

УДК 633.11:575.1

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ *Wx* В КОЛЛЕКЦИИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ КРАСНОДАРСКОГО НИИСХ им. П.П. ЛУКЪЯНЕНКО

© 2012 г. М.В. Климушина¹, Н.И. Гладких¹, М.Г. Дивашук¹,
Л.А. Беспалова², А.В. Васильев², Г.И. Карлов¹

¹ РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева, Центр молекулярной биотехнологии, Москва, Россия,
e-mail: mklimushina@gmail.com;

² ГНУ Краснодарский НИИСХ им. П.П. Лукьяненко РАСХН, Краснодар, Россия

Поступила в редакцию 14 ноября 2011 г. Принята к публикации 26 декабря 2011 г.

В работе представлены данные по изучению аллелей генов *Wx* коллекции из 99 сортов и линий мягкой пшеницы селекции КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко. С помощью двух молекулярных маркеров к гену *Wx-A1* было выявлено, что сорта Старшина и Сила несут в своем геноме нуль-аллели по данному гену. На основании данных по амплификации четырех различных молекулярных маркеров установлено, что сорта Нота и Ласточка несут в своем геноме аллель *Wx-B1e*. Сорт, несущих нуль-аллели гена *Wx-B1*, обнаружено не было. По гену *Wx-D1* были выявлены только аллели дикого типа.

Ключевые слова: мягкая пшеница, молекулярные маркеры, гены *Wx*.

Введение

Основная часть питательных веществ мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) содержится в запасающем органе зерновки – эндосперме, основным компонентом которого является крахмал. Крахмал накапливается в виде гранул, которые состоят из полисахаридов двух типов – разветвленного амилопектина и линейной амилозы. Содержание амилозы составляет 20–25 % массы крахмала, а амилопектина – 70–75 % (James *et al.*, 2003). Изменение содержания амилозы оказывает значительное влияние на технологические свойства крахмала и муки пшеницы. Ключевым ферментом в синтезе амилозы является гранул-связанная синтаза крахмала (GBSSI), также известная как белок *Waxy* (Shure *et al.*, 1983). В геноме мягкой пшеницы три гомеологичных гена кодируют изоформы GBSSI фермента. Данные гены, получившие название *Wx*, расположены в хромосомах 7AS (*Wx-A1*), 4AL (*Wx-B1*) и 7DS (*Wx-D1*) (Chao *et al.*, 1989). У кукурузы, ячменя, риса, овса и затем у пшеницы были обнаружены мутанты по генам *Wx*, у которых наблюдалось снижение

содержания или полное отсутствие амилозы (Graybosh, 1998). Установлено, что у пшеницы каждый из генов *Wx* имеет несколько аллелей: активный аллель (*a*), кодирующий синтез белка *Waxy*; неактивный (*v* – нуль-аллель), при котором синтез функционального белка *Waxy* отсутствует; функциональные аллели с различной ферментативной активностью белка *Waxy*. Мягкая пшеница с одним или двумя нефункциональными генами (нуль-аллелями) синтезирует крахмал с пониженным уровнем амилозы, обладающий рядом характеристик, необходимых для производства высококачественной лапши, особенно для стран Юго-Восточной Азии, где этот продукт является традиционным (Epstein *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003). Кроме того, было выявлено определенное положительное влияние наличия нуль-аллелей на хлебопекарные и мукомольные качества пшеницы, так как крахмал с пониженным содержанием амилозы более чувствителен к механическому воздействию. При помоле происходит разрушение гранул крахмала, что увеличивает площадь поверхности и приводит к повышению водопоглощательной способности

и амилолитической активности муки, создавая тем самым благоприятные условия для высокой активности дрожжей в тесте (Graybosh, 1998). Есть данные о том, что пониженное содержание амилозы положительно сказывается на увеличении срока хранения хлебобулочных изделий, так как именно амилоза способствует озерствению хлеба (Nakamura *et al.*, 1995, 2002). Помимо нуль-аллелей, по всем локусам генов был выявлен также ряд других функциональных аллельных вариантов (Rodríguez-Quijano *et al.*, 1998; Takeshi, 2006; Vanzetti *et al.*, 2009; Guzmán *et al.*, 2010). Влияние данных аллелей на содержание амилозы в крахмале пшеницы до конца еще не изучено. В коллекциях сортов пшеницы из разных стран были найдены различные комбинации активных и неактивных аллелей *Wx*. Выявлено, что более 15 % сортов китайской, турецкой, аргентинской и корейской селекции несут нуль-аллель по гену *Wx-A1* (Yamamoto *et al.*, 1994; Vanzetti *et al.*, 2009). Около 20 % сортов с нуль-аллелем по гену *Wx-B1* наблюдается среди коллекций австралийской, индийской и японской селекции (Nakamura *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1994). Единственный в мире сорт, содержащий нуль-аллель по гену *Wx-D1*, был найден в Китае (Nakamura *et al.*, 1995). Для оценки аллельного состояния генов *Wx* использовались как гель-электрофорез белка, одномерный или двухмерный (Rodríguez-Quijano *et al.*, 1998; Demeke *et al.*, 2000; Urbano *et al.*, 2002), так и молекулярное маркирование с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Briney *et al.*, 1998; Boggini *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2002). В последнее время наиболее широкое распространение получили именно методы молекулярного маркирования, которые используются для идентификации аллельного состояния генов *Wx* и в MAS-селекции (селекции с помощью молекулярных маркеров).

Целью нашей работы была характеристика аллельного состояния генов *Wx* коллекции мягкой озимой пшеницы КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко с помощью молекулярных маркеров. Скрининг данной коллекции позволит получить первичную информацию, которая может быть использована для селекции сортов озимой пшеницы с модифицированным составом крахмала с использованием молекулярных маркеров.

Материалы и методы

Растительный материал и выделение ДНК. В исследованиях использовали коллекцию из 99 краснозерных сортов мягкой пшеницы селекции Краснодарского НИИСХ им. П.П. Лукьяненко. ДНК выделяли из проростков по методу Bernatzky и Tanksley (1986).

Праймеры и условия ПЦР. Используемые праймеры и условия проведения полимеразной цепной реакции указаны в таблице. ПЦР проводили в Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, США) при условиях, рекомендуемых авторами праймеров. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: 1 × буфер для *Taq*-ДНК-полимеразы (Силекс, Москва), 1,0 U *Taq*-ДНК-полимеразы (Силекс, Москва), 200 μM каждого dNTP (Promega), 0,2 μM каждого праймера и 100–150 нг ДНК-матрицы. В реакции с праймерами 4F, 4R концентрация хлорида магния составляла 3,0 мМ, в остальных случаях 2,5 мМ. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2 %-м агарозном геле в трис-боратном буферном растворе (ТБЕ). В качестве маркера молекулярного веса использовали «100 bp Ladder» («Fermentas», Литва).

Результаты

Ген *Wx-A1*. Скрининг коллекции на аллельное состояние гена *Wx-A1* проводили с помощью молекулярного маркера, разработанного Nakamura с соавт. (2002). При использовании данного молекулярного маркера у аллеля дикого типа *Wx-A1a* амплифицируются фрагменты размером 389 п.н., а у нуль-аллеля – 370 п.н. (рис. 1, а).

Для верификации полученных результатов на образцах, у которых продукты амплификации отличались от дикого типа, мы использовали молекулярный маркер, модифицированный Vanzetti с соавт. (2009). После проведения ПЦР с данным молекулярным маркером размер ампликонов у *Wx-A1a* и нуль-аллеля различался незначительно, поэтому для лучшей визуализации после амплификации проводился гидролиз ПЦР-продукта с эндонуклеазой рестрикции *HindIII* (рис. 1, б).

Таким образом, с помощью двух молекулярных маркеров к гену *Wx-A1* было выявлено, что из 99 проанализированных сортов только

Таблица

Используемые праймеры и условия проведения ПЦР

Гены <i>Wx</i>	Праймеры	Условия ПЦР
<i>Wx-A1</i>	AFC и AR2 (Nakamura <i>et al.</i> , 2002)	95 °С – 5 мин; 32 цикла: 95 °С – 30 с, 65 °С – 30 с, 72 °С – 2 мин; 1 цикл: 72 °С – 7 мин
	Wx-A1b-F-MH* Wx-A1b-R-MH* (Vanzetti <i>et al.</i> , 2009)	94 °С – 3 мин; 40 циклов: 94 °С – 45 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 60 с; 1 цикл: 72 °С – 7 мин
<i>Wx-B1</i>	BDFL и BRD (Nakamura <i>et al.</i> , 2002)	95 °С – 5 мин; 32 цикла: 95 °С – 30 с, 65 °С – 30 с, 72 °С – 2 мин; 1 цикл: 72 °С – 7 мин
	4F и 4R (McLauchlan <i>et al.</i> , 2001)	94 °С – 3 мин; 30 циклов: 94 °С – 60 с, 58 °С – 60 с, 72 °С – 30 с; 1 цикл: 72 °С – 7 мин
	BDFL и BRC1 (Saito <i>et al.</i> , 2009)	95 °С – 5 мин; 32 цикла: 95 °С – 30 с, 65 °С – 30 с, 72 °С – 2 мин; 1 цикл: 72 °С – 7 мин
	Wx-B1L и Wx-B1R (Vanzetti <i>et al.</i> , 2009)	95 °С – 5 мин; 32 цикла: 95 °С – 30 с, 65 °С – 30 с, 72 °С – 2 мин; 1 цикл: 72 °С – 7 мин
<i>Wx-D1</i>	Wx-D1-2-F, Wx-D1-2-R (Shariflou <i>et al.</i> , 2001)	95 °С – 3 мин; 40 циклов: 94 °С – 30 с, 55 °С – 45 с, 72 °С – 1 мин; 1 цикл: 72 °С – 7 мин
	Wx-D1-1-F, Wx-D1-1-R (Vrinten <i>et al.</i> , 1999)	95 °С – 3 мин; 40 циклов: 94 °С – 30 с, 55 °С – 45 с, 72 °С – 1 мин; 1 цикл: 72 °С – 7 мин
	BDFL и DRSL (Nakamura <i>et al.</i> , 2002)	94 °С – 5 мин; 32 цикла: 94 °С – 30 с, 58 °С – 30 с, 72 °С – 120 с; 1 цикл: 72 °С – 7 мин

* После амплификации проводился гидролиз ПЦР-продукта эндонуклеазой рестрикции *HindIII* («Fermentas», Литва) при 37 °С в течение 1 часа. Фрагменты ДНК, полученные в результате гидролиза, разделяли в агарозном геле.

два, Старшина и Сила, имеют нуль-аллели по данному гену. Все остальные сорта коллекции несли аллели дикого типа гена *Wx-A1*.

Ген *Wx-B1*. Для анализа локуса *Wx-B1* необходимо использовать сочетание молекулярных маркеров, что позволяет выявить не только нуль-аллели, но и функциональные аллельные варианты, отличные от аллеля дикого типа, так как молекулярные маркеры, разработанные McLauchlan с соавт. (2001) и Nakamura с соавт. (2002), не позволяют различить нуль-аллель *Wx-B1b* и функциональный аллель *Wx-B1e* и дают ложноположительные результаты присутствия нуль-аллеля (рис. 2, а, б) (Vanzetti *et al.*, 2009; Дивашук и др., 2011).

Saito с соавт. (2009) разработали кодоминантный маркер нуль-аллеля *Wx-B1*. При его использовании в ПЦР амплифицируются фрагменты длиной 668 п.н. при наличии нуль-аллеля и 778 п.н. при наличии аллеля дикого типа в локусе *Wx-B1*. Размер продукта амплификации у образца, несущего аллель *Wx-B1e*, составляет 804 п.н. (Дивашук и др., 2011) (рис. 2, в). Кроме того, Vanzetti с соавт. (2009) была пред-

ложена пара праймеров *Wx-B1L/Wx-B1R* для идентификации трех аллелей: *Wx-B1a*, *Wx-B1b* и *Wx-B1e*.

На основании амплификации с использованием четырех различных систем молекулярных маркеров нами было установлено, что только 2 сорта из 99 сортов Краснодарского НИИСХ им. П.П. Лукьяненко – Нота и Ласточка – несут в своем геноме аллель *Wx-B1e* (рис. 2). Сорт, несущих нуль-аллели в локусе *Wx-B1*, выявлено не было.

Ген *Wx-D1*. Для определения аллельного состояния гена *Wx-D1* использовали три молекулярных маркера (табл.). Было показано, что все сорта исследуемой коллекции несли аллели *Wx-D1a* – аллели дикого типа.

Обсуждение

При молекулярно-генетическом анализе 99 сортов из коллекции мягких пшениц селекции КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко, показано, что два сорта имеют аллели *Wx-B1e* гена *Wx-B1* и два сорта несут нуль-аллели *Wx-A1b* гена *Wx-A1*.

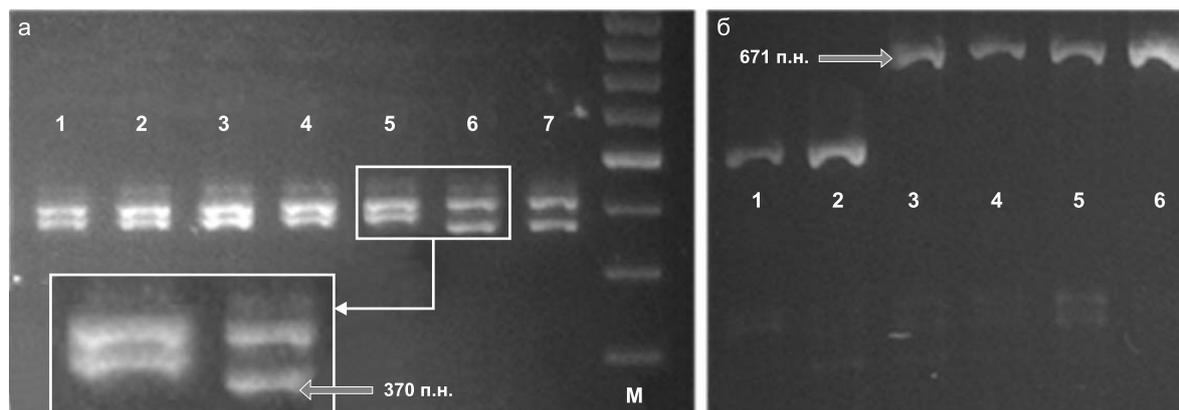


Рис. 1. Электрофореграмма: а – продуктов ПЦР, полученных с праймерами AFC и AR2 (1 – сорт Безостая 1, 2 – сорт Кособрюховка, 3 – сорт Васса, 4 – сорт Фишт, 5 – сорт Леда, 6 – сорт Сила, 7 – сорт Старшина; М – маркер длины фрагментов ДНК); б – ампликонов, полученных с праймерами Wx-A1b-F-MH и Wx-A1b-R-MH и обработанных эндонуклеазой рестрикции *Hind*III (1, 2 – сорт Безостая 1; 3, 4 – сорт Сила, 5, 6 – сорт Старшина). Серая стрелка – фрагменты, соответствующие наличию аллеля *Wx-A1b*.

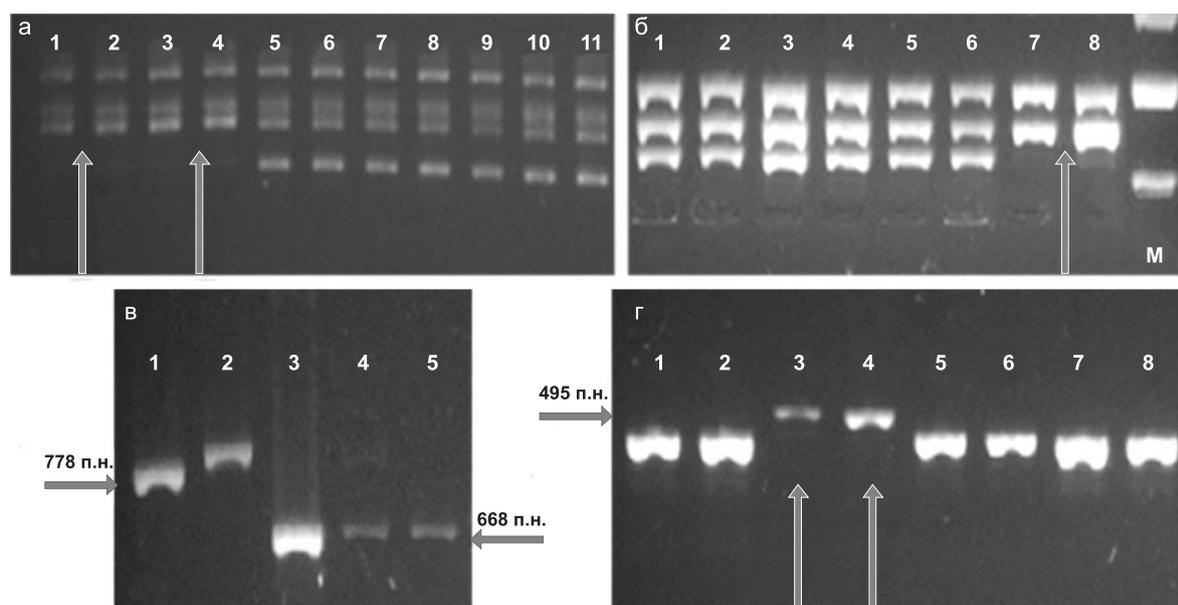


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с праймерами 4F и 4R.

а – 4F и 4R (1, 2 – сорт Ласточка; 3, 4 – сорт Нота; 5, 6 – сорт Безостая 1; 7, 8 – сорт Кособрюховка; 9, 10 – сорт Васса; 11 – сорт Фишт); б – BDFL и BRD (1 – сорт Безостая 1; 2 – сорт Кособрюховка; 3 – сорт Васса; 4 – сорт Фишт; 5 – сорт Сила; 6 – сорт Старшина; 7 – сорт Ласточка; 8 – сорт Нота; М – маркер длины фрагментов ДНК); в – BDFL и BRC1 (1 – сорт Безостая 1; 2 – сорт Ласточка; 3–5 – контрольный образец, несущий нуль-аллель *Wx-B1b* Ноккай 252); г – *Wx-B1L* и *Wx-B1R* (1 – сорт Безостая 1; 2 – сорт Кособрюховка; 3 – сорт Ласточка; 4 – сорт Нота; 5 – сорт Сила; 6 – сорт Старшина; 7 – сорт Васса; 8 – сорт Фишт). Серая стрелка – тип амплификации, соответствующий аллелям, отличным от дикого типа.

В то же время в коллекциях сортов азиатских стран обнаруживалось до двадцати процентов сортов, несущих нуль-аллели по генам *Wx-A1* и *Wx-B1* (Nakamura *et al.*, 1992; Yamamori *et*

al., 1994). Полученные нами результаты можно объяснить тем, что пониженное содержание амилозы, которое обуславливается наличием нуль-аллелей генов *Wx* в геноме, оказывает вы-

раженное положительное влияние на качество лапши удон, основного продукта, на производство которого используется мягкая пшеница в азиатских странах. А основное использование мягкой пшеницы в России – это, прежде всего, хлебопечение. В этом случае выраженного положительного влияния на хлебопекарные качества пшеницы наличие только одного нуль-аллеля не оказывает и, соответственно, давление искусственного отбора в этом направлении отсутствует. Также следует учитывать, что основные источники нуль-аллелей – это белозерные сорта азиатского происхождения. В России селекция пшеницы традиционно ориентируется на красnozерные сорта ввиду ряда их преимуществ. Поэтому и вероятность нейтрального привнесения нуль-аллеля в результате селекционных скрещиваний была крайне мала. В сорт Ласточка аллель *Wx-B1e*, вероятнее всего, пришел из родительской формы аргентинской яровой пшеницы (<http://genbank.vurv.cz>). Аллельный вариант *Wx-B1e* встречается среди сортов аргентинской селекции (Vanzetti *et al.*, 2009). В случае сорта Нота таких очевидных путей привнесения редкого для данного региона аллеля не прослеживается (<http://genbank.vurv.cz>). В сорт Старшина нуль-аллель *Wx-A1b*, вероятнее всего, был привнесен через родительский сорт Colt (<http://genbank.vurv.cz>).

Полученная в данной работе информация об аллельном состоянии по генам *Wx* в сортах КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко позволит наметить отправные точки нового направления селекции мягкой озимой пшеницы – селекции сортов с модифицированным составом крахмала с использованием в качестве основы высокоурожайных и качественных сортов Старшина и Сила и привлечением источников нуль-аллелей по другим генам *Wx*.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 гг.», государственный контракт № 16.518.11.7089 от 29 августа 2011 г.

Литература

- Дивашук М.Г., Климушина М.В., Карлов Г.И. Молекулярно-генетическая характеристика аллеля *Wx-B1e* мягкой пшеницы и применимость ДНК маркеров для его идентификации // Генетика. 2011. Т. 47. № 12. С. 1611–1615.
- Bernatzky R., Tanksley S.D. Toward a saturated linkage map in tomato based on isozyme and random cDNA sequences // Genetics. 1986. V. 112. P. 887–898.
- Boggini G., Cattaneo M., Paganoni C., Vaccino P. Genetic variation for waxy proteins and starch properties in Italian wheat germplasm // Euphytica. 2001. V. 119. P. 113–116.
- Briney A., Wilson R., Potter R.H. *et al.* A PCR-based marker for selection of starch and potential noodle quality in wheat // Mol. Breeding. 1998. V. 4. P. 427–433.
- Chao S., Sharp P., Worland E. *et al.* RELP-based genetic map of wheat homeologous group 7 chromosomes // Teor. Appl. Genet. 1989. V. 78. P. 495–504.
- Demeke T., Hucl P., Chibbar R.N. Frequent absence of GBSSI isoprotein in endosperm starch of Canadian wheat cultivars // Starch. 2000. V. 52. P. 349–352.
- Epstein 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.
- Graybosh R.A. Waxy wheats: origin, properties and prospects // Trends Food Sci. Technol. 1998. V. 9. P. 135–142.
- Guzmán 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.
- James M., Denyer K., Myers A. Starch synthesis in the cereal endosperm // Curr. Opin. Plant Biol. 2003. V. 6. P. 215–222.
- Liu J., He Z., Yang J. *et al.* Variation of starch property and its relationship with dry white Chinese noodle quality in common wheat // Agric. Sci. in China. 2003. V. 36. P. 1–7.
- McLauchlan A., Ogonnaya F.C., Hollingsworth B. *et al.* Development of robust PCR-based DNA markers for each homeoallele of granule-bound starch synthase and their application in wheat breeding programs // Aust. J. Agric. Res. 2001. V. 52. P. 1409–1416.
- 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.
- Nakamura T., Yamamori M., Hirano H. *et al.* Production of waxy (amylase-free) wheat // Mol. Gen. Genet. 1995. V. 248. P. 253–259.
- Nakamura T., Vrinten P., Saito M., Konda M. Rapid classification of partial waxy wheats using PCR-based markers // Genome. 2002. V. 45. P. 1150–1156.
- Rodríguez-Quijano M., Nieto-Taladriz M.T., Carrillo J.M. Polymorphism of waxy proteins in Iberian hexaploid wheats // Plant Breeding. 1998. V. 117. P. 341–344.
- Saito M., Vrinten P., Ishikawa G. *et al.* A novel codominant marker for selection of the null *Wx-B1* allele in wheat breeding programs // Mol. Breeding. 2009. V. 23. P. 209–217.
- Shariflou M.R., Hassani M.E., Sharp P.J. A PCR-based DNA marker for detection of mutant and normal alleles of the

- Wx-D1* gene of wheat // Plant Breeding. 2001. V. 120. No 2. P. 121–124.
- Shure M., Wessler S., Fedoroff N. Molecular identification and isolation of waxy locus in maize // Cell. 1983. V. 35. P. 225–233.
- Takeshi Y. Waxy and low-amylose mutants of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and their starch, flour and grain properties // JARQ 40. 2006. V. 40. P. 327–331.
- Urbano M., Margiotta B., Colaprico G., Lafiandra D. Waxy proteins in diploid, tetraploid and hexaploid wheats // Plant Breeding. 2002. V. 121. P. 465–469.
- Vanzetti L.S., Pflüger L.A., Rodríguez-Quijano M. *et al.* Genetic variability for *waxy* genes in Argentinean bread wheat germplasm // Electronic J. Biotechnol. 2009. V. 12. P. 1–9.
- Vrinten P., Nakamura T., Yamamori M. Molecular characterization of waxy mutations in wheat // Mol. General Genet. 1999. V. 261. P. 463–471.
- 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. <http://genbank.vurv.cz>

**DISTRIBUTION OF ALLELIC VARIANTS OF *Wx* GENES
IN THE COMMON WHEAT COLLECTION
MADE AT THE KRASNODAR LUKYANENKO RESEARCH INSTITUTE
OF AGRICULTURE**

M.V. Klimushina¹, N.I. Gladkih¹, M.G. Divashuk¹, L.A. Bespalova², A.V. Vasilyev², G.I. Karlov¹

¹ Russian State Agrarian University–Moscow Timiryazev Agricultural Academy,
Center for Molecular Biotechnology, Moscow, Russia, e-mail: mklimushina@gmail.com;

² Department of Wheat and Triticale Breeding,
Krasnodar Lukyanenko Research Institute of Agriculture, Krasnodar, Russia

Summary

Molecular marker-based identification of allelic variants of *Wx* genes has been performed in the collection of 99 common wheat cultivars and breeding lines developed at the Krasnodar Lukyanenko Research Institute of Agriculture.

Use of two molecular markers to the *Wx-A1* gene shows that cultivars ‘Starshina’ and ‘Sila’ carry null alleles of *Wx-A1*. Studies with four systems of molecular markers indicate that cultivars ‘Nota’ and ‘Lastochka’ possess the *Wx-B1e* allele. No cultivars with null-alleles of *Wx-B1* have been found. Only wild-type alleles are present in the *Wx-D1* locus.

Key words: common wheat, molecular markers, *Wx* genes.