

УДК 577.218:582.951.4

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЛЕЛЯ *Wx-B1E*
У МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ*

М.В. КЛИМУШИНА, П.Ю. КРУПНЫ, М.Г. ДИВАШУК, Г.И. КАРЛОВ

(РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

В ходе работы получена последовательность аллеля Wx-Ble мягкой пшеницы размером 2725 пн. Показана гомология Wx-Ble к видам Triticum aestivum subsp. spelta, Triticum turgidum subsp. durum, Aegilops searsii и Aegilops speltoides. Показано, что в экзонах однонуклеотидные замены приводят только к синонимичным заменам аминокислот, т.е. относятся к молчащим.

Ключевые слова: мягкая пшеница, гены Wx, Wx-Ble, экзон, интрои.

Крахмал пшеницы является важным продуктом в пищевой промышленности, от его характеристик зависит качество конечной продукции. Крахмал является основным компонентом зерновки пшеницы и состоит из двух типов углеводов глюкозы: линейной амилозы и разветвленного амилопектина. Содержание амилозы составляет 20-25% массы крахмала, а амилопектина 70-75%. Содержание амилозы во многом определяет такие критические параметры крахмала, как его желатинизация и клейстеризация, и другие технологические свойства крахмала и муки пшеницы.

Гранул-связанная синтаза крахмала (Granule Bound Starch Synthase, GBSS), или вахи-белок, — один из главных белков в биосинтезе крахмала.

Этот фермент катализирует синтез длинных цепочек амилозы, присоединяя молекулы D-глюкозы с помощью 1,6-а-гликозидных связей к олигосахариду, образовавшемуся из ферментативно гидролизованной молекулы амилопектина [19]. При этом синтез амилозы происходит в амилопластах, где и формируются крахмальные гранулы [15]. Ваху-белок пшеницы состоит из транзитного пептида (80-81 аминокислота), активного центра и структурной части. Транзитный пептид направляет белок-предшественник в амилопласт (гранулу), где в активном центре зрелого фермента будет синтезироваться амилоза из молекул D-глюкозы на матрице амилопектиновой ветви [13].

У мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*) были идентифицированы три GBSS-белка. Каждый из GBSS-белков кодируется ваху-геном: на 7AS, 4AL (древняя транслокация с хромосомы 7BS) и 7DS [19]. Вклад каждого из генов в форми-

* Работа поддержана грантом Министерства образования. Соглашение № 8137 по теме «Молекулярно-генетическая характеристика генов, контролирующих синтез амилозы крахмала (*Wx*) у дикорастущих злаков, и оценка возможности их использования в улучшении мягкой пшеницы».

рование амилозы неодинаков: наибольший эффект оказывает ген *Wx-B1*, локализованный на 4AL [20].

В настоящее время выявлены различные аллельные варианты *ваху*-генов. Среди них обнаружены аллели, которые регулируют содержание амилозы в различных генотипах пшеницы. Разные аллели могут с разной степенью влиять на содержание амилозы, поэтому изучение данных аллелей представляет интерес для создания сортов пшеницы с заданным содержанием амилозы и как следствие с разными хлебопекарными качествами.

Однако среди российских сортов пшеницы аллельное разнообразие по *ваху*-генам невелико. Так, среди проанализированных 130 сортов только у трех был выявлен аллель *Wx-B1e*. У остальных сортов был аллель дикого типа *Wx-B1ct* [4, 5]. Среди образцов селекции Татарстана было обнаружено два образца несущих *Wx-B1b* аллель с помощью модифицированного маркера [1,2]. На базе обнаруженных сортов были созданы линии с различными комбинациями аллелей по генам *Wx* для изучения их влияния на различные свойства зерна [6]. В ряде работ было проведено изучение хлебопекарных качеств сортов, несущих данный тип аллеля, а также качество шрота у этих сортов [7, 8]. Однако нуклеотидная последовательность *Wx-B1e* аллеля известна лишь частично. В 2009 г. Vanzetty с соавторами секвенировали фрагмент этого аллеля размером 441 п.н. [16], а позже Дивашук и др. [3] расширили известную область до 804 п.н. Целью нашей работы было полное секвенирование аллеля *Wx-B1e*.

Материалы и методы

Растительный материал. В работе использовали семена сорта Коротышка, несущего в своем геноме *Wx-B1e*.

Выделение ДНК из проростков проводили по методу Bematzky и Tanksley [9].

ПЦР, клонирование, секвенирование. В работе использовали следующие праймеры: *WxF3*, *WxVTIR*, *WxBAF*, *WxBAR*, *WxVTIF*, *WxVTR* [10]. Полимеразную цепную реакцию проводили на Tetrad 2 Peltier Thennal Cycler («BioRad», США) при условиях, рекомендуемых авторами праймеров. 25 мкл реакционной смеси содержали: 1 х *Taq* - полимеразный буфер («Силекс», Москва), 1.0 U *Taq*-ДНК-полимеразы («Силекс», Москва), 200 мкМ каждого dNTP («Promega»), 0.2 мкМ каждого праймера и 100-150 нг ДНК-матрицы. Концентрация хлорида магния для праймеров 4F, 4R составляла 3.0 мкМ, в остальных случаях — 2.5 мкМ. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2%-м агарозном геле в трисборатном буферном растворе (TBE). В качестве маркера размеров использовали «100 bp Ladder» («Fermentas», Литва). Лигирование амплифицированной ДНК осуществляли в pGEM®-T Easy Vectors. Секвенирование проводили на секвенаторе ABI-3130XL.

Биоинформационный анализ

Выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы Gen Doc [14], поиск гомологичных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей — с помощью алгоритмов *blastn* и *blastp* соответственно [21], определение синонимичности аминокислотных замен — с помощью ресурса SIFT [22].

Результаты и обсуждение

Длина секвенированной последовательности *Wx-B1e* составила 2725 п.н., включая 11 экзонов и 10 интронов, при этом последний экзон был секвенирован не полностью. Размер и структура полученной последовательности является типичной и консервативной для других *ваху*-генов пшеницы [13]. Нуклеотидная после-

довательность *Wx-Ble* опубликована нами и доступна в базе данных GenBank под номером KF305522. BLAST-анализ показал наибольшую степень гомологии среди известных последовательностей к генам *Wx Triticum aestivum subsp. speltct*, *Triticum turgidum subsp. durum*, *Aegilops searsii* и *Aegilops spelt aides*.

Анализ экзонов

Сравнение полученной нами последовательности с последовательностью аллеля *Wx-Blct* показало, что размеры экзонов между *Wx-Blct* и *Wx-Ble* совпадают, за исключением первого экзона (рис. 1).

Wx-Ble (первые две строки) и *Wx-Blct* (вторые две строки). Желтым цветом показаны интроны. Красная стрелка указывает на границу между последовательностями, кодирующими транзитный пептид и зрелый белок.

При анализе *Wx-Ble* было показано, что последовательность, кодирующая транзитный пептид, составляет 210 п.н. Это связано с отсутствием триплета САА, который у *Wx-Blct* находится в положении 160-162. Из-за этого в гипотетической аминокислотной последовательности *Wx-Ble* длиной 80 аминокислот отсутствует глутамин, который имеется у белка *Wx-Blct* в положении 54. Вариация по этому участку характерна для различных аллелей и генов пшеницы и ее дикорастущих сородичей.

В транзитной части первого экзона также было выявлено 10 однонуклеотидных замен: 5 транзиций и 5 трансверсий. В аминокислотном коде только три из них привели к следующим синонимичным заменам: G₁₀₁ на A₁₀₁ (серина-34 на аспарагин-34), G₁₁₇ на A₁₁₇ (пролин-39 на аланин-39), G₁₂₂ на A₁₂₂ (аланин-76 на глицин-75).

Оставшаяся часть первого экзона предположительно кодирует активный сайт белка. В нем нами выявлены одна транзиция и одна трансверсия, которые не привели к заменам аминокислот.

Второй и третий экзоны аллеля *Wx-Ble* совпадали с *Wx-Blct* как по размеру, так и по нуклеотидному составу. По четвертому экзону выявлено семь однонуклеотидных замен (четыре трансверсии и три транзиции), ни одна из которых не привела к замене аминокислот. По пятому экзону показано две транзиции и одна трансверсия, при этом замена G₁₁₇₀-A₁₁₇₁ привела к замене серина-246 на аспарагин-245, ^a G₁₁₈₂-T₁₁₈₃ — к замене аргинина-250 на метионин-249. Анализ шестого экзона показал две трансверсии и три транзиции, из которых G₁₅₇₄-A₁₆₁₀ привела к синонимичной замене аланина-358 на треонин-357, а C₁₅₉₆-T₁₆₃₂ к замене аланина-365 на валин-364. В седьмом экзоне мы установили одну транзицию и одну трансверсию, которые не привели к замене аминокислот. В восьмом экзоне мы выявили две трансверсии, из которых G₂₀₃₂-A₂₀₅₆ вызвала синонимичную замену серин-451 — аспарагин 450. В девятом экзоне нами показаны одна трансверсия и три транзиции, из которых A₂₃₂₃-G₂₃₄₃ привела к замене гистидина-520 на аргинин-519. В десятом экзоне нами показано наличие двух трансверсий и пяти транзиций, из которых A₂₅₂₀-G₂₅₃₂ привела к замене глутаминовой кислоты-554 на глицин-553. В одиннадцатом экзоне, последовательность которого нами была получена не полностью (32 п.н.), содержала одну трансверсию.

Таким образом, в экзонной части *Wx-Ble* нами показана инсерция-делеция по участку, который соответствует нуклеотидам 160-163 *Wx-Blct* (что соответствует глутамину-54); показаны 43 однонуклеотидные замены, из которых 27 (62,8%) являются транзициями, а 16 (59,3%) — трансверсиями. При этом 12 из них привели к замене одних аминокислот на другие, синонимичные им, т.е. все однонуклеотидные мутации относятся к молчащим.

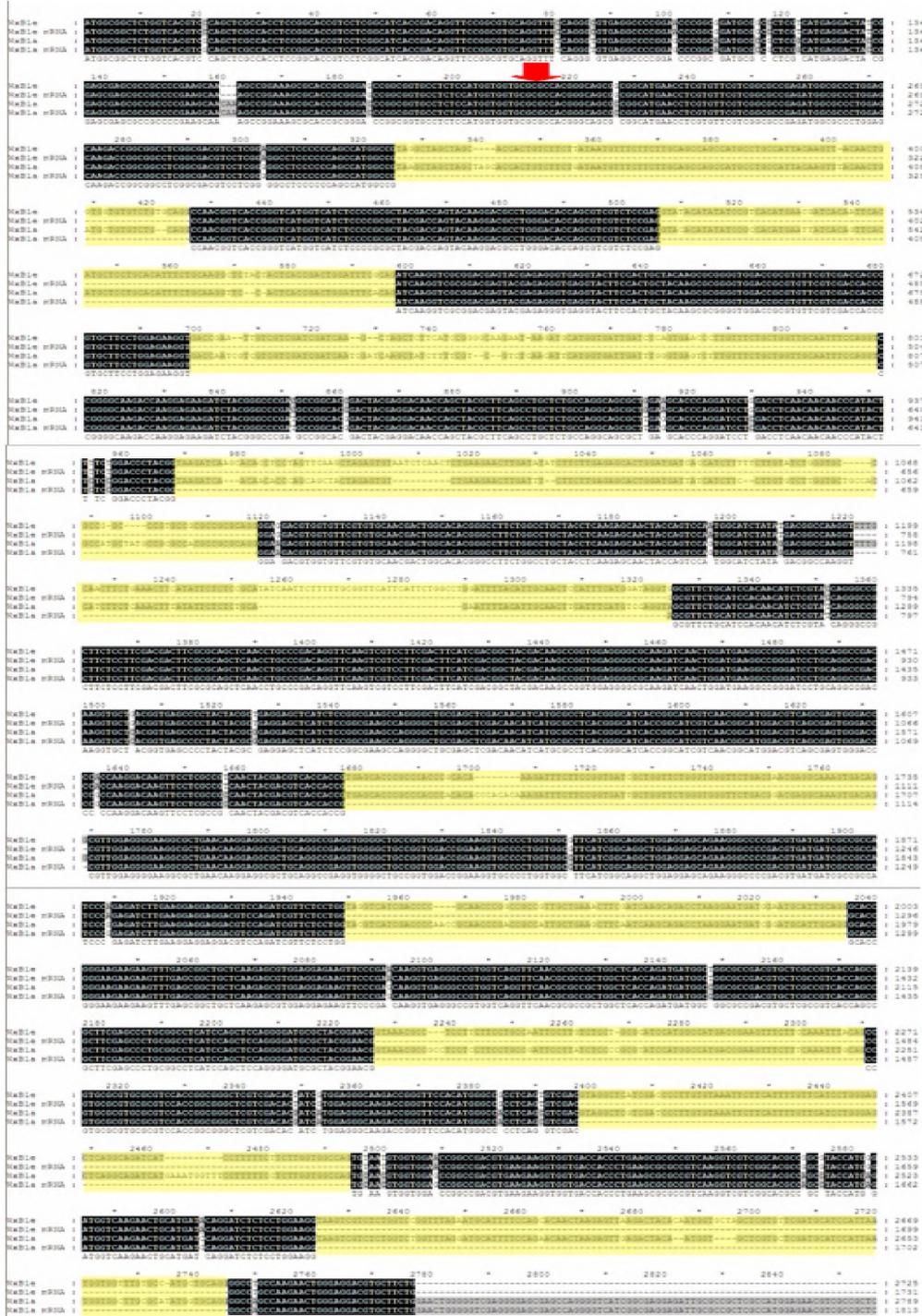


Рис. 1. Выравнивание ДНК- и кДНК-последовательностей аллелей

Vanzetti с соавторами на сорте BuckPoncho (генотип *Wx-Ala*, *Wx-Dlct*, *Wx-Ble*) определили с помощью одномерного SDS-PAGE-электрофореза, что белок *Wx-Ble* отличается от *Wx-B1* а меньшей подвижностью в SDS-геле [16]. Yamamoto показал, что линия с нуль-аллелем по *Wx-A1* и *Wx-D1* и несущая аллель *Wx-Ble* из Bai Huo существенно превышает по содержанию амилозы линии, несущие только аллель *Wx-B1c*, на 4,2-6,7% в зависимости от года [18]. Таким образом, фермент GBSS, получаемый в результате экспрессии аллеля *Wx-Ble*, отличается от ферментов других аллелей гена *Wx-B1* и по массе, и по активности. При этом нами была получена неполная последовательность последнего экзона *Wx-Ble*, так как в гипотетической аминокислотной последовательности отсутствовал стоп-кодон. Следовательно, можно ожидать, что к функциональным изменениям фермента GBSS аллеля *Wx-Ble* могут приводить либо замены, выявленные нами в просеквенированной последовательности, либо в нерасшифрованной части последнего экзона. Что касается большей массы белка GBSS аллеля *Wx-Ble* по сравнению с диким типом *Wx-B1a*, то они могут быть связаны либо с непросеквенированной частью этого аллеля в последнем экзоне, либо с посттранскрипционными модификациями, а именно прохождением сплайсинга мРНК в сайтах, отличных от *Wx-B1a*. Дальнейшее исследование на основе полученной нами последовательности сможет показать причину структурно-функциональных отличий фермента GBSS аллеля *Wx-Ble* от дикого типа и влияние этого аллеля на повышение содержания амилозы в запасном крахмале пшеницы.

При анализе гипотетической аминокислотной последовательности нами показано, что все аминокислотные последовательности относятся к синонимичным. Однако недавние исследования показали, что даже синонимичные нуклеотиды аминокислот могут приводить к изменениям в циркадных ритмах [17]. Фермент GBSS зерна, как было показано Jiang с соавт [12], ночью проявляет большую активность, чем днем, что может быть вызвано циркадными ритмами. Следовательно, выявленные аминокислотные замены могут играть определенную роль в суточном колебании синтеза крахмала в амилопластах зерна. Дальнейший анализ фермента GBSS, экспрессируемого с аллеля *Wx-Ble*, в различных сортах, в том числе российских сортах Нота и Ласточка, покажет роль выявленных замен активности фермента.

Анализ интронов

Интронная часть *Wx-Ble* содержала следующие изменения по сравнению с аллелем *Wx-B1a*. Первый интрон содержал четыре однонуклеотидные замены и три инсерции-делеции, второй — семь и две, третий — двадцать и шесть, четвертый — пятнадцать и восемь, пятый — десять и одну, шестой — три и одну, седьмой — семь и одну соответственно. В целом в интронной области нами было выявлено 85 однонуклеотидных замен и 29 инсерций-делеций.

При этом наибольшая инсерция (32 п.н.) наблюдалась между 1229 и 1265 п.н. в пятом интроне.

В результате анализа последовательностей, гомологичных *Wx-Ble*, было построено филогенетическое дерево (рис. 2).

Как видно из представленного на рисунке 1 филогенетического дерева, аллель *Wx-Ble* мог попасть в геном *Triticum aestivum* из предковой формы субгенома В, общей для твердой и мягкой пшеницы. Полученное дерево в целом укладывается в современное представление о филогенетике мягкой пшеницы, согласно которому пред-

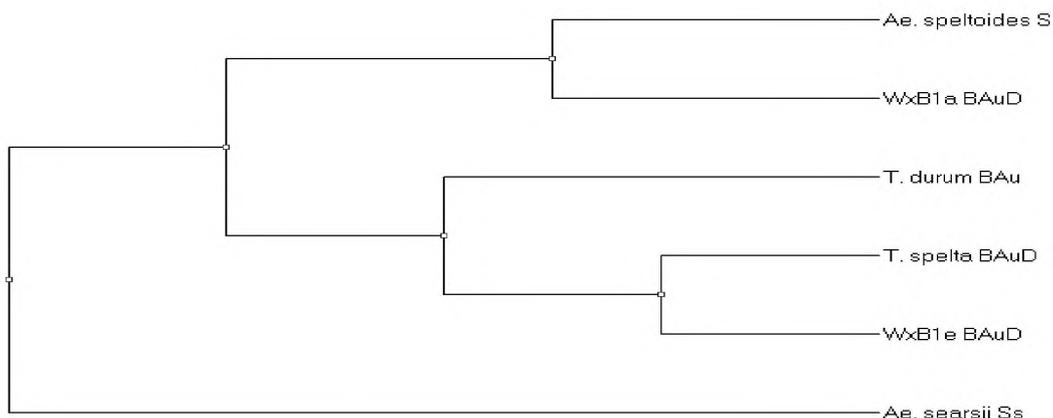


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа нуклеотидной последовательности аллеля *Wx-B1e* *T. aestivum* и наиболее гомологичных ей последовательностей других видов пшеницы. Рядом с названием вида указана его геномная конституция

ковая форма *Ac. speltoides* является гипотетическим донором В-субгенома мягкой и твердой пшеницы [11]. С другой стороны, данный аллель мог попасть в геном мягкой пшеницы в результате скрещиваний с твердой пшеницей или со спельтой.

Заключение

Итак, в результате нами были получены следующие результаты:

1. Получена последовательность аллеля *Wx-Ble* мягкой пшеницы размером 2725 п.н.
2. Показана гомология к видам *Triticum aestivum subsp. spelta*, *Triticum turgidum subsp. durum*, *Aegilops searsii* и *Aegilops speltoides*.
3. По сравнению с аллелем дикого типа *Wx-Bla* исследованный нами аллель несет в экзонной части одну инсерцию и 43 однонуклеотидные замены, по интронной части — 85 однонуклеотидных замен и 29 инсерций-делеций.
4. Обсуждается возможная роль аминокислотных замен в особенностях фермента GBSS, экспрессируемого с аллеля *Wx-Ble*, и возможное происхождение этого аллеля.

Библиографический список

1. Абдулина И.Р., Вафин Р.Р., Ржанова И.В., Гараева А.Л., Асхадуллин Д.Ф., Васио-ва Н.З., Зайнуллин Л.И., Алгшоев Ф.К. Молекулярная идентификация генотипов яровой пшеницы по аллельным вариантам *waхu*-генов // Фундаментальные исследования. 2013. № 1-1. С. 13-17.
2. Абдулина И.Р., Вафин Р.Р., Тюлькин С.В., Зайнуллин Л.И., Алгшоев Ф.К., Асхадуллин Д.Ф., Askhadullin D.F., Васиоева Н.З. Выявление нулевого *Wx-B1b*-аллеля *waхu*-гена у генотипов яровой пшеницы отечественной селекции // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 2. С. 404.
3. Дивашук М.Г., Климушина М.В., Карлов Г.М. Молекулярно-генетическая характеристика аллеля *Wx-Ble* мягкой пшеницы и применимость ДНК маркеров для его идентификации // Генетика. 2011. Т. 47. № 12. С. 1611-1615. (Divashuk M.G., Klimushina M.V., Kar-

lov G.I. Molecular genetic characteristics of the *Wx-B1e* allele from common wheat and applicability of the DNA markers for its identification. Russian Journal of Genetics. 2011. Т. 47. № 12. С. 1428-1432).

4. Климущина А.В., Гладких Н.И., Дивашук М.Г., Беспалова Л.А., Васильев А.В., Карлов Г.П. Распределение аллелей генов *Wx* в коллекции мягкой пшеницы Краснодарского НИИСХ им. П.П. Лукьяненко // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012. Т. 16. № 1. С. 187-192.

5. Климущина М.В., Дивашук М.Г., Карлов Г.П. Молекулярно-генетическая характеристика коллекции мягкой пшеницы по генам, отвечающим за хлебопекарные и технологические качества муки // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2009. № 3. С. 81-88.

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

7. Рыжкова Т.А., Третьяков М.Ю., Моторина П.П., Нецветаев В.П. Влияние генов *Wx* на хлебопекарные качества мягкой пшеницы // Достижения науки и техники АПК. 2012. №4. С. 21-23.

8. Рыжкова Т.А., Третьяков М.Ю., Нецветаев В.П., Сорокопудова О.А., Акинишина О.В., Аркадьева А.В. Гены *wx* и реологические свойства шрота мягкой пшеницы // Научные ведомости Белгородского государственного университета. 2012. Т. 20. № 15. С. 46-50.

9. Bernatzky R., Tanksley S.D. Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences // Genetics. 1986. Vol. 112. P. 887-898.

10. 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. Vol. 28. P. 403-411.

11. Haider N. The origin of the B-genome of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Russian Journal of Genetics. 2013. Vol. 49. P. 263-274.

12. Jiang D., Cao W.-X., Dai T.-B., Jing Q. Diurnal Changes in Activities of Related Enzymes to Starch Synthesis in Grains of Winter Wheat // Acta Botanica Sinica. 2004. Vol. 46. P. 51-57.

13. Murai J., Taira T., Ohta D. Isolation and characterization of the three *Waxy* genes encoding the granule-bound starch synthase in hexaploid wheat // Gene. 1999. Vol. 234. P. 71-79.

14. Nicholas K.B., Nicholas H.B. Jr., Deerfield D. W. II. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. EMBNEW. NEWS. 1997. Vol. 4. P. 14.

15. Starch: Basic Science to Biotechnology: Basic Science to Biotechnology. Editors M.N. Sivak, J. Preiss, S. Taylor. Academic Press, 1998. P. 120.

16. Vanzetti L.S., Pflüger L.A., Rodriguez-Oujano M., Carrillo J.M., Helguera M. Genetic variability for *waxy* genes in Argentinean bread wheat genoplasm // Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458. Vol. 12. No. 1. Issue of January 15, 2009.

17. Nti Y, Ma P., Shah P., Rokas A., Liu Y, Johnson C.H. Non-optimal codon usage is a mechanism to achieve circadian clock conditionality // Nature. 2013. Режим доступа: <http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/full/nature.11942.htm>

18. Yamamori M. Amylose content and starch properties generated by five variant *Wx* alleles for granule-bound starch synthase in common wheat (*Triticum aestivum* L.) // Euphytica. 2009. Vol. 165. P. 607-614.

19. 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. Vol. 89. P. 179-184.

20. Yamamori M., Quvnh N.T. Differential effects of *Wx-A1*, *-B1* and *-D1* protein deficiencies on apparent amylose content and starch pasting properties in common wheat // Theor. Appl. Genet. 2000. Vol. 100. P. 32-38.

21. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

22. <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *WX-BLE* ALLELE
01 COMMON WHEAT

M.V. KLIMUSHINA, P. YU. KRUPIN, M.G. DIVASHUK, G.I. KARLOV

(RSAU-MA A named after K.A. Timiryazev)

In this study 2725 bp sequence of Wx-Ble allele of common wheat was obtained. The homology of Wx-Ble sequence to the sequences of Triticum aestivum subsp. spelta, Triticum turgidum subsp. durum, Aegilops searsii and Aegilops speltoides species was shown. It was also revealed that single nucleotide substitutions in the exons resulted only in synonymous amino acid substitutions, i.e. such substitutions are silent.

Keywords: common wheat, genes Wx, Wx-Ble, exon, intron.

Климушина Марина Вячеславовна — аспирант Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49; e-mail: mklinjushina@gmail.com).

Крупин Павел Юрьевич — к. б. н., старший научный сотрудник Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49, e-mail: Pavelkroupin1985@gmail.com).

Дивашук Михаил Георгиевич — к. б. н., старший научный сотрудник Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49; e-mail: divashuk@gmail.com).

Карлов Геннадий Ильич — д. б. н., руководитель Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49; e-mail: karlovg@gmail.com).