

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
КОЛЛЕКЦИИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ПО ГЕНАМ,
ОТВЕЧАЮЩИМ ЗА ХЛЕБОПЕКАРНЫЕ
И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ КАЧЕСТВА МУКИ

М.В. КЛИМУШИНА, М.Г. ДИВАШУК, Г.И. КАРЛОВ

(Центр молекулярной биотехнологии)

С помощью аллель-специфичных маркеров была дана характеристика аллельного состояния генов высоко- и низкомолекулярных глютеинов, локализованных в геноме D коллекции сортов мягкой пшеницы российской и украинской селекции. При изучении аллельного состояния высокомолекулярных глютеинов было показано, что в 39 из 40 образцов имеется аллель «5+10», присутствие которого повышает хлебопекарные качества. В случае низкомолекулярных глютеинов было показано преимущественное наличие *Glu D3-4* 3-гаплотипов. Была оценена возможность применения ряда молекулярных маркеров для быстрого поиска нуль-аллелей *waxy* генов в изучаемой коллекции. Было показано, что не все ранее опубликованные в других работах маркеры являются эффективными. В то же время с использованием эффективных ДНК-маркеров в коллекции выявлено два сорта, один из которых несет в своем геноме нуль-аллель *goh-A 1*, а второй — *wx-B1*. Эти данные подтверждены также с использованием методов протеомики.

Ключевые слова: пшеница, хлебопекарные качества, молекулярное маркирование, 2-D электрофорез, *waxy*-гены.

Пшеница является одной из самых распространенных и важнейших с.-х. культур земного шара. Более половины населения нашей планеты питается продуктами, получаемыми из зерна этой культуры. При этом значительная часть зерна идет на выпечку хлеба, хлебобулочных и макаронных изделий [2].

Хлебопекарные качества сортов мягкой пшеницы определяются в основном двумя факторами: газообразующей способностью и газоудерживающей силой теста. На газообразующую способность теста влияет содержание естественных сахаров, качество крахмала и ферментативная активность амилазы. Газоудерживающая сила зависит от содержания клейковины и ее качества, протеолитической актив-

ности протеаз, способности клейковины удерживать в тесте выработанный дрожжами углекислый газ [1].

Клейковина, формирующаяся в тесте, представляет собой полимер коротких субъединиц глютеина и липидов, в совокупности дающих эластичность и силу теста. В мягкой пшенице белки, формирующие клейковину, закодированы в локусах, картированных в 1 и 6 гомеологических группах хромосом [7]. Белки клейковины представлены глиадинами, высокомолекулярными (HMW-GS) и низкомолекулярными (LMW-GS) глютеинами. Каждый класс запасных белков влияет на особенности теста, такие как сила, эластичность, консистенция и т.д., что, в свою очередь, сказывается на качестве хлеба.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», ГК № 02.740.11.0286.

Ряд исследователей установили корреляцию между присутствием определенных аллельных вариантов высокомолекулярных глютеинов HMW-GS и силой теста. Было показано, что кодируемый локусом *Glu-D* аллельный вариант HMW «5+10» повышает хлебопекарные качества, в то время как наличие варианта «2+12» приводит к снижению хлебопекарных свойств пшеницы [4, 8].

Низкомолекулярные глютеины LMW-GS и в меньшей степени глиадин также оказывают влияние на хлебопекарные качества, так как они составляют около 1/3 от общего количества запасных белков и 60% от глютеиновой фракции. Однако роль индивидуальных низкомолекулярных глютеинов LMW-GS менее изучена, так как большое количество их субъединиц имеют одинаковую подвижность в одномерном полиакриламидном геле-электрофорезе SDS-PAGE. Так, гены локуса *Glu-3*, кодирующие низкомолекулярные глютеины, представлены семьей мультигенов, включающих 30~40 малоизученных генов [10].

Кроме запасных белков на хлебопекарные и технологические свойства зерна пшеницы влияет количество и соотношение различных групп углеводов, необходимых для развития дрожжей в тесте. Наиболее значимым из них является крахмал эндосперма, представленный амилозой и амилопектином. Ключевым ферментом в синтезе амилозы эндосперма является *granule-bound starch synthasa (GBSS)*, которую кодируют гены, получившие название *Waxy* [9]. В пшенице три гомеологичных *GBSSI*-гена расположены в хромосомах 7AS (*Wx-A1*), 4AL (*Wx-B1*), и 7DS (*Wx-D1*) [6]. Крахмал *waxy*-мутантов пшеницы (имеющих нуль-аллели по всем трем *waxy*-генам) полностью состоит из амилопектина, что необходимо для изготовления лапши быстрого приготовления. Кроме

того, выведение сортов мутантных по *waxy*-генам позволит получать муку с оптимальным содержанием амилозы, необходимую для изготовления высококачественных продуктов без химической модификации крахмала.

Характеристика аллельного состава генов, отвечающих за качественные показатели муки существующих сортов мягкой пшеницы, является важной задачей. Это позволит провести исследования по оценке их роли и степени влияния на показатели качества.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) — наиболее простой и эффективный способ идентификации аллельных вариантов различных генов. Идентифицировать аллельные варианты генов также можно с помощью системы двумерного полиакриламидного геле-электрофореза (2D-PAGE) белков. Этот метод является одним из перспективнейших методов в протеомных исследованиях, так как на порядок увеличивает разрешающую способность исследований по сравнению с одномерным электрофорезом.

В нашей работе проведено исследование аллельного состояния генов, отвечающих за качественные показатели муки сорока сортов и линий озимой пшеницы.

Материалы и методы

Растительный материал: В работе использовали сорок сортов и линий озимой пшеницы* (табл. 3) В качестве контролей использовали сорта мягкой пшеницы с уже известным аллельным составом генов запасных белков: Новосибирская 67, Иволга, Мироновская 808.

Выделения ДНК из растительного материала: ДНК выделяли по методу Bernatzky и Tanksley (1986) с некоторыми модификациями [3].

Примеры и условия проведения ПЦР: Наличие локуса высокомолекулярного глютеина с комбинацией

* Коллекция любезно предоставлена проф. В.П. Нецветаевым.

субъединиц «5+10» определяли с использованием праймеров: Dx5F, DxF, DxR.

Праймеры, с помощью которых выполняли анализ аллельных вариантов низкомолекулярных глютенинов и выявляли нуль-аллели гоажу-генов, приведены в таблицах 1 и 2.

Кроме того, для определения нуль-аллелей *Wx-D1* генов использовали кодоминантные маркеры со следующей комбинацией праймеров: *Wx-D1-1-F*, *Wx-D1-1-R* и *Wx-D1-2-F*, *Wx-D1-2-R* [12], при условиях: денатурация 3 мин при 95°C, затем 40 циклов : 94°C/30 с; 55°C/45 с; 72°C/ 1 мин; 1 цикл 72°C в течение 5 мин.

Выделение белка для двумерного полиакриламидного геля электрофореза (2D-PAGE): Белки выделяли из эндосперма зерновки с помощью 8атр1е-буфера (вода для хроматографии, 5% амфолины (pH 3 —10), 80 mM ДТТ, 16,7% раствора 30% CHAPS + 10% NP40). Затем образцы

центрифугировали при 13000 об/мин в течение 15 мин. Для анализа брали 60 [Л образца.

Двумерный полиакриламидный гель электрофорез 2D-PAGE: Для изоэлектрофокусирования использовали стрипы длиной 7 см с диапазонами pH 3~10 и pH4~7 (BioRAD). Регидратация проходила в течение 15 ч. Собственно изоэлектрофокусирование проводили на приборе PROTEIN-IEF (BioRAD).

После первого разделения делали одноэтапную эквilibровку стрипов в SDS-буфере (6M мочевины, 0,375 M Tris-HCl pH8,8, 2% SDS, 20% glycerol, 2% DTT). После эквilibровки стрипы переносили на поверхность 12% полиакриламидного геля и закрепляли 0,9% агарозой с бромфеноловым синим. Электрофорез проводили в буфере, содержащем 0,25 mM Tris, 19,2 mM глицин, 0,1% додецилсульфат натрия в следующем режиме: по 10 тА на стекло 15 мин, по 20 тА на стекло 8 ч.

Т а б л и ц а 1

Праймеры и условия амплификации *Glu-D3* вариантов [11]

| Гаплотипы <i>Glu-D3</i> гена | Праймеры | Условия ПЦР |
|------------------------------|----------------|----------------------------------|
| <i>Glu D3-21/22</i> | M2F12 M2R12 | 94°C/40 с; 64°C/40 с; 72°C/ 90 с |
| <i>Glu D3-22</i> | M2F2 M2R2 | 94°C/40 с; 64°C/40 с; 72°C/60 с |
| <i>Glu D3-23</i> | M2F3 M2R3 | 94°C/40 с; 64°C/40 с; 72°C/ 60 с |
| <i>Glu D3-31</i> | M3F1 M3R1 | 94°C/45 с; 56°C/45 с; 72°C/ 80 с |
| <i>Glu D3-32</i> | M3F2 M3R2 | 94°C/30 с; 59°C/30 с; 72°C/ 60 с |
| <i>Glu D3-41</i> | M4F1 M4R1 | 94°C/45 с; 59°C/45 с; 72°C/ 90 с |
| <i>Glu D3-43</i> | M4F3 M4R3 | 94°C/30 с; 61°C/30 с; 72°C/ 60 с |

Т а б л и ц а 2

Праймеры для идентификации нуль-аллелей *wx*-генов [5]

| <i>wx</i> -гены | Праймеры | Условия ПЦР |
|------------------------------|-----------------------|---|
| <i>wx-A1</i> <i>wx-B1</i> | AFC, AR2 BDFL, BRD | Денатурация 5 мин при 95°C, затем 32 цикла: 95°C/30 с; 65°C/30 с; 72°C/ 2 мин и 1 цикл 72°C в течение 7 мин |

Результаты и их обсуждение

В последние годы были клонированы и секвенированы гены, контролирующие высокомолекулярные глютенины. На основе нуклеотидных последовательностей были разработаны праймеры, специфично выявляющие «5+10» и «2+12» аллели локуса *Glu-D* [5]. В нашей работе было проведено изучение коллекции 40 сортов мягкой пшеницы на аллельное состояние высокомолекулярных глютеинов локуса *Glu-D* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Эти сорта обладают высокими хлебопекарными качествами. При проведении ПЦР-анализа было выявлено, что 39 сортов мягкой пшеницы несут locus «5+10» в гомозиготном состоянии. Только в одном сорте (Золотоколосая) был выявлен аллельный вариант «2+12» (рис. 1). Возможно, в этом сорте наличие аллельного варианта «2+12» компенсируется другими запасными белками, также играющими важную роль в определении хлебопекарных качеств.

В связи с тем, что низкомолекулярные белки составляют 40% от общего содержания запасных белков семени, они оказывают значительное влияние на качество теста и муки пшеницы. Нами были использованы ДНК маркеры генов *Glu D3-21/22*, *Glu D3-22*, *Glu D3-23*, *Glu D3-31*, *Glu D3-32*, *Glu D3-41* и *Glu D3-42* [11]. В результате проведения ПЦР было получено следующее распределение гаплотипов локуса *Glu D3* в исследуемых сортах озимой пшеницы (табл. 3).

Наиболее часто в исследуемой коллекции встречались гены *Glu D3-23*, *Glu D3-32* и *Glu D3-43*. При использовании маркера *Glu D3-31* не было обнаружено ни одного сорта, несущего данный ген. Это связано либо с малой распространенностью указанного гена среди сортов озимой пшеницы российской и украинской селекции, либо с тем, что данный молекулярный маркер работает на данных сортах не совсем корректно. Следует обратить особое внимание на аллель *Glu D3-43*. Он присутствует практически у всех

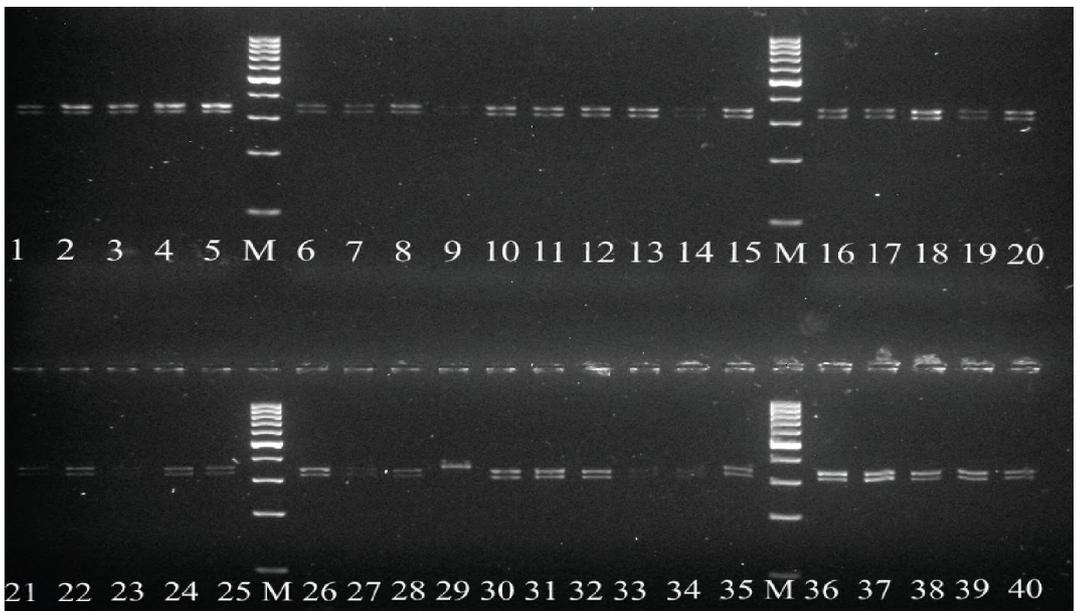


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами Dx 5F, DxR, DxR (M — маркер размеров, номерами 1-40 отмечены исследуемые сорта)

Таблица 3

Распределение гаплотипов локуса *Glu D3* в сортах озимой пшеницы

| № | Сорт | <i>Glu D3-21/22</i> | <i>Glu D3-22</i> | <i>Glu D3-23</i> | <i>Glu D3-31</i> | <i>Glu D3-32</i> | <i>Glu D3-41</i> | <i>Glu D3-43</i> |
|----|---------------------|---------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1 | Волжская 100 | + | + | - | - | - | - | + |
| 2 | Харьковская 107 | + | + | - | - | + | - | + |
| 3 | Безенчукская 380 | - | - | + | - | + | - | + |
| 4 | Московская 39 | - | - | + | - | + | - | + |
| 5 | Белгородская 12 | - | - | + | - | + | - | + |
| 6 | Краснодарская 99 | - | - | + | - | + | - | + |
| 7 | Коротышка | - | - | - | - | - | - | + |
| 8 | Синтетик | + | - | - | - | - | - | + |
| 9 | Донецкая 48 | + | + | - | - | - | + | - |
| 10 | Селянка одесская | + | + | - | - | - | - | + |
| 11 | Льговская 4 | - | - | + | - | + | - | + |
| 12 | Перлина лісостепу | - | - | + | - | + | - | + |
| 13 | Финт | - | - | + | - | + | - | + |
| 14 | Ариадна | - | - | - | - | - | - | + |
| 15 | Одесская 267 | + | - | - | - | - | - | + |
| 16 | Крыжинка | - | - | + | - | + | - | + |
| 17 | №500 | + | + | - | - | - | - | + |
| 18 | Херсонская безостая | + | + | - | - | - | - | + |
| 19 | Фея | - | - | + | - | + | - | + |
| 20 | Белгородская 16 | - | - | + | - | + | - | + |
| 21 | Копилівка | + | - | - | - | + | - | + |
| 22 | БелНИИСХ 1 | + | + | - | - | + | - | + |
| 23 | Старшина | - | - | + | - | - | - | + |
| 24 | Юбилейная 100 | + | - | - | - | + | - | + |
| 25 | Зимородок | + | - | - | - | - | - | + |
| 26 | Пал Пич | - | + | + | - | + | - | + |
| 27 | Уманка | - | - | - | - | - | - | + |
| 28 | Селянка Краснодар | - | - | + | - | + | + | - |
| 29 | Золотоколосья | - | - | + | - | + | - | + |
| 30 | Дельта | - | - | + | - | + | - | + |
| 31 | Лира | - | - | + | - | + | + | - |
| 32 | Памяти Калиненко | - | - | + | - | - | - | + |
| 33 | Повага | - | + | + | - | - | - | + |
| 34 | Светоч | - | + | + | - | + | - | + |
| 35 | Батько | + | - | - | - | - | - | + |
| 36 | Дон 85 | - | - | + | - | + | - | + |
| 37 | Красота | - | + | + | - | + | - | + |
| 38 | Богданка | + | - | - | - | + | - | + |
| 39 | Харус | - | - | + | - | + | - | + |
| 40 | Дея | - | - | + | - | + | + | - |

сортосов коллекции, за исключением четырех. А так как данная коллекция формировалась только из сильных сортосов и линий пшеницы, то можно предположить, что этот аллель связан с повышенными качественными показателями зерна пшеницы. Однако это предположение требует дальнейшего подтверждения.

Кроме запасных белков важную роль в формировании технологических свойств зерна пшеницы играет

состав крахмала эндосперма. При этом количественное содержание амилозы в крахмале оказывает значительное влияние на его качества и свойства. Регулировать содержание амилозы в крахмале возможно при использовании нуль-аллелей *waxy*-генов в селекционной работе. В нашем исследовании была оценена возможность применения ряда молекулярных маркеров для быстрого поиска нуль-аллелей *waxy* генов. При проведении ПЦР-анализа

нуль-аллелей эффективными оказались комбинации праймеров AFC — AR2нBDFL — BRD, созданные для вы-

явления нуль-аллелей *wx-A1* и *wx-B1* (рис. 2 и рис. 3). В результате было выявлено, что сорт Старшина несет

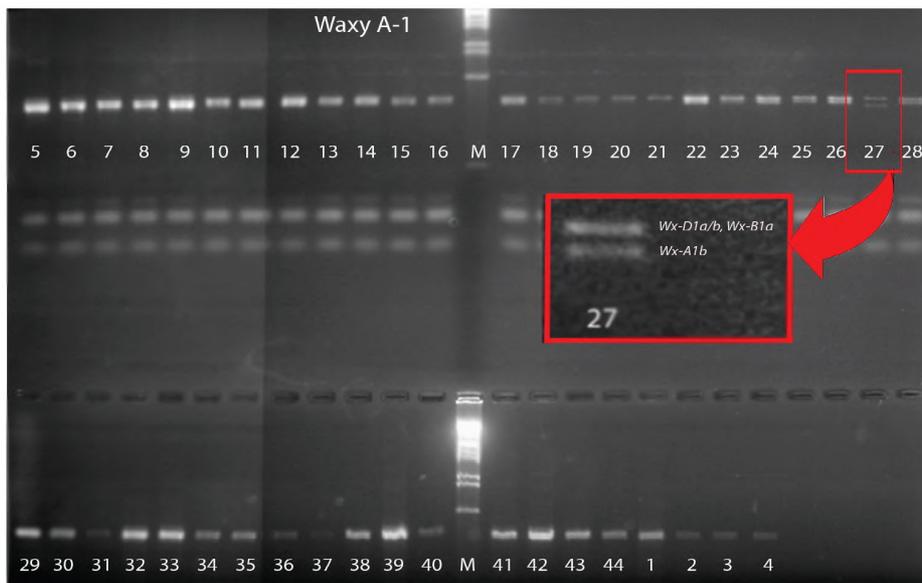


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами AFC и AR2 (M — маркер размеров, номерами 1-44 отмечены исследуемые сорта)

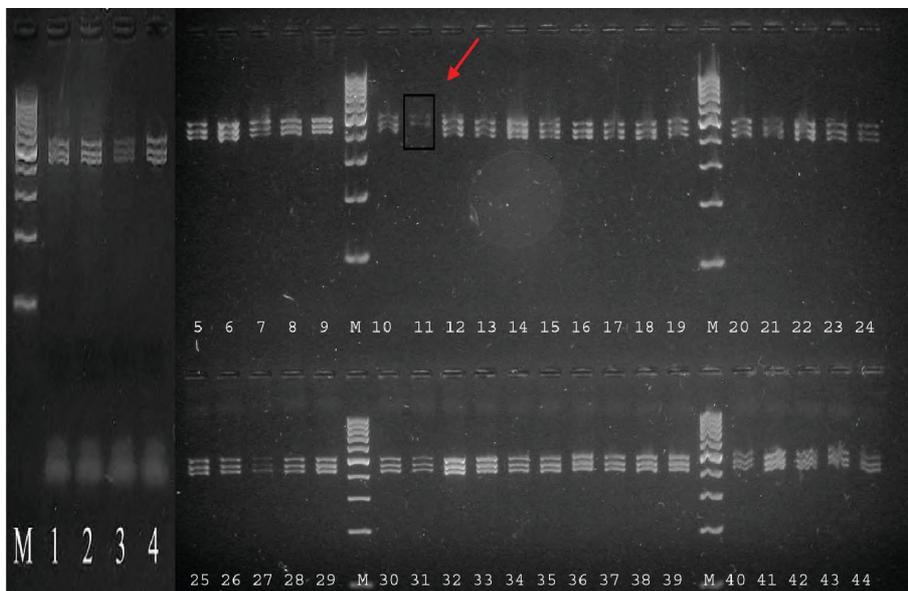


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами BDFL и BRD (M — маркер размеров, номерами 1-44 отмечены исследуемые сорта)

в своем геноме нуль-аллель по гену *wx-A1*, а сорт Коротышка нуль-аллель по гену *wx-B1*.

При использовании комбинации праймеров BDFL — DRSL, специфичных для *Wx-D1*, амплификации не было. Это согласуется с данными создателей данного маркера, которые отмечали, что он работает только на их собственных образцах. Кроме того, для определения нормальных и нуль-аллелей *Wx-D1*-генов использовали кодоминантный маркер со следующими двумя комбинациями праймеров: *Wx-D1-1-F* и *Wx-D1-1-R* и *Wx-D1-2-F* и *Wx-D1-2-R* [12]. С первой парой праймеров амплификации также не наблюдалось. В случае второй комбинации праймеров амплификацию ДНК наблюдали для 32 сортов. При этом все сорта несли локус дикого типа. Таким образом, для оставшихся вось-

ми сортов Коротышка, Льговская 4, Зимородок, Уманка, Селянка Краснодарская, Памяти Калиненко и Харус для характеристики их аллельного состояния по гену *Wx-D1* необходимо использование других методов.

Для подтверждения наличия нуль-аллелей *waxy*-генов на уровне экспрессии белков у сорта Старшина нами была применена методика двумерного электрофореза. Изоэлектрическая точка *waxy*-белков располагается в диапазоне рН 5,5-6,5. На рисунке 4 отмечен сектор, в котором располагаются *waxy*-белки. В этом секторе имеются только белки, продуцируемые *wx-B1* и *wx-D1* генами, и отсутствует белок, характерный для гена *wx-A1*. Таким образом, эти данные указывают на эффективность применения ДНК маркеров для скрининга образцов на наличие нуль-аллелей по *waxy*-генам.

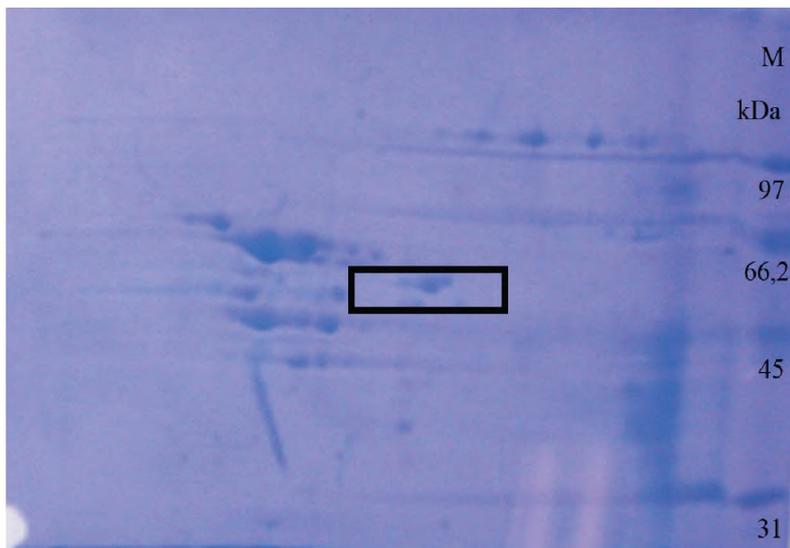


Рис. 4. 2D-PAGE сорта Старшина, несущего нуль-аллель по *wx-A1* гену

Таким образом, нами дана молекулярно-генетическая характеристика коллекции 40 сортов озимой пшеницы по наличию аллельных вариантов генов, отвечающих за хлебопекарные и технологические качества

пшеницы. Изученные сорта и ДНК маркеры могут быть использованы в дальнейших работах по изучению роли генетического полиморфизма генов в формировании качества зерна пшеницы.

Выводы

1. С помощью аллель-специфичных маркеров дана характеристика аллельного состояния генов высоко- и низкомолекулярных глютенинов, локализованных в геноме D коллекции сильных сортов мягкой пшеницы российской и украинской селекции.

2. При изучении аллельного состояния высокомолекулярных глютенинов показано, что в 39 из 40 образцов имеется аллель «5+10», присутствие которого повышает хлебопекарные качества.

3. С помощью молекулярных маркеров и двухмерного электрофореза белков выявлены два сорта, один из которых несет в своем геноме нуль-аллель гена *goh-A1*, а второй — *wx-B1*.

Библиографический список

1. Долгодворова Л.И. Селекция полевых культур на качество. М.: Издательство МСХА, 1995.
2. Пыльное В.В., Коновалов Ю.Б., Хунацария Т.И. и др. Частная селекция полевых культур / Под. ред. В.В. Пыльнева. М.: КолосС, 2005.
3. Bernatzky R., Tanksley S.D. Toward a saturated linkage map in tomato based on isozyme and random cDNA sequences // *Genetics*, 1986. Vol. 112. P. 887-898.
4. Horvard D., Jurcovic Z., Sudar R., Pavlinic D., Simic G. The relative amounts of HMW glutenin subunits of OS wheat cultivars in relation to bread-making quality // *Cereal Res.*, 2002.
5. Ishikawa G., Nakamura T. A new co-dominant PCR-based marker to identify the high-molecular-weight glutenin subunit combination «5+10» of common wheat // *Wheat Information Service*, 2007. 103. P. 1-4.
6. Nakamura T., Vrinten P., Saito M. and Konda M. Rapid classification of partial waxy wheats using PCR-based markers // *NRC Canada*, 2002.
7. Payne P.I. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality // *Annual Reviews of Plant Physiology*, 1987.
8. Shewry P.R., Halford N.G. and Tatham A.S. High molecular weight subunits of wheat glutenin // *J. Cereal Sci.*, 1992.
9. Shure M., Wessler S. and Fedoroff N. Molecular identification of the waxy locus in maize // *Cell*, 1983.
10. Tanaka H., Toyoda S., Tsijmoto H. Diversity of Low-Molecular-Weight glutenin subunit genes in Asian common wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Breeding Science*, 2005.
11. Zhao X.L., Xia X.C., He Z.H., Lei Z.S., Ma W., Sun Q.X. Novel DNA variations to characterize low molecular weight glutenin Glu-D3 genes and develop STS markers in common wheat // *Theor. Appl. Genet*, 2006.
12. <http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Waxy/index.htm>

Рецензент — д. б. н. А.А. Соловьев

SUMMARY

The collection of Russian and Ukrainian cultivars of bread wheat has been characterized in relation to the allelic condition of the genes which encode high- and low-weight molecular glutenin and are localized in D-genome. As a result, the allele «5+10» has been shown to present in 39 of 40 samples analyzed. The Glu D3-43 haplotype has been found to be prevailing in case of low-weight molecular glutenin. The possibility to apply the number of the molecular markers for the quick search of the waxy gene null-alleles in the studied collection was assessed. Not all the previously published markers have appeared to be efficient. At the same time, the two cultivars have been revealed from which the first one carries *wx-A1*, while the second carries *wx-B1*. The data have been confirmed by means of proteomic methods.

Key words: wheat, bread-making quality, molecular targeting, 2D-electrophoresis, waxy-genes.