

ВЫЯВЛЕНИЕ НУЛЕВОГО *Wx-B1b*-АЛЛЕЛЯ *Waxy*-ГЕНА У ГЕНОТИПОВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ

Абдулина И.Р.^{1,2}, Вафин Р.Р.¹, Тюлькин С.В.², Зайнуллин Л.И.¹, Алимова Ф.К.¹, Асхадуллин Д.Ф.³, Асхадуллин Д.Ф.³, Василова Н.З.³

¹ФГАО ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия (420008, Казань, ул. Кремлевская, 18), e-mail: vafin-ramil@mail.ru

²ФГБУ «Татарская межрегиональная ветеринарная лаборатория», Казань, Россия, (420087, Казань, ул. Родины, 25а)

³ГНУ «Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии», Казань, Россия (420059, Казань, Оренбургский тракт, 48)

Проведена апробация общеизвестного и разработанного нами способов проведения ПЦР для идентификации аллельных вариантов *Wx-B1*-локуса *Waxy*-гена пшеницы на 70 образцах яровой пшеницы селекции ТатНИИСХ. Отличительной особенностью разработанного способа проведения ПЦР от прототипа является использование вместо праймера *Wx-B1F* олигонуклеотида 4F-с, генерирующего, в сравнении с прототипом, редуцированные на 61 bp ПЦР-продукты длиной 402 bp (*Wx-B1a*-аллель) и 436 bp (*Wx-B1e*-аллель), с обеспечением более лучшего разделения амплифицированных фрагментов в агарозном геле и, соответственно, повышением точности интерпретации результатов генотипирования. Разработанные и оптимизированные нами способы проведения ПЦР для идентификации аллельных вариантов *Wx-B1*-локуса *Waxy*-гена пшеницы, апробированные на образцах яровой пшеницы селекции ТатНИИСХ, позволили провести корректную идентификацию исследуемых генотипов *Triticum aestivum* с выявлением двух хозяйственно ценных линий, несущих в своих геномах нулевой *Wx-B1b*-аллель.

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

DETECTION OF NULL *Wx-B1b*-ALLELE OF THE *WAXY*-GENE IN SPRING WHEAT GENOTYPES OF RUSSIAN BREEDING

Abdulina I.R.^{1,2}, Vafin R.R.¹, Tyulkin S.V.², Zaynullin L.I.¹, Alimova F.K.¹, Askhadullin D.F.³, Askhadullin D.F.³, Vasilova N.Z.³

¹«Kazan (Volga region) federal university», Kazan, Russia (420008, Kazan, Kremlyovskaya St, 18), e-mail: vafin-ramil@mail.ru

²«Tatar trans-regional veterinarian laboratory», Kazan, Russia (420087, Kazan, Rodiny St, 25a)

³«Tatar research institute of agriculture of RAAS», Kazan, Russia (420059, Kazan, Orenburgsky trakt, 48)

The approbation of the well-known and developed by us PCR methods for the identification of allele variants of *Wx-B1*-locus of wheat *Waxy*-gene was performed on 70 spring wheat samples from breeding of the Tatar research institute of agriculture/. A distinctive feature of the developed PCR method from the prototype is the use instead of primer *Wx-B1F* an oligonucleotide 4F-c, which generates, compared to the prototype, reduced by 61 bp PCR products in length for 402 bp (*Wx-B1a*-allele) and 436 bp (*Wx-B1e*-allele), ensuring a better separation of amplified fragments in agarose gel, and, accordingly, increase the accuracy of interpretation of the results of genotyping. Designed and optimized by us PCR methods for the identification of allele variants of *Wx-B1*-locus of wheat *Waxy*-gene and approbated on spring wheat samples from breeding of the Tatar research institute of agriculture allowed to perform a correct identification of the studied *Triticum aestivum* genotypes with identification two economically valuable lines that carry in their genomes null *Wx-B1b*-allele.

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

Введение

Знания об ассоциации полиморфизма аллельных вариантов *Waxy*-генов пшеницы с мукомольно-хлебопекарными и технологическими свойствами зерна имеют большую практическую значимость и, в совокупности с молекулярными методами геноидентификации, используются в маркер-вспомогательной селекции при создании сортов пшеницы с высокими качественными показателями зерна [1-5].

Известно, что нефункциональные нуль-аллели локусов *Wx-A1*, *Wx-B1* и *Wx-D1* *Waxy*-генов пшеницы имеют прямое влияние на образование крахмала амилопектинового типа, где наиболее существенное снижение содержания амилозы оказывает нулевой аллель *Wx-B1*-локуса – *Wx-B1b*, идентификация которого имеет диагностическую ценность [1-5].

Целью настоящей работы являлась апробация способов проведения ПЦР для идентификации аллельных вариантов *Wx-B1*-локуса *Waxy*-гена пшеницы на образцах яровой пшеницы отечественной селекции.

Материалы и методы исследования

Апробация общеизвестного [4] и разработанного нами способов проведения ПЦР для идентификации аллельных вариантов *Wx-B1*-локуса *Waxy*-гена пшеницы проведена на 70 образцах яровой пшеницы селекции ТатНИИСХ.

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 термоциклере «Терцик» («ДНК-технология», Россия) с использованием олигонуклеотидных праймеров, перечень которых представлен в табл. 1.

Таблица 1. Апробированные способы проведения ПЦР (№1-4) для идентификации аллельных вариантов *Wx-B1*-локуса *Waxy*-гена пшеницы

| № | Нуклеотидные последовательности праймеров | Режимы ПЦР-амплификации |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | <i>Wx-B1L</i> : 5'-CGCAGGGGAAGACGTGGT-3' <i>Wx-B1R</i> : 5'-CGTTGACGATGCCGGTGATG-3' | ×1: 94 °С – 4 мин. ×40: 94 °С – 45 сек, 65 °С – 40 сек, 72 °С – 50 сек. ×1: 72 °С – 7 мин. |
| 2 | <i>Wx-B1L</i> : 5'-CGCAGGGGAAGACGTGGT-3' <i>Wx-B2R</i> : 5'-CGTTGACGATGCCGGTGTTG-3' | ×1: 94 °С – 4 мин. ×40: 94 °С – 45 сек, 65 °С – 40 сек, 72 °С – 50 сек. ×1: 72 °С – 7 мин. |
| 3 | <i>4F-c</i> : 5'-CCCCAAGAGCAACTACCAGT-3' <i>Wx-B1R</i> : 5'-CGTTGACGATGCCGGTGATG-3' | ×1: 94 °С – 4 мин. ×40: 94 °С – 15 сек, 65 °С – 15 сек, 72 °С – 15 сек. ×1: 72 °С – 7 мин. |
| 4 | <i>4F-c</i> : 5'-CCCCAAGAGCAACTACCAGT-3' <i>Wx-B2R</i> : 5'-CGTTGACGATGCCGGTGTTG-3' | ×1: 94 °С – 4 мин. ×40: 94 °С – 15 сек, 65 °С – 15 сек, 72 °С – 15 сек. ×1: 72 °С – 7 мин. |

Детекция результатов ПЦР-анализа проведена методом горизонтального электрофореза в 2%-ном агарозном геле в буфере TBE (рН 8,0), содержащем этидий бромид с последующей визуализацией результатов реакции в ультрафиолетовом трансиллюминаторе ($\lambda=310$ нм).

Результаты исследования и их обсуждение

В процессе верификация способов проведения ПЦР для идентификации аллельных вариантов *Wx-B1*-локуса *Waxy*-гена пшеницы было проведено *in silico* моделирование генерируемых ПЦР-профилей, результаты которого представлены на рис. 1.

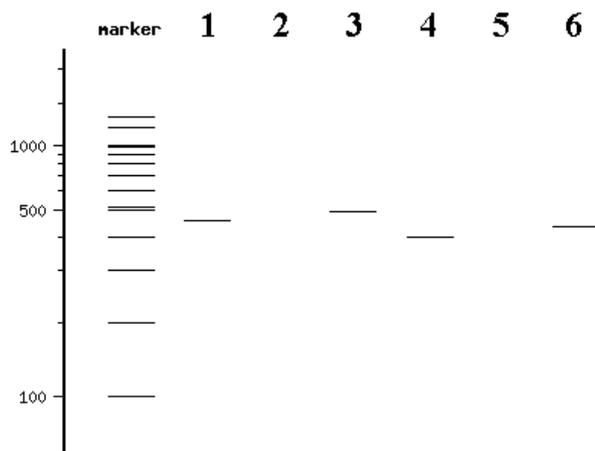


Рис. 1. Моделирование ПЦР-профилей аллельных вариантов *Wx-B1*-локуса *Waxy*-гена пшеницы

(праймеры *Wx-B1L* + *Wx-B1R* [*Wx-B2R*] и 4F-с + *Wx-B1R* [*Wx-B2R*])

Обозначения: 1-3) Праймеры *Wx-B1L* + *Wx-B1R* [*Wx-B2R*]: 1) ПЦР-профиль *Wx-B1a*-аллеля (461 bp); 2) ПЦР-профиль *Wx-B1b*-аллеля (нет); 3) ПЦР-профиль *Wx-B1e*-аллеля (495 bp). 4-6) Праймеры 4F-с + *Wx-B1R* [*Wx-B2R*]: 4) ПЦР-профиль *Wx-B1a*-аллеля (402 bp). 5) ПЦР-профиль *Wx-B1b*-аллеля (нет). 6) ПЦР-профиль *Wx-B1e*-аллеля (436 bp).

При тестировании способа проведения ПЦР № 1 с праймерами *Wx-B1L* + *Wx-B1R* для идентификации аллельных вариантов *Wx-B1*-локуса *Waxy*-гена пшеницы наблюдалась амплификация неспецифичных ПЦР-продуктов, негативно влияющих на анализ полученных результатов реакции (рис. 2).

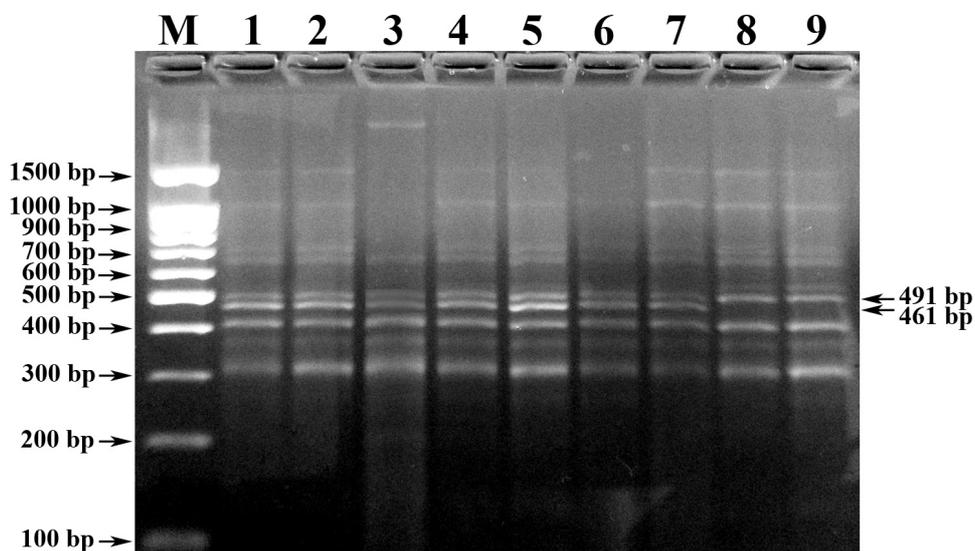


Рис. 2. Электрофореграмма результата ПЦР-идентификации генотипов яровой пшеницы селекции ТатНИИСХ по аллельным вариантам *Wx-B1*-локуса *Waxy*-гена

(праймеры *Wx-B1L* + *Wx-B1R*)

Обозначения: М) ДНК-маркеры 100 bp + 1,5 kb (СибЭнзим). 1-7) ПЦР-профиль *Wx-B1a*-аллеля. 8-9) ПЦР-профиль *Wx-B1b*-аллеля.

Наиболее проблемный артефакт, выявленный в ходе опытов – не свойственная заявленному способу генерация ПЦР-продукта локуса *Wx-A1*-аллеля длиной 491 bp (рис. 2), затрудняющего дискриминацию *Wx-B1e*-аллеля со схожим по длине размером (495 bp), что в

конечном счете не позволяет провести корректную идентификацию аллельных вариантов *Wx-B1*-локуса *Waxy*-гена пшеницы.

Причина неудовлетворительной работы данного способа проведения ПЦР была в конструктивной особенности аллельспецифичного праймера *Wx-B1R* без «mismatch-нуклеотида» в третьей позиции с 3'-конца олигонуклеотида.

Для повышения специфичности амплификационной реакции олигонуклеотидный праймер *Wx-B1R* был впоследствии нами реконструирован путем введения соответствующего некомплементарного «mismatch-нуклеотида» в третью позицию с 3'-конца олигонуклеотида, и переименован в аллельспецифичный праймер *Wx-B2R*, с дальнейшей проверкой его работоспособности в оптимизированном способе проведения ПЦР № 2.

В результате успешной апробации оптимизированного способа проведения ПЦР № 2 с праймерами *Wx-B1L* + *Wx-B2R* для идентификации аллельных вариантов *Wx-B1*-локуса *Waxy*-гена пшеницы на образцах яровой пшеницы селекции ТатНИИСХ, достоверно установлены генотипы *Triticum aestivum* с аллельными вариантами *Wx-B1a* и *Wx-B1b* (рис. 3); причем из 70 исследованных растений только 2 линии (Кк-8/06-6 и О-192/03-5) являлись носителями нулевого *Wx-B1b*-аллеля. (рис. 3, треки 8-9).

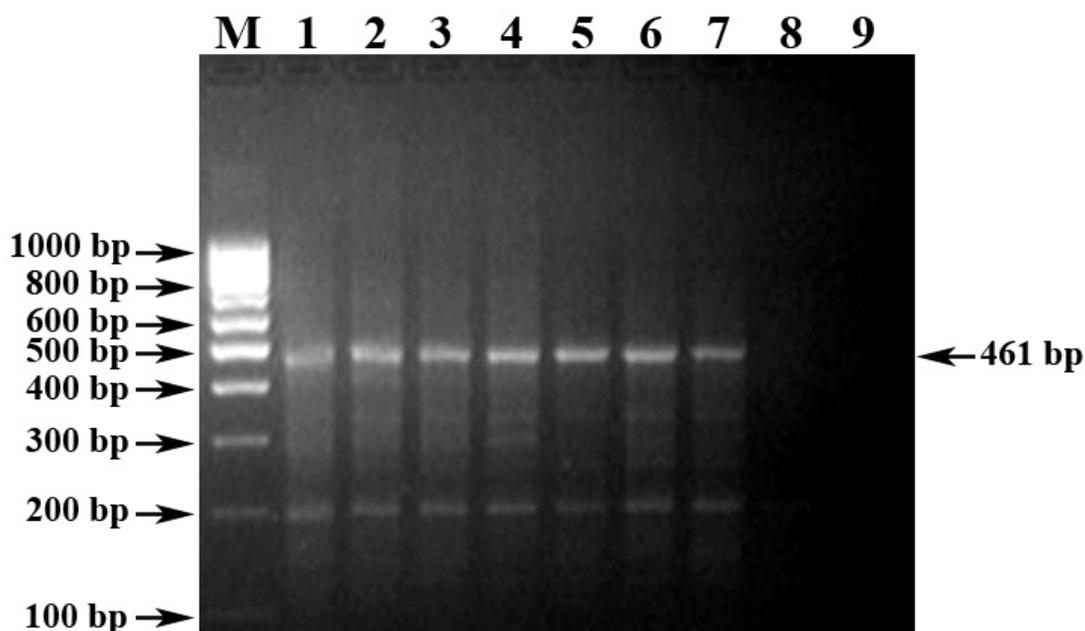


Рис. 3. Электрофореграмма результата ПЦР-идентификации генотипов яровой пшеницы селекции ТатНИИСХ по аллельным вариантам *Wx-B1*-локуса *Waxy*-гена (праймеры *Wx-B1L* + *Wx-B2R*)

Обозначения: М) ДНК-маркеры 100 bp (СибЭнзим). 1-7) ПЦР-профиль *Wx-B1a*-аллеля (461 bp). 8-9) ПЦР-профиль *Wx-B1b*-аллеля (нет).

При разработке способа проведения ПЦР для идентификации аллельных вариантов *Wx-B1*-локуса *Waxy*-гена пшеницы руководствовались принципом усовершенствования одноименного прототипа, результаты апробации которого в контексте оптимизации общеизвестного способа генотипирования были представлены выше.

Отличительной особенностью предложенного способа проведения ПЦР от ближайшего аналога является использование вместо праймера Wx-B1F олигонуклеотида 4F-с, генерирующего, в сравнении с прототипом, редуцированные на 61 bp ПЦР-продукты длиной 402 bp (*Wx-B1a*-аллель) и 436 bp (*Wx-B1e*-аллель), с обеспечением более лучшего разделения амплифицированных фрагментов в агарозном геле и соответственно повышением точности интерпретации результатов генотипирования.

При тестировании способа проведения ПЦР № 3 для идентификации аллельных вариантов *Wx-B1*-локуса *Waxy*-гена пшеницы с праймерами 4F-с + Wx-B1R наблюдалась амплификация неспецифичных ПЦР-продуктов, негативно влияющих на анализ полученных результатов реакции (рис. 4).

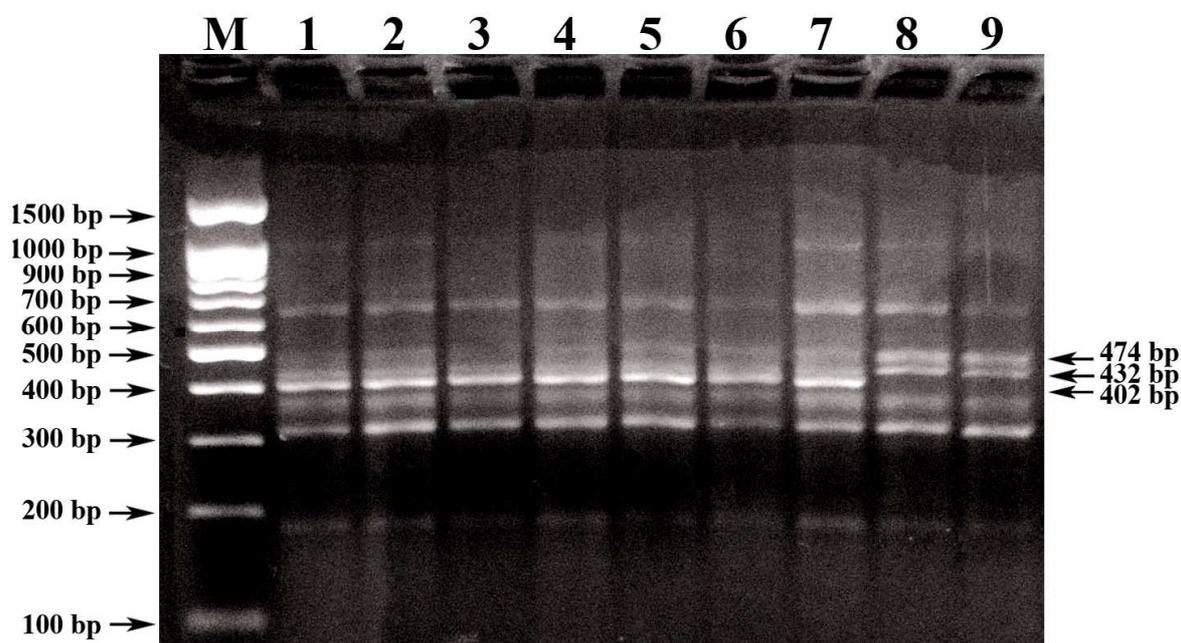


Рис. 4. Электрофореграмма результата ПЦР-идентификации генотипов яровой пшеницы селекции ТатНИИСХ по аллельным вариантам *Wx-B1*-локуса *Waxy*-гена (праймеры 4F-с + Wx-B1R)

Обозначения: М) ДНК-маркеры 100 bp + 1,5 kb (СибЭнзим). 1-7) ПЦР-профиль *Wx-B1a*-аллеля. 8-9) ПЦР-профиль *Wx-B1b*-аллеля.

Наиболее проблемным артефактом, выявленным в ходе постановки опытов, была не характерная для разработанного способа генерация ПЦР-продукта локуса *Wx-A1*-аллеля длиной 432 bp (рис. 4), затрудняющего дискриминацию *Wx-B1e*-аллеля со схожим по длине размером (436 bp), что мешает проведению корректной идентификации аллельных вариантов *Wx-B1*-локуса *Waxy*-гена пшеницы.

Причина неудовлетворительной работы данного способа проведения ПЦР, как, впрочем, и для ранее апробированного прототипа – способа проведения ПЦР № 1, заключалась в конструктивной особенности аллельспецифичного праймера Wx-B1R, не имеющего соответствующего «mismatch-нуклеотида».

При замене же стандартного праймера Wx-B1R на модифицированный нами праймер Wx-B2R с введенным «mismatch-нуклеотидом», в оптимизированной постановке разработанного способа проведения ПЦР № 4, удалось значительно повысить специфичность реакции (рис. 5) и обеспечить корректную идентификацию исследуемых генотипов пшеницы.

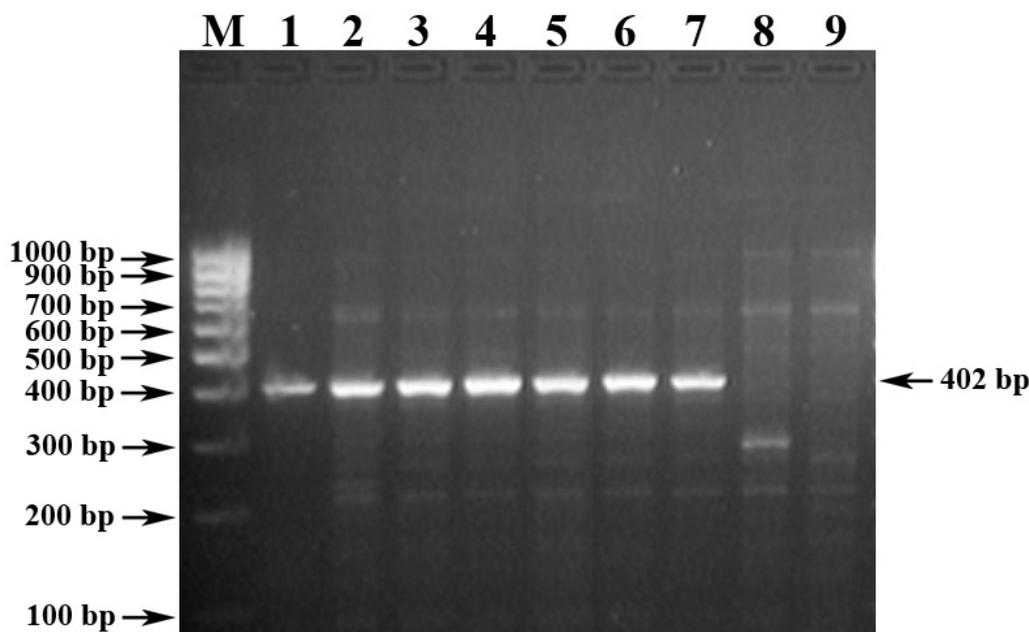


Рис. 5. Электрофореграмма результата ПЦР-идентификации генотипов яровой пшеницы селекции ТатНИИСХ по аллельным вариантам *Wx-B1*-локуса *Waxy*-гена (праймеры 4F-с + Wx-B2R)

Обозначения: М) ДНК-маркеры 100 bp (СибЭнзим). 1-7) ПЦР-профиль *Wx-B1a*-аллеля (402 bp). 8-9) ПЦР-профиль *Wx-B1b*-аллеля (нет).

Заключение

Разработанные и оптимизированные нами способы проведения ПЦР для идентификации аллельных вариантов *Wx-B1*-локуса *Waxy*-гена пшеницы, апробированные на образцах яровой пшеницы селекции ТатНИИСХ, позволили провести корректную идентификацию исследуемых генотипов *Triticum aestivum* с выявлением двух хозяйственно ценных линий (Кк-8/06-6 и О-192/03-5), несущих в своих геномах нулевой *Wx-B1b*-аллель.

Выражаем благодарность Вафину Ришаду Абдулфартовичу за оказанную финансовую поддержку.

Список литературы

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

2. 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.
3. McLauchlan A. Development of robust PCR-based DNA markers for each homeo-allele of granule-bound starch synthase and their application in wheat breeding programs / A. McLauchlan, F.C. Ogonnaya, 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. – V. 52. – N. 11-12. – P. 1409-1416.
4. 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. – V. 12. – N. 1. – P. 1-9.
5. 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. – V. 100. – P. 32-38.

Рецензенты:

Морозов Николай Васильевич, д.б.н., профессор кафедры биотехнологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, г. Казань.

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