

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПОДХОДЫ К ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОТИПОВ *TRITICUM AESTIVUM* L. ПО АЛЛЕЛЬНЫМ ВАРИАНТАМ *WAXY*-ГЕНОВ И НМВ СУБЪЕДИНИЦ ГЛЮТЕНИНОВ

Вафин Р.Р.^{1,2}, Абдулина И.Р.^{3,2}, Ржанова И.В.^{3,2}, Гараева А.Л.³, Тюлькин С.В.¹, Асхадуллин Д.Ф.², Асхадуллин Д.Ф.², Василова Н.З.², Зайнуллин Л.И.³, Алимова Ф.К.³, Шагалиева Г.И.⁴

¹ФГБУ «Татарская межрегиональная ветеринарная лаборатория», Казань, Россия, e-mail: vafin-ramil@mail.ru;

²ФГБНУ «Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства» РАН, Казань, Россия;

³ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия;

⁴ФГБОУ ВПО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», Казань, Россия

Основной целью исследования являлось изыскание молекулярных подходов к идентификации генотипов *Triticum aestivum* L. по аллельным вариантам *Waxy*-генов и НМВ субъединиц глютеинов на основе методов ПЦР, ПДРФ и секвенирования, для маркер-вспомогательной селекции сортов яровой пшеницы с высокими мукомольно-хлебопекарными и технологическими свойствами зерна. Разработанные и апробированные нами способы генотипирования *Triticum aestivum* L. по аллельным вариантам *Waxy*-генов и НМВ субъединиц глютеинов обеспечили проведение корректной молекулярно-генетической оценки исследуемых 70 образцов яровой пшеницы селекции ТатНИИСХ с установлением наиболее перспективных генотипов, рассматриваемых в качестве исходного материала для дальнейшей селекционной работы. На разработанный способ проведения ПЦР и ПЦР-ПДРФ для идентификации аллельных вариантов *waxy*-генов пшеницы получен патент Российской Федерации на изобретение (RU 2 528 748 C1).

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., ПЦР, ПДРФ, секвенирование, идентификация, аллель, *Waxy*, НМВ-GS.

MOLECULAR APPROACHES FOR IDENTIFICATION OF *TRITICUM AESTIVUM* L GENOTYPES BY ALLELIC VARIANTS OF *WAXY*-GENES AND HMW GLUTENIN SUBUNITS

Vafin R.R.^{1,2}, Abdulina I.R.^{3,2}, Rzhanova I.V.^{3,2}, Garaeva A.L.³, Tyulkin S.V.¹, Askhadullin D.F.², Askhadullin D.F.², Vasilova N.Z.², Zaynullin L.I.³, Alimova F.K.³, Shagalieva G.I.⁴

¹«Tatar trans-regional veterinarian laboratory», Kazan, Russia, vafin-ramil@mail.ru;

²«Tatar research institute of agriculture of RAS», Kazan, Russia;

³«Kazan (Volga region) federal university», Kazan, Russia;

⁴«Kazan National Research Technological University», Kazan, Russia

The main objective of the study is to explore the molecular approaches for identification of *Triticum aestivum* L. genotypes by allelic variants of *waxy*-genes and HMW glutenin subunits on the basis of PCR, RFLP and sequencing methods for marker-assisted selection of spring wheat varieties with high flour, baking and technological properties of grain. Methods for genotyping of *Triticum aestivum* L by allelic variants of *waxy*-genes and HMW glutenin subunits developed and tested by us ensure the fulfilment of correct molecular-genetic evaluation examined 70 samples of spring wheat breeding of the Tatar research institute of agriculture with the establishment of the most promising genotypes considered as a raw material for further wheat breeding. On the developed method of PCR and PCR-RFLP for identification of allelic variants of *waxy*-genes in-wheat received a patent for the invention of the Russian Federation (RU 2528748 C1).

Keywords: *Triticum aestivum* L., PCR, RFLP, sequencing, identification, allele, *Waxy*, HMW-GS.

Знания об ассоциации полиморфизма аллельных вариантов *Waxy*-генов и НМВ субъединиц глютеинов пшеницы с мукомольно-хлебопекарными и технологическими свойствами зерна имеют большую практическую ценность и, в совокупности с молекулярными методами геноидентификации, используются в маркер-вспомогательной

селекции при создании сортов пшеницы с высокими качественными показателями зерна [7, 2].

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 хозяйственно-ценный нулевой аллель *Wx-B1*-локуса – *Wx-B1b*, идентификация которого диагностически значима [9]. А с учетом положительного влияния аллельных вариантов *Glu-D1d* (5+10) и *Glu-A1b* (Ax2*) *HMW-GS* на повышение мукомольно-хлебопекарных качеств, конкурентного преимущества *Glu-A1b* над *Glu-A1a* (Ax1), и отрицательного влияния аллелей *Glu-D1a* (2+12) и *Glu-A1c* (Axnull), приводящих к снижению хлебопекарных свойств пшеницы, одной из наиболее хозяйственно-ценных комбинаций *HMW* субъединиц глютеинов, ассоциированных с высокими качествами зерна, является желаемая для селекции комбинация Ax2*/5+10 [4].

Развитие высокоточных подходов к оценке аллельного полиморфизма *Waxy*-генов и *HMW* субъединиц глютеинов пшеницы на основе молекулярно-генетических методов диагностики – востребованная для маркер-вспомогательной селекции область исследования, достоверность генотипирования в которой является фактором, предопределяющим эффективность селекционной работы.

Основной целью настоящей работы являлось изыскание молекулярных подходов к идентификации генотипов *Triticum aestivum* L. по аллельным вариантам *Waxy*-генов и *HMW* субъединиц глютеинов для маркер-вспомогательной селекции сортов яровой пшеницы с высокими мукомольно-хлебопекарными и технологическими свойствами зерна.

Материалы и методы исследования

Молекулярно-генетическим исследованиям было подвергнуто 70 образцов яровой пшеницы селекции ТатНИИСХ на предмет идентификации генотипов по аллельным вариантам *Waxy*-генов и *HMW* субъединиц глютеинов методами ПЦР, ПЦР-ПДРФ и прямого секвенирования амплифицированной ДНК.

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

Аmplификация геномной ДНК выполнена на термоциклерах «Терцик» («ДНК-технология», Россия), «РТС-200» («MJ Research», Канада) и «MyCycler» с градиентом («Bio-Rad», США), с последующим проведением, в ряде случаев, этапа ПДРФ-анализа.

Перечень использованных праймеров и условия проведения ПЦР- и ПЦР-ПДРФ-анализа для идентификации аллелей генов *Waxy* и *HMW-GS* представлены в таблице 1.

Таблица 1

Перечень использованных праймеров и условия проведения ПЦР- и ПЦР-ПДРФ-анализа для идентификации аллелей генов *Waxy* и *HMW-GS*

Наименования праймеров и их нуклеотидные последовательности	Локус	Режимы ПЦР-амплификации	ПДРФ-анализ
4F: 5'-AAGAGCAACTACCAGT-3' 4R: 5'-TCGTACCCGTCGATGAAGTCGA-3'	<i>Wx-A1</i> <i>Wx-B1</i> <i>Wx-D1</i>	×1: 94 °C – 4 мин. ×40: 94 °C – 30 сек, 58 °C – 30 сек, 72 °C – 30 сек. ×1: 72 °C – 7 мин.	<i>AcsI</i> 50 °C 3 часа
4F-c: 5'-CCCCCAAGAGCAACTACCAGT-3' 4R: 5'-TCGTACCCGTCGATGAAGTCGA-3'	<i>Wx-A1</i> <i>Wx-B1</i> <i>Wx-D1</i>	×1: 94 °C – 4 мин. ×40: 94 °C – 30 сек, 64 °C – 30 сек, 72 °C – 30 сек. ×1: 72 °C – 7 мин.	<i>AcsI</i> 50 °C 3 часа
<i>Wx-A1L</i> : 5'-CCCCAAAGCAAAGCAGGAAAC-3' <i>Wx-A1R</i> : 5'-CGGCGTCGGGTCCATAGATC-3'	<i>Wx-A1</i>	×1: 94 °C – 4 мин. ×40: 94 °C – 45 сек, 55 °C – 30 сек, 72 °C – 1 мин. ×1: 72 °C – 7 мин.	<i>HindIII</i> 37 °C 3 часа
<i>Wx-A2L</i> : 5'-CGCAGGGGAAGACGTGGT-3' <i>Wx-A2R</i> : 5'-CGTTGACGATGCCGGTGATC-3'	<i>Wx-A1</i>	×1: 94 °C – 4 мин. ×40: 94 °C – 30 сек, 65 °C – 30 сек, 72 °C – 30 сек. ×1: 72 °C – 7 мин.	
<i>Wx-B1L</i> : 5'-CGCAGGGGAAGACGTGGT-3' <i>Wx-B1R</i> : 5'-CGTTGACGATGCCGGTGATG-3'	<i>Wx-B1</i>	×1: 94 °C – 4 мин. ×40: 94 °C – 45 сек, 65 °C – 40 сек, 72 °C – 50 сек. ×1: 72 °C – 7 мин.	
<i>Wx-B1L</i> : 5'-CGCAGGGGAAGACGTGGT-3' <i>Wx-B2R</i> : 5'-CGTTGACGATGCCGGTGTG-3'	<i>Wx-B1</i>	×1: 94 °C – 4 мин. ×40: 94 °C – 45 сек, 65 °C – 40 сек, 72 °C – 50 сек. ×1: 72 °C – 7 мин.	
<i>Wx-D1L</i> : 5'-GCCGACGTGAAGAAGGTGGTG-3' <i>Wx-D1R</i> : 5'-CCCCTTGCATTTGTTGTGT-3'	<i>Wx-D1</i>	×1: 94 °C – 4 мин. ×40: 94 °C – 45 сек, 55 °C – 30 сек, 72 °C – 1 мин. ×1: 72 °C – 7 мин.	
UMN19F: 5'-CGAGACAATATGAGCAGCAAG-3' UMN19R: 5'-CTGCCATGGAGAAGTTGGA-3'	<i>Glu-A1</i> (<i>Ax1/Axnull</i> , <i>Ax2*</i>)	×1: 94 °C – 4 мин. ×40: 94 °C – 30 сек, 60 °C – 30 сек, 72 °C – 30 сек. ×1: 72 °C – 5 мин.	<i>HaeIII</i> 37 °C 3 часа
<i>Axnull-F</i> : 5'-ACGTTCCCCTACAGGТАCTA-3' <i>Axnull-R</i> : 5'-TATCACTGGCTAGCCGACAA-3'	<i>Glu-A1</i> (<i>Axnull</i>)	×1: 94 °C – 4 мин. ×40: 94 °C – 1 мин, 58 °C – 1 мин, 72 °C – 1 мин. ×1: 72 °C – 7 мин	
UMN25F: 5'-GGGACAATACGAGCAGCAAA-3' UMN25R: 5'-CTTGTTCCGGTTGTTGCCA-3'	<i>Glu-D1</i> (<i>Dx2</i> , <i>Dx5</i>)	×1: 94 °C – 4 мин. ×40: 94 °C – 30 сек, 60 °C – 30 сек, 72 °C – 30 сек. ×1: 72 °C – 5 мин.	<i>HaeIII</i> 37 °C 3 часа
<i>Dx5-1</i> : 5'-GCCTAGCAACCTTCACAATC-3' <i>Dx5-2</i> : 5'-GAAACCTGCTGCGGACAAG-3'	<i>Glu-D1</i> (<i>Dx2</i> , <i>Dx5</i>)	×1: 94 °C – 4 мин. ×40: 94 °C – 30 сек, 63 °C – 30 сек, 72 °C – 30 сек. ×1: 72 °C – 5 мин.	
UMN26F: 5'-CGCAAGACAATATGAGCAAACT-3' UMN26R: 5'-TTGCCTTTGTCTGTGTGC-3'	<i>Glu-D1</i> (<i>Dy10</i> , <i>Dy12</i>)	×1: 94 °C – 4 мин. ×40: 94 °C – 30 сек, 60 °C – 30 сек, 72 °C – 30 сек. ×1: 72 °C – 7 мин.	<i>HaeIII</i> 37 °C 3 часа
<i>Dy10/12-F</i> : 5'-GTTGGCCGTCGGCTGCCATG-3' <i>Dy10/12-R</i> : 5'-TGGAGAAGTTGGATAGTACC-3'	<i>Glu-D1</i> (<i>Dy10</i> , <i>Dy12</i>)	×1: 94 °C – 4 мин. ×40: 94 °C – 30 сек, 65 °C – 30 сек, 72 °C – 30 сек. ×1: 72 °C – 5 мин.	

Детекция результатов ПЦР- и ПЦР-ПДРФ-анализа выполнена методом горизонтального электрофореза в 2–3 % агарозном геле в буфере TBE (pH 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) и ООО «Биотех-Индустрия» (Россия).

Секвенирование продуктов амплификации *Wx-A1*-локуса *Waxy*-гена линий яровой пшеницы Kk-71/06-3 (GenBank A/N: JX649155), Kk-11/06-10 (GenBank A/N: JX649156), Kk-11/06-11 (GenBank A/N: JX649157) и Kk-69/06-1 (GenBank A/N: JX649158) селекции ТатНИИСХ проведено на генетическом анализаторе «ABI PRISM 3100» (Applied. Biosystems, США) в НПК «Синтол» (Россия).

Выравнивание частичных нуклеотидных последовательностей аллельных вариантов генов *Waxy* и *HMW-GS*: CLUSTAL W (v. 1.83) и BLAST.

Результаты исследования и их обсуждение

Одним из подходов к идентификации аллельных вариантов *Waxy*-генов пшеницы является общепринятый способ проведения ПЦР с олигонуклеотидными праймерами 4F: 5'-AAGAGCAACTACCAGT-3' и 4R: 5'-TCGTACCCGTCGATGAAGTCGA-3', инициирующими амплификацию соответствующих аллельспецифичных продуктов *Wx-A1*-, *Wx-B1*- и *Wx-D1*-локусов [5, 7].

Существенным недостатком данного способа проведения ПЦР является невозможность идентификации нуль-аллеля *Wx-B1b* от активного аллеля *Wx-B1e*, а также трудность дискриминации *Wx-A1a* от *Wx-A1g*.

Для более эффективной аллельной дискриминации *Waxy*-генов, нами был разработан оригинальный способ ПЦР- и ПЦР-ПДРФ-генотипирования, отличающийся от прототипа тем, что на этапе ПЦР используют другой прямой праймер 4F-с: 5'-CCCCAAGAGCAACTACCAGT-3', и после этапа ПЦР проводят процедуру ПДРФ-анализа с эндонуклеазным расщеплением ампликонов рестриктазой *AcsI*.

В части аллельной дискриминации *Wx-A1g* от *Wx-A1a*, оригинальность разработанного нами способа генотипирования заключается в реконструкции прямого праймера 4F путем наращивания его 5'-концевого участка пятизвенным oligo (dC)₅ блоком, для выравнивания температур плавления реконструированного (4F-с) и обратного (4R) праймеров с целью подбора оптимальной температуры отжига, равной 64 °С. А принцип дискриминации данных аллелей основан на учете, как отсутствия ПЦР-продукта размером 262 bp в разработанном нами способе генотипирования с праймерами 4F-с и 4R (рис. 1а, треки 5-7), так и наличия амплифицированного фрагмента локуса *Wx-A1g* размером 257 bp в постановке ПЦР с праймерами 4F и 4R (рис. 1б, треки 5-7).

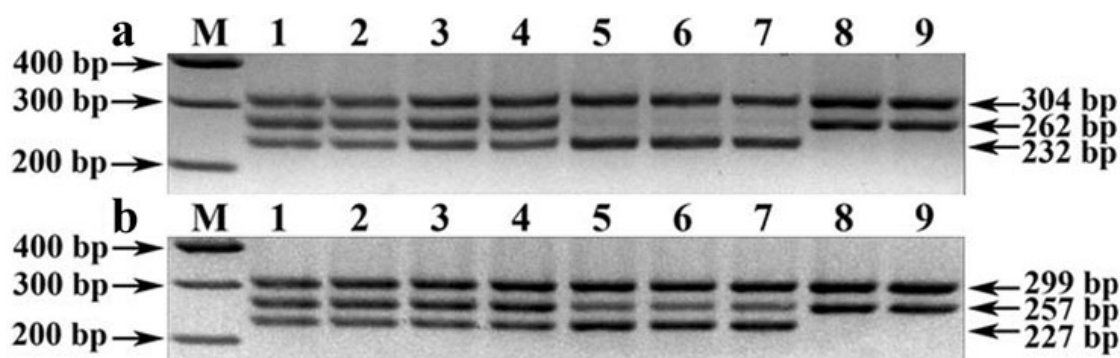


Рис. 1. Электрофореграмма технического результата предложенного способа проведения ПЦР и прототипа для комплексной идентификации аллельных вариантов *Waxy*-генов пшеницы

Обозначения: а) Предложенный способ проведения ПЦР (праймеры 4F-с + 4R). б) Прототип (праймеры 4F + 4R). М) ДНК-маркеры 100 bp + 1,5 kb (СибЭнзим); 1-9) геномы *Triticum aestivum* L с комбинациями *Wx*-аллелей: 1-4) *Wx-A1a/B1a/D1a*; 5-7) *Wx-A1g/B1a/D1a*; 8-9) *Wx-A1a/B1b/D1a*.

Таким образом, сочетанием общепринятого и предложенного нами способов генотипирования достигается точность ДНК-анализа в части эффективной аллельной дискриминации *Wx-A1g*, как от нуль-аллеля *Wx-A1b*, так и активного аллеля *Wx-A1a* *Waxy*-гена. А для эффективной дискриминации нулевого аллеля *Wx-B1b* от функционального аллеля *Wx-B1e*, нами были подобраны условия ПЦР-ПДРФ-анализа с праймерами 4F-с + 4R и эндонуклеазным расщеплением рестриктазой *AcsI*, приводящие к образованию аллельспецифичных профилей, в частности, с характерным для *Wx-B1b*-аллеля отсутствием ПДРФ-фрагмента размером 84 bp (рис. 2 а, треки 8-9), или наличием неразрезанного ПЦР-продукта локуса *Wx-B1e*-аллеля длиной 266 bp из-за отсутствия у него соответствующего сайта рестрикции (R↑AATTY).

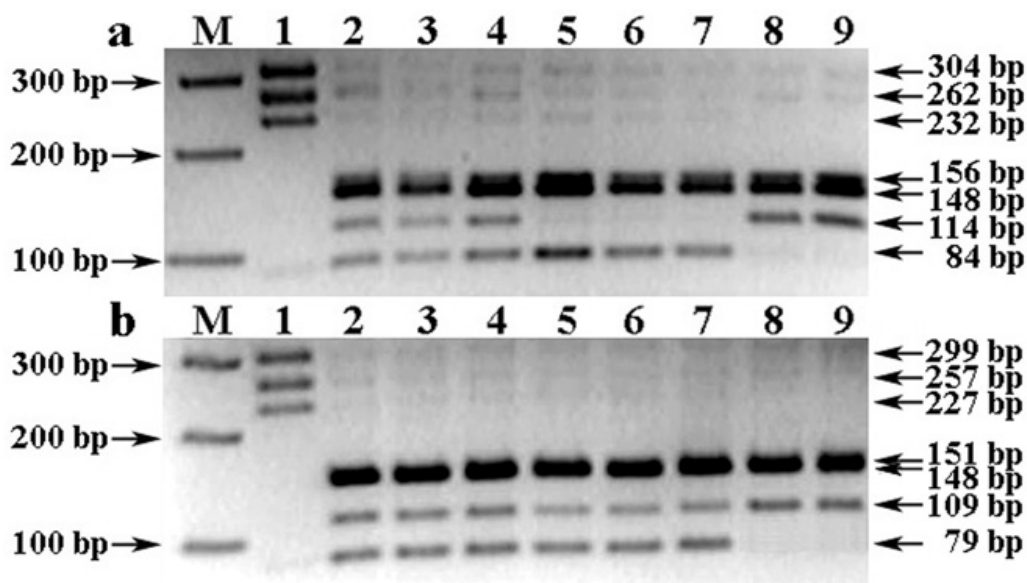


Рис. 2. Электрофореграмма результата предложенного способа проведения ПЦР-ПДРФ для комплексной идентификации аллельных вариантов *Waxy*-генов пшеницы

Обозначения: а) Праймеры 4F-с + 4R. б) Праймеры 4F + 4R. М) ДНК-маркеры 50-100 bp (СибЭнзим). 1) ПЦР-профиль генома *Triticum aestivum* L с комбинацией аллелей *Wx-A1a/B1a/D1a*; 2-9) *AcsI*-ПЦР-ПДРФ-профили геномов *Triticum aestivum* L с комбинациями *Wx*-аллелей: 2-4) *Wx-A1a/B1a/D1a*; 5-7) *Wx-A1g/B1a/D1a*; 8-9) *Wx-A1a/B1b/D1a*.

Следует отметить, что технический результат, выраженный в эффективной интерпретации образующихся ПЦР-продуктов (рис. 1) и ПЦР-ПДРФ-фрагментов (рис. 2), был полностью сопоставим с расчетными данными, которые в свою очередь были получены, исходя из анализа выравниваний нуклеотидных последовательностей аллельных вариантов *Waxy*-генов *Triticum aestivum* L., *AcsI*-рестрикционного картирования и расчета генерируемых ПЦР- и *AcsI*-ПЦР-ПДРФ-профилей (рис. 3).

<u>Аллели</u>		<u>AAGAG СААСТАССАG T = Праймер 4F</u>				
<u>Wx-генов</u>		<u>СССССААGAG СААСТАССАG T = Праймер 4F-с</u>				
<i>Wx-A1a</i>	001	АССТСААGAG	СААСТАССАG	ТССААТGGСА	ТСТАТАGAGАС	GGССААGGТТ
<i>Wx-A1g</i>	001
<i>Wx-B1a</i>	001G.....
<i>Wx-B1e</i>	001Т.....
<i>Wx-D1a</i>	001С...G.	С...А.....
		*****	*****	**** *	**** *	**** *
<i>Wx-A1a</i>	051	ТТGСАТСТТC	T---GAAACT	ТТАТАТТGСG	ТСТGСАТ---	-----
<i>Wx-A1g</i>	051	-----
<i>Wx-B1a</i>	051C....Т.....	-----
<i>Wx-B1e</i>	051А.....С.....Т...	...С...АТ-	-----
<i>Wx-D1a</i>	051ТСТC....	А.....С.Т.ТСА	ТАТGСАТGСА
		*****	**** *	**** *	**** *	**** *
<i>Wx-A1a</i>	085	-----	-----	-----А	ТСААТТТТGС	GGТТСАТТC-
<i>Wx-A1g</i>	085	-----	-----	------
<i>Wx-B1a</i>	083	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Wx-B1e</i>	087	-----	-----	-----С.	АТТC.....А
<i>Wx-D1a</i>	101	ТАТСТТGСТC	ТТСАТТСТGА	ААСAGGСАТ.-
		<u>AcsI</u>				
<i>Wx-A1a</i>	105	ТGGСАGССТG	ААТТТТАСАТ	ТGСААСТССА	ТТТСАТGGСТ	AGGTGGСАТТ
<i>Wx-A1g</i>	105
<i>Wx-B1a</i>	084	-----Т..Т.СА..G..
<i>Wx-B1e</i>	109	...ТСТG....	G.....А.G..
<i>Wx-D1a</i>	150Т..С
		*	*****	*****	**	*****
<i>Wx-A1a</i>	155	СТGСАТССАС	ААСАТСТGГТ	АССAGGССG	СТТСТССТТC	GАGСАТТСG
<i>Wx-A1g</i>	155
<i>Wx-B1a</i>	125Т.....
<i>Wx-B1e</i>	159
<i>Wx-D1a</i>	197
		*****	*****	*	*****	*****
					<u>ТCGA</u>	<u>СТТСАТCGАС</u>
<i>Wx-A1a</i>	205	CGCAGСТСАА	ССТGССТGАС	AGGTТСАAGТ	CGТCСТТCGA	СТТСАТCGАС
<i>Wx-A1g</i>	205С...Т...
<i>Wx-B1a</i>	175С...
<i>Wx-B1e</i>	209С...
<i>Wx-D1a</i>	247С...
		*****	*****	***	*****	*****
		<u>Праймер 4R</u>	<u>ПЦР-</u>	<u>AcsI-рестрикционное</u>	<u>AcsI-ПЦР-ПДРФ</u>	
		<u>GGGTАСGА</u>	<u>продукт, bp</u>	<u>картирование, nt</u>	<u>профили, bp</u>	
<i>Wx-A1a</i>	255	GGСТАСGА	262 [257]	114/148 [109/148]	148/114 [148/109]	
<i>Wx-A1g</i>	255	нет [257]	нет [109/148]	нет [148/109]	
<i>Wx-B1a</i>	225	232 [227]	84/148 [79/148]	148/84 [148/79]	
<i>Wx-B1e</i>	259	266 [261]	266 [261]	266 [261]	
<i>Wx-D1a</i>	297	304 [299]	156/148 [151/148]	156/148 [151/148]	

Рис. 3. Выравнивание фланкируемых с праймерами 4F-с + 4R [4F + 4R] нуклеотидных последовательностей аллельных вариантов *Waxy*-генов *Triticum aestivum* L., *AcsI*-рестрикционное картирование и расчет *AcsI*-ПЦР-ПДРФ-профилей

Разработанный нами способ проведения ПЦР и ПЦР-ПДРФ для идентификации аллельных вариантов *waxy*-генов пшеницы является изобретением, на которое получен патент Российской Федерации (патент на изобретение RU 2 528 748 С1, опубликовано: 20.09.2014. Бюл. № 26).

Помимо комплексного подхода к идентификации аллельных вариантов одновременно по всем трем локусам *Waxy*-генов пшеницы, для обоснования достоверности заключения ДНК-тестов дополнительно были протестированы способы генотипирования по отдельно взятым локусам *Waxy*-генов пшеницы [7, 8] с праймерами: *Wx-A1L* + *Wx-A1R* и *Wx-A2L* + *Wx-A2R* (*Wx-A1*-локус), с использованием последних также в качестве сиквенсных при расшифровке частичных нуклеотидных последовательностей *Wx-A1a*- и *Wx-A1g*-аллелей; *Wx-B1L* + *Wx-B1R* и *Wx-B1L* + *Wx-B2R* (*Wx-B1*-локус), *Wx-D1L* + *Wx-D1R* (*Wx-D1*-локус).

Использованный же в работе праймер *Wx-B2R* является модифицированным нами аналогом *Wx-B1R*, отличающимся от прототипа «mismatch-нуклеотидом» в третьей позиции с 3'-конца олигонуклеотида, обеспечивающим корректную ПЦР-идентификацию аллельных вариантов *Wx-B1*-локуса *Waxy*-гена пшеницы.

Таким образом, при апробации вышеохарактеризованных общепринятых и разработанных нами способов генотипирования на образцах яровой пшеницы селекции ТатНИИСХ удалось провести их молекулярно-генетическую оценку на предмет идентификации генотипов по аллельным вариантам *Waxy*-генов, в результате которой было установлено, что из 70 происследованных образцов подавляющее большинство растений по классификации типов пшеницы с различным содержанием *Waxy*-генов относились к 1-му дикому типу (*Wx-A1a/B1a/D1a* = 65 растений, 92,8 %; *Wx-A1g/B1a/D1a* = 3 линии, 4,4 %), а 2 линии: Кк-8/06-6 и О-192/03-5 (2,8 %) принадлежали к 3-му типу пшеницы с совокупной комбинацией аллельных вариантов *Wx-A1a/B1b/D1a* (табл. 2).

Подытоживая результаты молекулярно-генетической оценки 70 образцов яровой пшеницы селекции ТатНИИСХ на предмет идентификации генотипов по аллельным вариантам *Waxy*-генов, можно вывести заключение, что наиболее перспективными генотипами, рассматриваемыми в качестве исходного материала для дальнейшей селекционной работы по созданию сортов с крахмалом амилопектинового типа являются две линии-носители нулевого *Wx-B1b*-аллеля (Кк-8/06-6 и О-192/03-5) с последующим введением в их геномы *Wx-A1b*- и (или) *Wx-D1b*-аллелей путем скрещивания с соответствующими донорами нуль-аллелей по локусам *Waxy*-генов пшеницы.

Таблица 2

Молекулярно-генетическая оценка *Triticum aestivum* L селекции ТатНИИСХ по генам *Waxy* и *HMW-GS*

№ п. п.	Сорт/линия	<i>Waxy</i>						<i>HMW-GS</i>						№ п. п.	Сорт/линия	<i>Waxy</i>						<i>HMW-GS</i>							
		<i>AI</i>			<i>BI</i>			<i>DI</i>		<i>AI</i>		<i>DI</i>				<i>AI</i>			<i>BI</i>			<i>DI</i>		<i>AI</i>		<i>DI</i>			
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>g</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>Ax1</i>	<i>Ax2*</i>	<i>5+10</i>	<i>2+12</i>			<i>a</i>	<i>b</i>	<i>g</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>Ax1</i>	<i>Ax2*</i>	<i>5+10</i>	<i>2+12</i>		
1	Казанская Юбилейная	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	36	Казанская Юбилейная (неполег.)	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+
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,	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
31	К-11/04-8	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	66	О-186/04-1	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
32	Экада 66	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	67	О-464/02-2	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+
33	К-27/00-2	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	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 соответствующего аллеля - – отсутствие соответствующего аллеля

Следующим этапом исследования являлась апробация разработанного нами способа проведения ПЦР-ПДРФ для идентификации аллельных вариантов *Glu-A1*- и *Glu-D1*-локусов НМW субъединиц глютеинов пшеницы, ближайшим аналогом которого послужил способ генотипирования, предложенный Лиу с соавт. в 2008 г. [4].

Прототип заявленного способа генотипирования, предусматривающий идентификацию аллельных вариантов НМW субъединиц глютеинов пшеницы с тремя наборами праймеров: UMN19F + UMN19R (*Ax1/Axnull*- и *Ax2**-аллели), UMN25F + UMN25R (*Dx2*- и *Dx5*-аллели) и UMN26F + UMN26R (*Dy10*- и *Dy12*-аллели), в основном был рассчитан авторами на детекцию полученных результатов ПЦР преимущественно методами капиллярного или вертикального гель-электрофореза в ПААГ [4].

Отличительным признаком предложенного нами способа генотипирования от вышесказанного прототипа являлось, как введение дополнительного этапа ПДРФ-анализа с эндонуклеазным расщеплением ампликонов рестриктазой *HaeIII*, так и последующая детекция результатов анализа методом горизонтального электрофореза в агарозном геле.

В результате же практических исследований, направленных на апробацию разработанного нами способа проведения ПЦР-ПДРФ, был получен технический результат, обеспечивавший эффективную идентификацию аллельных вариантов НМW субъединиц глютеинов пшеницы, благодаря корректной интерпретации генерируемых ПЦР-ПДРФ-фрагментов при их электрофорезной детекции в агарозном геле (рис. 4-6),

Следует отметить, что результаты генотипирования визуально были сопоставимы с расчетными данными, полученными, в свою очередь, исходя из анализа выравниваний соответствующих нуклеотидных последовательностей с *HaeIII*-рестрикционным картированием и расчета генерируемых ПЦР- и *HaeIII*-ПЦР-ПДРФ-профилей.

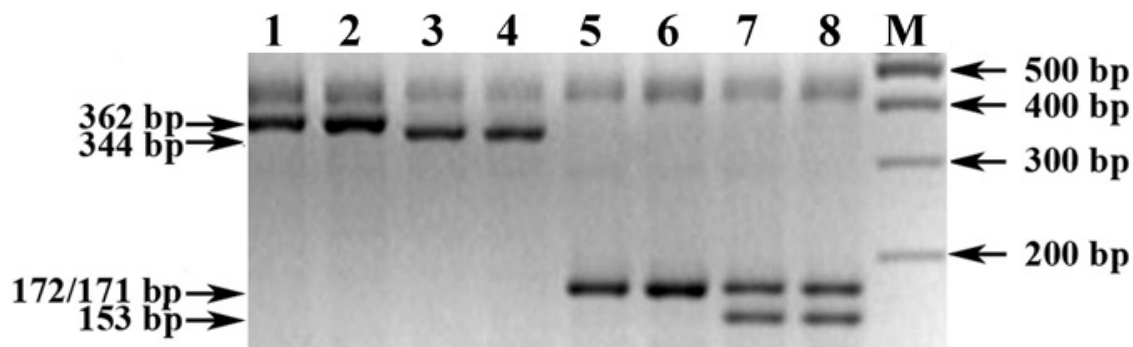


Рис. 4. Электрофореграмма результата ПЦР-анализа и предложенного способа проведения ПЦР-ПДРФ для идентификации аллельных вариантов *Ax1/Axnull* и *Ax2** *Glu-A1*-локуса НМW-GS пшеницы (праймеры UMN19F + UMN19R)

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

Так, в результате апробации разработанного нами способа проведения ПЦР-ПДРФ с первым набором праймеров UMN19F + UMN19R и эндонуклеазным расщеплением рестриктазой *Hae*III, регистрировались ПЦР-ПДРФ-профили, характерные как для аллельных вариантов *Ax1/Axnull* (172/171/19 bp), так и для *Ax2**-аллеля (172/153/19 bp) *Glu-A1*-локуса HMW субъединиц глютеинов пшеницы (рис. 4, треки 5-8), запечатленные вместе с цельными ПЦР-продуктами (рис. 4, треки 1-4) на соответствующей электрофореграмме.

А в результате апробации предложенного способа проведения ПЦР-ПДРФ со вторым набором праймеров UMN25F + UMN25R и эндонуклеазным расщеплением *Hae*III визуализировались ПЦР-ПДРФ-профили аллельных вариантов *Dx2* (171/109/19 bp) и *Dx5* (171/91/19 bp) *Glu-D1*-локуса HMW субъединиц глютеинов пшеницы (рис. 5, треки 5-8), тоже запечатленные вместе с неразрезанными ПЦР-продуктами данных аллелей (рис. 5, треки 1-4) на соответствующей электрофореграмме.

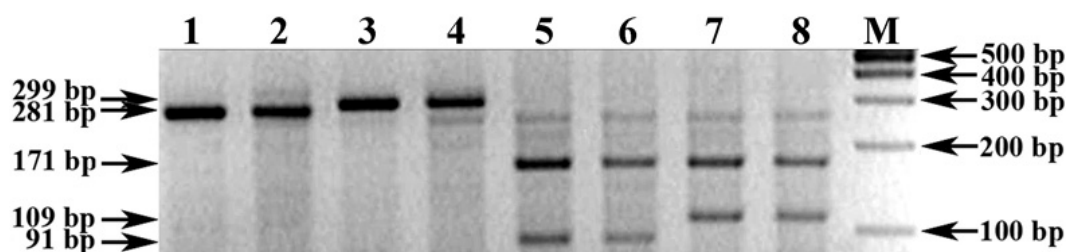


Рис. 5. Электрофореграмма результата ПЦР-анализа и предложенного способа проведения ПЦР-ПДРФ для идентификации аллельных вариантов *Dx2* и *Dx5* *Glu-D1*-локуса HMW-GS пшеницы (праймеры UMN25F + UMN25R)

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

В результате же постановки ПЦР-ПДРФ с третьим набором праймеров UMN26F + UMN26R и рестрикцией ферментом *Hae*III, нами также были зарегистрированы аллельспецифичные профили (*Dy10* = 223/174 bp; *Dy12* = 241/174 bp) *Glu-D1*-локуса HMW-GS (рис. 6, треки 5-8), репрезентативно визуализированные вместе с соответствующими цельными ПЦР-продуктами (рис. 6, треки 1-4) на представленной ниже электрофореграмме.

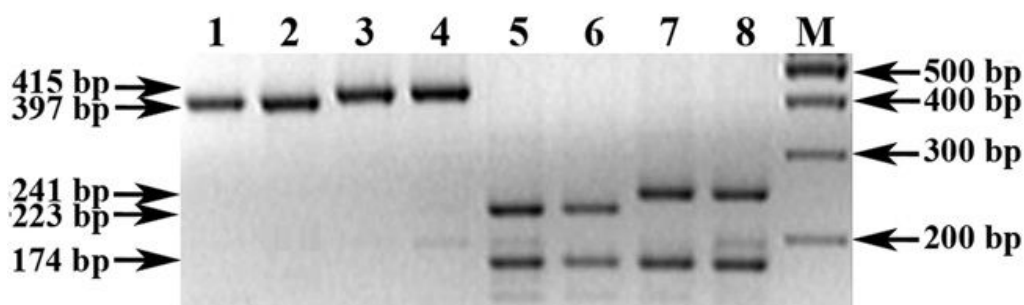


Рис. 6. Электрофореграмма результата ПЦР-анализа и предложенного способа проведения ПЦР-ПДРФ для идентификации аллельных вариантов *Dy10* и *Dy12* *Glu-D1*-локуса HMW-GS пшеницы (праймеры UMN26F + UMN26R)

Обозначения: 1-4) ПЦР-анализ (прототип): 1-2) *Dy10*-аллель (397 bp); 3-4) *Dy12*-аллель (415 bp). 5-8) *Hae*III-ПЦР-ПДРФ-анализ (предложенный способ): 5-6) *Dy10*-аллель (223/174 bp); 7-8) *Dy12*-аллель (241/174 bp). М) ДНК-маркеры 100 bp (СибЭнзим).

Так, именно введением дополнительного этапа ПДРФ-анализа с *Hae*III-эндонуклеазным расщеплением амплифицируемых ПЦР-продуктов, инцируемых тремя различными парами праймеров (UMN19F + UMN19R, UMN25F + UMN25R и UMN26F + UMN26R), удалось адаптировать детекцию результатов анализа методом горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Низко-дискретные цельные ПЦР-продукты, практически также можно анализировать методом горизонтального электрофореза в агарозном геле, однако, ввиду высокого риска негативного влияния эффекта «улыбки» с геометрическим искажением электрофорезной картины, все же для этой цели предпочтительней использовать методы капиллярного или вертикального гель-электрофореза в ПААГ, как ранее и было предусмотрено авторами данных протоколов генотипирования [4].

Для обоснования достоверности заключения ДНК-тестов, также в ходе исследования были дополнительно протестированы и другие общепринятые способы ПЦР-идентификации: *Axnull Glu-A1*-локуса с праймерами *Axnull-F* + *Axnull-R* [3], *Dx5* и *Dx2 Glu-D1*-локуса с праймерами *Dx5-1* + *Dx5-2* [1], *Dy10* и *Dy12 Glu-D1*-локуса *HMW-GS* с праймерами *Dy10/12-F* + *Dy10/12-R* [6].

Молекулярно-генетической оценкой генотипов пшеницы по аллельным вариантам *HMW* субъединиц глютеинов выяснено, что по *Glu-A1*-локусу *HMW-GS* подавляющее большинство растений (57 образцов, 81,4 %) имели субъединицу *Ax2**, кодируемую аллельным вариантом *Glu-A1b* (*Ax2**-аллель), а остальные 13 генотипов (18,6 %) – субъединицу *Ax1*, кодируемую аллельным вариантом *Glu-A1a* (*Ax1*-аллель); по *Glu-D1*-локусу *HMW-GS* 44 растения (62,9 %) являлись носителями комбинации субъединиц *Dx5* и *Dy10* (5+10), кодируемой аллельным вариантом *Glu-D1d* (*Dx5*- и *Dy10*-аллели), а 26 образцов (37,1 %) характеризовались наличием комбинации субъединиц *Dx2* и *Dy12* (2+12), кодируемой аллельным вариантом *GluD1a* (*Dx2*- и *Dy12*-аллели) (табл. 2). При оценке же распределения происследованных генотипов *Triticum aestivum* L. по совокупной комбинации *Glu-A1/D1*-локусов *HMW* субъединиц глютеинов ($Ax1/5+10 = 12$ (17,1 %); $Ax1/2+12 = 1$ (1,4 %); $Ax2*/5+10 = 32$ (45,7 %); $Ax2*/2+12 = 25$ (35,7 %)) нами было установлено преобладание желаемой для селекции на мукомольно-хлебопекарные качества зерна комбинации субъединиц $Ax2*/5+10$.

Заключение

Таким образом, разработанные и апробированные нами способы генотипирования *Triticum aestivum* L. по аллельным вариантам *Waxy*-генов и *HMW* субъединиц глютеинов обеспечили эффективное проведение корректной молекулярно-генетической оценки 70 исследуемых образцов (62 линий и 8 сортов) яровой пшеницы селекции ТатНИИСХ.

Список литературы

1. D'Ovidio, R. PCR analysis to distinguish between alleles of a member of a multigene family correlated with wheat bread-making quality / R. D'Ovidio, O.D. Anderson // *Theor. Appl. Genet.* – 1994. – V. 88. – No. 6-7. – P. 759-763.
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. – V. 44. – No. 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. Turhchetta, B. Margiotta // *Theor. Appl. Genet.* – 1997. – V. 94. – No. 2. – 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. – V. 118. – No. 1. – P. 177-183.
5. McLauchlan, A. Development of robust PCR-based DNA markers for each homeo-allele of granule-bond 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. – No. 11-12. – P. 1409-1416.
6. Smith, R.L. Identification of glutenin alleles in wheat and triticale using PCR-generated DNA markers / R.L. Smith, M.E. Schweder, R.D. Barnett // *Crop Sci.* – 1994. – V. 34. – No. 5. – P. 1373-1378.
7. 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. – No. 1. – P. 1-9.
8. Vrinten, P. Molecular characterization of waxy mutations in wheat / P. Vrinten, T. Nakamura, M. Yamamori // *Mol. Gen. Genet.* – 1999. – V. 261. – No. 3. – P. 463-471.
9. 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:

Гайнуллина М.К., д.с.-х.н., профессор, зав. кафедрой технологии производства и переработки сельскохозяйственной продукции Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана, г. Казань;

Якупов Т.Р., д.в.н., доцент кафедры биологической и неорганической химии Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана, г. Казань.