схрещування сорту Куяльник × лінії Wx-12 (ярова пшениця з трьома нуль-алелями за *Wx*-генами). Визначені нами селекційні форми пшениці 146-02/1, 146-02/2, які є носіями алелів *Wx-A1b* і *Wx-B1b*, рекомендуємо схрестити з *Wx*-лініями ID529, ID477 або ID389 з метою отримання рослин носіїв трьох *Wx-A1b*, *Wx-B1b*, *Wx-D1b*, ендосперм яких буде характеризуватися низьким вмістом амілози.

Висновки

Наші дослідження показали, що форми пшениці 146-02/1, 146-02/2 за *Wx*-генами мають два нуль-алелі *Wx-A1b* та *Wx-B1b*. Форми м'якої пшениці 146-02/5, 146-07/1, 146-07/2 мають один нуль-алель *Wx-A1b*, а селекційні форми 142-04/3, 142-04/5, 147-14/1, 147-14/2, 147-14/3, 147-14/5, 146-06/2, 146-06/4, 146-06/5, 146-02/4 характеризуються наявністю алелів дикого типу - *Wx-A1a*, *Wx-B1a*, *Wx-D1a*. Для отримання озимих форм м'якої пшениці з трьома нуль-алелями *Wx*-генів рекомендуємо провести додаткове схрещування форм 146-02/1, 146-02/2 з лініями носіями *Wx-A1b*, *Wx-B1b*, *Wx-D1b*.

Список літератури

1. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях / под ред. Ю.М. Сиволапа // Киев: Аграрна наука – 1998. – С. 833.
2. Климушина М.В., Гладких Н.И., Дивашук М.Г. и др. Распределение аллелей генов *Wx* в коллекции мягкой пшеницы краснодарского НИИСХ им. П.П. Лукьяненко // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Том 16, № 1. – С. 187–189.
3. Петрова И.В., Чеботарь С.В., Рыбалка А.И., Сиволап Ю.М. Идентификация *Wx* генотипов среди сортов озимой мягкой пшеницы // Цитология и генетика. – 2007. – Т. 41, № 2. – С. 30 – 36.
4. Петрова И.В., Чеботарь С.В., Рыбалка А.И., Сиволап Ю.М. Молекулярно-генетический анализ селекционных линий мягкой пшеницы с крахмалом амилопектинового типа // Цитология и генетика. – 2011. – №5. – С.17 – 22.
5. Рыжкова Т.А., Нецветаев В.П. Реологические и ферментативные свойства муки мягкой пшеницы в зависимости от доли генов *Wx*. // Матеріали міжнародної наукової конференції „Селекція та генетика: традиції та перспективи”(18-19 жовтня 2012 року, Одеса) – С. 352 – 353.
6. Chao S., Sharp P., Worland E. et. al. RELP-based genetic map of wheat homeologous group 7 chromosome // Theor. Appl. Genet. – 1989. – V. 78. – P. 495 – 504.
7. Epstain J., Morris C.F., Huber K.C. Instrumental texture of white salted noodles prepared from recombinant inbred lines of wheat differing in the three granule bound starch synthase (*waxy*) genes // J. Cereal Sci. – 2002. – V. 35. – P. 51 – 63.
8. Graybosh R.A. Waxy wheats: origin proprieties and prospects // Trends Foods Sci. Technol. – 1998. – V. 9. – P. 135 – 142.
9. Guzman C., Caballero L., Alvarez J.B. Molecular characterization of the *Wx-B1* allelic variants identified in cultivated emmer wheat and comparison with those of durum wheat // Mol. Breeding. – 2010. – V. 28 – P. 403 – 411.
10. James M., Deneyer K., Myers A. Starch endosperm synthesis in the cereal endosperm // Curr. Opin. Plant Biol. – 2003. – V. 6. – P. 215 – 222.
11. McLaughlan A., Ogbonnaya F.C., Hollingsworth B. Development of robust PCR-based DNA markers for each homoeo-allele of granule-bound starch synthase and application in wheat breeding programs // Aust.J.Agric.Res. – 2001. – V. 52. – P. 1409 – 1416.

12. Nakamura T., Vrinten P., Saito M., et al. Rapid classification of partial waxy wheats using PCR-based markers // Genome. – 2002. – V. 45. – P. 1150 – 1156.
13. Nakamura T., Yamamori M., Hidaka S., Hoshino T. Expression of HMW Wx protein in Japanese common wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars // Jpn. J. Breed. – 1992. – V. 42. – P. 681 – 685.
14. Nakamura T., Yamamori M., Hirano H. et al. Production of waxy (amylase-free) wheat // Mol. Gen. Genet. – 1995. – V. 248. – P. 253 – 259.
15. Shure M., Wessler S., Fedorof N. Molecular identification and isolation of *waxy* locus in maize // Cell. – 1983. – V. 35. – P. 225 – 233.
16. Vanzetti L.S., Pfluger L.A., Rodriguez-Quijano M. et al. Genetic variability for *waxy* genes in Argentinean bread wheat germplaps // Electronic J. Biotechnol. – 2009. – V. 12. – P. 1 – 9.
17. Yamamori M., Nakamura T., Endo T.R., Nagamine T. Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat // Theor. Appl. Genet. – 1994. – V. 89. – P. 179 – 184.