

phoresis method for the determination of varietal conformity and purity of barely varieties. **Conclusion.** Electrophoresis of proteins is an effective method of laboratory quality control of barely grain.  
**Key words:** barely, hordein, albumin, varietal conformity and purity, electrophoresis.

СТЕПАНЕНКО О.В.<sup>1,2</sup>, СТЕПАНЕНКО А.І.<sup>1</sup>, МОРГУН Б.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Україна, 03680, Київ, вул. Акад. Заболотного, 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

<sup>2</sup> Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ АЛЕЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ *Wx* У ЛІНІЯХ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ДОПОМОГОЮ КОДОМІНАНТНИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ

Крохмаль є основною поживною речовиною м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) і міститься він у запасуючих органах зернівки (ендоспермі), де накопичується у вигляді гранул, які складаються з полісахаридів двох типів – розгалуженого амілопектину (70-75%) і лінійної амілози (20-25%) [1].

Головний ферментом біосинтезу амілози є асоційована з гранулами синтаза крохмалю (GBSSI) з молекулярною масою біля 60 кДа, яка має назву *Wx*-протеїн. У геномі м'якої пшениці три гомеологічних гени кодують ізоформи GBSSI ферменту: *Wx-A1*, *Wx-B1* і *Wx-D1*, які розташовані у плечах хромосомах 7AS, 4AL і 7DS відповідно [2].

У кукурудзи, ячменю, рису, вівса, а потім і у пшениці були виявлені мутанти по генах *Wx*, у яких спостерігалось зниження вмісту або повна відсутність амілози [3]. У пшениці кожен з генів *Wx* має кілька алелів: активний алель (а), який кодує синтез білка *Wx*, нуль-алель (в), при якому синтез функціонального білка *Wx* відсутній та функціональні алелі з різною ферментативною активністю білка *Wx*. Пшеницею ваксі *Wx* називають сорти з поєднанням трьох нуль-алелів і відповідно відсутністю амілози у структурі молекули крохмалю. Також існують сорти з кількома нуль-алелями, які мають дещо знижений синтез амілози і називаються частковим ваксі [4].

Таблиця 1. Класифікація ваксі пшениці в залежності від наявності (+) чи відсутності (–) кожного з *Wx*-білків та вмісту амілози в кожному типі [5]

Типи	<i>Wx</i> -протеїни			Вміст амілози (%)
	<i>Wx-A1</i>	<i>Wx-B1</i>	<i>Wx-D1</i>	
Тип 1	+	+	+	28,7
Тип 2	–	+	+	28,5
Тип 3	+	–	+	27,1
Тип 4	+	+	–	28,0
Тип 5	+	–	–	20,3
Тип 6	–	+	–	25,8
Тип 7	–	–	+	22,9
Тип 8	–	–	–	0,9

Для оцінки алельного стану генів *Wx* найбільш надійним способом є молекулярне маркування з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [6-8].

Українськими [9] та російськими [10, 11] вченими в колекціях сортів озимої та ярої пшениці з відповідних країн були знайдені різні

комбінації активних і неактивних алелей *Wx*.

Метою нашої роботи було підібрати молекулярно-генетичні методики виявлення кодомінантних молекулярних маркерів та охарактеризувати алельний стан генів *Wx* селекційних ліній м'якої озимої пшениці *Wx-1* та *Wx-6*.

## Матеріали і методи

У дослідженнях використовували лінії Wx-1, Wx-6 та сорти м'якої пшениці Фаворитка, Ятрань 60 та Смуглянка надані Інститутом фізіології рослин і генетики НАН України.

ДНК виділяли з 5-ти насінин кожного зразку ЦТАБ методом [12] і розчиняли у ТЕ буфері рН 8,0. Чистоту та концентрацію препарату ДНК вимірювали на спектрофотометрі BioPhotometer (Eppendorf) v. 1.35.

Для полімеразної ланцюгової реакції у 20 мкл реакційної суміші використовували специфічні праймери (Таблиця 2), 30-100 нг загальної очищеної рослинної ДНК, 0,5 од. DreamTaq™ полімерази (Thermo Scientific).

Реакцію проводили в ампліфікаторі Mastercycler Personal (Eppendorf) за специфічними програмами.

Таблиця 2. Перелік праймерів, які використовуються у дослідженнях та очікуваних продуктів ампліфікації

Назва праймеру	Послідовність, посилання, додаткові умови	Розмір амплікону, п.н., алель	Ген
Wx-A1F Wx-A1R	5' - CCCCAAAGCA AAGCAGGAAA C - 3' 5' - CGGCGTTCGGG TCCATAGATC - 3' [13] +HindIII, 1 година, 37°C	495 + 176, Wx-A1a 652, Wx-A1b	<i>Wx-A1</i>
BDFL BRC1 BFC BRC2	5' - CTGGCCTGCT ACCTCAAGAG CAACT - 3' 5' - GGTTGCGGTT GGGGTTCGATG AC - 3' 5' - CGTAGTAAGG TGCAAAAAAG TGCCACG - 3' 5' - ACAGCCTTAT TGTACCAAGA CCCATGTGTG - 3' [14, 15]	778, Wx-B1a 668, Wx-B1b 804, Wx-B1e	<i>Wx-B1</i>
Wx-D1F Wx-D1R	5' - GCCGACGTGA AGAAGGTGGT G - 3' 5' - CCCCTTGCGT CATTTGTTGT GT - 3' [16]	930, Wx-D1a 342, Wx-D1b	<i>Wx-D1</i>

Програма ампліфікації на ген *Wx-A1*: початкова денатурація 3 хв при 94°C, 34 цикли – 30 с. при 94°C, 30 с. при температурі відпалу праймерів – 57°C, 40 с. при 72°C та 10 хв фінальна елонгація.

Програма ампліфікації з використанням методики Touchdown на ген *Wx-B1*: початкова денатурація 3 хв при 94°C, 6 циклів – 30 с при 94°C, 1 хв при температурі вищій за температуру відпалу праймерів – 69°C і з кожним циклом температура зменшується на 1°C, 2 хв при 72°C та ще 24 циклів – 30 с при 94°C, 1 хв при температурі відпалу праймерів – 59°C, 2 хв при 72°C та 10 хв фінальна елонгація.

Програма ампліфікації з використанням

## Результати та обговорення

Скринінг рослинного матеріалу для визначення алельного стану гена *Wx-A1* проводили за допомогою молекулярного маркеру, запропонованого Vanzetti і співавт. [13]. Після проведення ПЛР з даним молекулярним маркером розмір амплікон у

методики Touchdown на ген *Wx-D1*: початкова денатурація 3 хв при 94°C, 9 циклів – 30 с при 94°C, 30 с при температурі вищій за температуру відпалу праймерів – 67°C і з кожним циклом температура зменшується на 1°C, 1 хв при 72°C та ще 25 циклів – 30 с при 94°C, 30 с при температурі відпалу праймерів – 57°C, 1 хв при 72°C та 10 хв фінальна елонгація.

Розділення продуктів ампліфікації проводили методом горизонтального електрофорезу у 1,2% агарозному гелі, натрій боратному буфері з 0,5 мг/мл бромистого етидію [17]. Електрофореграми документували системою Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad).

алеля дикого типу і нуль-алеля відрізнявся незначно, тому для кращої візуалізації після ампліфікації проводився гідроліз ПЛР-продукту ендонуклеазою рестрикції HindIII.

Результати типової ампліфікації на ген *Wx-A1* наведені на рис. 1.

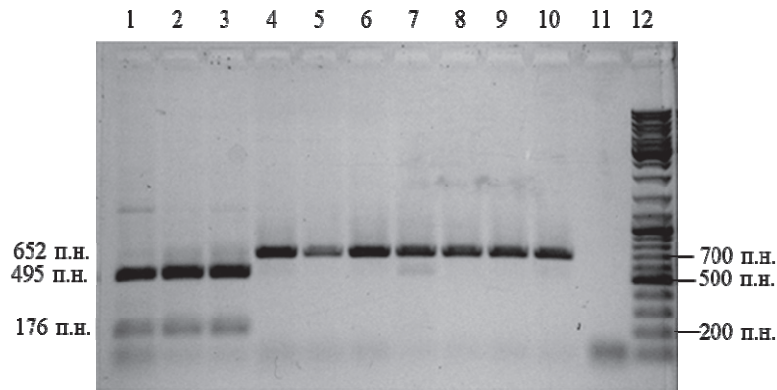


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації на ген *Wx-A1*:  
 1 – Фаворитка; 2 – Ятрань 60; 3 – Смуглянка; 4-7 – чотири зразки лінії *Wx-1*; 8-10 – три зразки лінії *Wx-6*; 11 – негативний контроль ТЕ буфер; 12 – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Було визначено, що усі зразки ліній *Wx-1* та *Wx-6* містили нуль-алель. Сорти пшениці Фаворитка, Ятрань 60 та Смуглянка містили алелі дикого типу гену *Wx-A1*.

Для аналізу локусу *Wx-B1* використовували кодомінантні маркери запропоновані Saito зі співавт. [14]. При його використанні в ПЛР ампліфікуються фрагменти довжиною 668 п.н. при наявності нуль-алеля і 778 п.н. при наявності алеля дикого типу гену *Wx-B1*. Розмір продукту ампліфікації у зразка,

який несе алель *Wx-B1e*, складає 804 п.н. [15].

Результати типової ампліфікації на ген *Wx-B1* наведені на рис. 2.

Було виявлено, що три зразки лінії *Wx-1* та два зразки лінії *Wx-6* містили нуль-алель гену *Wx-B1*. По одному зразку з кожної лінії містили і нуль-алель, і алель дикого типу. Сорти пшениці Фаворитка, Ятрань 60 та Смуглянка містили алелі дикого типу гену *Wx-B1*. Функціональний алель *Wx-B1e* не було виявлено в досліджуваних зразках.

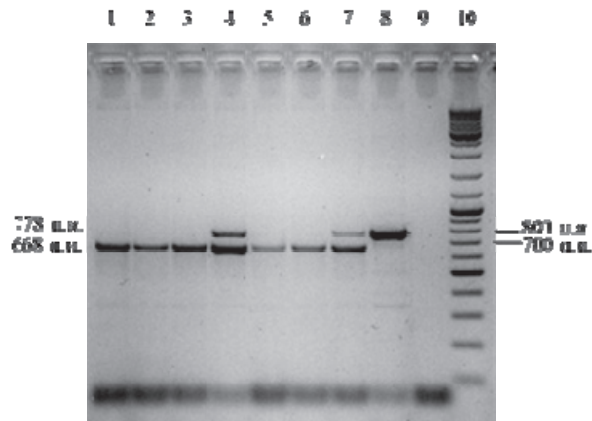


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації на ген *Wx-B1*:  
 1-4 – чотири зразки лінії *Wx-1*; 5-7 – три зразки лінії *Wx-6*; 8 – Фаворитка; 9 – негативний контроль ТЕ буфер; 10 – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Для визначення алельного стану гена *Wx-D1* використовували підхід запропонований Vrinten і співав. [16]. Було показано, що усі лінії досліджуваних зразків несли нуль-алелі *Wx-D1b*,

а сорти пшениці *Wx-D1a* – алелі дикого типу.

Результати типової ампліфікації на ген *Wx-D1* наведені на рис. 3.

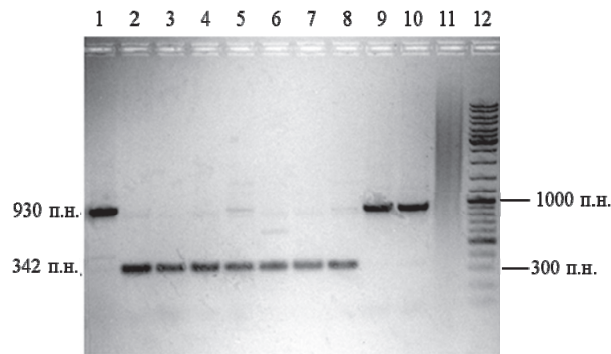


Рис. 3. Электрофореграма продуктів ампліфікації на ген *Wx-D1*:  
 1 – Фаворитка; 2-5 – чотири зразки лінії *Wx-1*; 6-8 – три зразки лінії *Wx-6*; 9 – Ятрань 60; 10 – Смуглянка; 11 – негативний контроль ТЕ буфер; 12 – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

### Висновки

Було відпрацьовано методики виявлення кодомінантних ДНК маркерів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Серед розглянутих зразків озимої пшениці ліній *Wx-1* та *Wx-6* були виявлені гомозиготні рослини, які несуть нуль-алелі генів *Wx-A1*, *Wx-D1* і *Wx-B1*, та гетерозиготні за геном *Wx-B1*.

Отримана в даній роботі інформація щодо алельного стану генів *Wx* дозволить направити

та інтенсифікувати процес селекції м'якої озимої пшениці на сучасному рівні у напрямку отримання сортів з модифікованим складом крохмалю.

Висловлюємо сердечну подяку доктору біологічних наук Рибалці О.І. за науковий супровід. Роботу фінансовано в рамках проекту №П-2-12 Національної академії наук України, за що автори відверто вдячні.

### Література

- James M., Denyer K. et al. Starch synthesis in the cereal endosperm // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2003. – Vol. 6. – P. 215–222.
- Chao S., Sharp P. et al. RELP-based genetic map of wheat homeologous group 7 chromosomes // *Teor. Appl. Genet.* – 1989. – Vol. 78. – P. 495–504.
- Graybosh R.A. Waxy wheats: origin, properties and prospects // *Trends Food Sci. Technol.* – 1998. – Vol. 9. – P. 135–142.
- Rodriguez-Quijano M., Nieto-Taladriz M.T., Carrillo J.M. Polymorphism of waxy proteins in Iberian hexaploid wheats // *Plant Breeding.* – 1998. – Vol. 117. – P. 341–344.
- Saito M., Vrinten P., Nakamura T. DNA markers for identifying waxy mutations and improving noodle quality in Wheat // *JARQ.* – 2010. – Vol. 44, №2. – P. 109–115.
- 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. – Vol. 4. – P. 427–433.
- Boggini G., Cattaneo M., Paganoni C., Vaccino P. Genetic variation for waxy proteins and starch properties in Italian wheat germplasm // *Euphytica.* – 2001. – Vol. 119. – P. 113–116.
- Dong Y., Zhao X., Wang J., Yuan G., Zhang X. Improvement for agronomic traits of partial waxy wheat by combination of backcrossing with a PCR-based DNA marker // *Journal of Genetics and Genomics.* – 2007. – Vol. 34. – P. 836–841.
- Петрова И.В., Чеботарь С.В., Рыбалка А.И., Сиволап Ю.М. Идентификация *Wx* генотипов среди сортов озимой мягкой пшеницы // *Цитология и генетика.* – 2007. – №6. – С. 11–17.
- Климушина М.В., Гладких Н.И., Дивашук М.Г., Беспалова Л.А., Васильев А.В., Карлов Г.И. Распределение аллелей генів *Wx* в коллекции мягкой пшеницы Краснодарского НИИСХ им. П.П. Лукьяненко // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* – 2012. – Т. 16, №1. – С. 187–192.
- Абдулина И.Р., Вафин Р.Р., Ржанова И.В., Гараева А.Л., Асхадуллин Д.Ф., Асхадуллин Д.Ф., Василова Н.З., Зайнуллин Л.И., Алимова Ф.К. Молекулярная идентификация генотипов яровой пшеницы по аллельным вариантам *Wx*-генов // *Фундаментальные исследования.* – 2013. – №1. – С. 13–17.
- Somma M. Extraction and purification of DNA. Session 4. In: *Training Course on the Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms / User Manual.* Edited by M. Querci, M. Jermini, G. Van den Eede. European Commission, DJ Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection. Luxembourg. – 2006. – P. 229.

13. 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. – Vol. 12. – P. 1–9.
14. 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. – Vol. 23. – P. 209–217.
15. Дивашук М.Г., Климушина М.В., Карлов Г.И. Молекулярно-генетическая характеристика аллеля Wx-B1 мягкой пшеницы и применимость ДНК маркеров для его идентификации // *Генетика.* – 2011. – Т. 47, №12. – С. 1611–1615.
16. Vrinten P., Nakamura T., Yamamori M. Molecular characterization of waxy mutations in wheat // *Mol. General Genet.* – 1999. – Vol. 261. – P. 463–471.
17. Brody, J.R., Kern, S.E. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis // *Anal. Biochem.* – 2004. – Vol. 333. – P. 1–13.

**STEPANENKO O.V.<sup>1,2</sup>, STEPANENKO A.I.<sup>1</sup>, MORGUN B.V.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine Ukraine, 03680, Kyiv, 148 Akademika Zabolotnoho St., e-mail: molgen@icbge.org.ua*

<sup>2</sup>*National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute"*

### **MOLECULAR GENETIC METHODS FOR IDENTIFICATION OF ALLELIC VARIANTS OF Wx GENES IN SOFT WHEAT LINES BY CODOMINANT MOLECULAR MARKERS**

**Aims.** Starch texture is one of the important factors in the quality of wheat products. Thus, it is important to control the amylose content in starch. There are three genes controlling the synthesis of amylose: *Wx-A1*, *Wx-B1* and *Wx-D1*. Each gene can occur in several allelic variants: active allele (a) encoding the protein synthesis Wx, null allele (b) in which the synthesis of a functional protein is absent, and functional Wx alleles with different enzymatic activity of protein GBSSI. **Methods.** The most reliable way to assess the allelic state of *Wx* genes is molecular marking using polymerase chain reaction. **Results.** Among the studied wheat lines Wx-1 and Wx-6 by codominant molecular markers there were identified homozygous plants carrying null alleles of *Wx-A1*, *Wx-D1*, *Wx-B1*, and heterozygous plants for *Wx-B1*. **Conclusions.** Homozygous and heterozygous allelic states of the *Wx* wheat genes were distinguished and can be effectively involved in the breeding process.

*Key words:* *Triticum aestivum* L., PCR, DNA marker, marker-assisted selection.

**СТОЛЕПЧЕНКО В.А.<sup>2</sup>, ВАСЬКО П.П.<sup>2</sup>, КОНДРАЦКАЯ И.П.<sup>1</sup>, ФОМЕНКО Т.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» Беларусь,* <sup>2</sup>*РУП «Научно-практический центра НАН Беларуси по земледелию»*

*Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2В, e-mail: ikondratskaya@mail.ru*

### **РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ СОЗДАНИЯ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ЛИСОХВОСТА**

Ведущая роль в создании устойчивой кормовой базы в Республике Беларусь принадлежит многолетним травам на пашне, сенокосах и пастбищах. Среди злаковых трав основную долю в травосмеси занимают сорта райграса пастбищного, лисохвоста лугового и фестулолиума, которые характеризуются интенсивным отрастанием и высоким качеством корма с содержанием обменной энергии 11-11,5 МДж/кг сухого вещества и сырого протеина на уровне 18-20% [1]. Основные направления селекции многолетних злаковых трав направлены на создание генотипов с хорошей отрастаемостью и стабильностью урожая; высокой устойчивостью к основным болезням, зимостойкостью, теневы-

носливостью; хорошей конкурентной способностью в многокомпонентных травостоях; а также стабильной семенной продуктивностью. Объединение хозяйственно-полезных признаков в межвидовом гибриде позволит сформировать сорто-популяцию с высоким качеством корма и стабильной семенной продуктивностью. Впервые предпринимается попытка разработать геномную технологию селекции лисохвоста лугового на основе дупликации генома, интрогрессивной гибридизации с использованием ДНК-маркирования с целью целенаправленно преобразования генома, расширения генофонда исходного материала и повышения эффективности селекции.