

И.В. ПЕТРОВА<sup>1</sup>, С.В. ЧЕБОТАРЬ<sup>1</sup>,  
А.И. РЫБАЛКА<sup>2</sup>, Ю.М. СИВОЛАП<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН, МОН  
Украина, 65036, Одесса, Овидиопольская дор., 3  
E-mail: genom2005@ukr.net

<sup>2</sup> Селекционно-генетический институт – Национальный центр  
семеноводства и сортоиспытания УААН,  
Украина, 65036, Одесса, Овидиопольская дор., 3

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ Wx-ГЕНОТИПОВ СРЕДИ СОРТОВ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ



Использование ПЦР-анализа с аллель-специфичными праймерами при тестировании аллельного состояния Wx-генов в генотипах, зарегистрированных в Государственном реестре сортов пшеницы (2006 г.), позволило выявить отсутствие мутаций по указанным генам в исследованной группе сортов. Отмечено варьирование размера и интенсивности окрашивания крахмальных гранул у данных сортов.

© И.В. ПЕТРОВА, С.В. ЧЕБОТАРЬ, А.И. РЫБАЛКА,  
Ю.М. СИВОЛАП, 2007

**Введение.** Крахмал – основной запасной углевод зерна пшеницы. Содержание крахмала в муке хлебных злаков составляет 70–80 %. В зерне запасной крахмал накапливается в виде крахмальных гранул. Гранулы крахмала (дискретные, не растворимые в воде элементы, размер которых варьирует от 1 до 100 мкм) имеют сложный состав и структуру. У большинства представителей *Triticeae* крахмальные гранулы делят на тип А (5–45 мкм) и тип Б (1–5 мкм). Гранулы обычно состоят из  $\frac{3}{4}$  амилопектина и  $\frac{1}{4}$  амилозы, а также небольшого количества неспецифических веществ (липиды, белки) [1–3]. Структурные различия между указанными полимерами определяют отличия функций и качества крахмала.

Содержание амилозы и амилопектина в крахмале варьирует у различных видов сельскохозяйственных культур, которые используются как крахмал-содержащее сырье на предприятиях мукомольной, хлебопекарной, кондитерской, пивоваренной, спиртовой и других отраслей промышленности. Процентное содержание упомянутых компонентов влияет на изменение реологических свойств водных суспензий крахмала в процессе клейстеризации.

Колебание содержания амилозы с тенденцией к снижению (от 20 до 0 %) существенно влияет на технологические качества крахмала и муки пшеницы. Ключевым ферментом синтеза амилозы в гранулах крахмала является фермент *GBSSI* (granule-bound starch synthase = ADP glucose starch glycosyl transferase, EC2.4.1.21 = *GBSSI*), который также называют *Wx*-протеином (молекулярная масса 60 кДа).

*Wx*-протеины кодируются генами с соответствующим названием *Wx*. Гены идентифицированы и локализованы у пшеницы *Wx-A1* (7AS), *Wx-B1* (4AL), *Wx-D1* (7DS) [4]. Локусы *Wx*-протеинов имеют функциональные аллели, кодирующие синтез определенного *Wx*-протеина, и нефункциональные (нуль) аллели, блокирующие данный синтез. Для локуса *Wx-A1* функциональными являются аллели *Wx-A1a*, *Wx-A1c* и нуль-аллель *Wx-A1b*. Локус *Wx-B1* у *Triticum aestivum* L. имеет функциональные аллели *Wx-B1a*, *Wx-B1c*, *Wx-B1e*, *Wx-B1f* и нефункциональный аллель *Wx-B1b*. Локус *Wx-D1* отличается по аллельному составу от двух предыдущих наличием двух нуль-аллелей – *Wx-D1b* и *Wx-D1e*, а также имеет функциональные аллели *Wx-D1a*, *Wx-D1c*, *Wx-D1d*,

*Wx-D1f* [5]. Нуль-аллели по локусам *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* оказывают неравноценное влияние на содержание амилозы в крахмале. Наиболее существенное снижение содержания амилозы оказывает нуль-аллель гена *Wx-B1* [6, 7]. Согласно исследованиям Yamamoto et al. [17] различное сочетание функциональных и нуль-аллелей по *Wx*-локусам влияет на накопление амилозы в крахмале зерна (табл. 1). Представляет значительный интерес идентификация функциональных и нефункциональных аллелей *Wx*-генов в генотипах сортов пшеницы, предложенных к районированию на территории Украины. Наличие трех нефункциональных аллелей приводит к полной элиминации *GBSS1* и блокированию синтеза амилозы [7].

Зерно *Wx*-пшениц в отличие от зерна обычной пшеницы имеет значительно больший процент разрушенных крахмальных гранул при помоле, что оказывает влияние на повышение водопоглощающей способности и амилитической активности муки [9]. Эффект указанного явления проявляется в повышении водопоглощающей способности и амилитической активности муки. Для *Wx*-пшениц показатель водопоглощающей способности аномально высок и составляет 75 % и выше, в то время как у обычных хлебопекарских пшениц аналогичный показатель не превышает 56–58 % [15]. В связи с этим предложено использовать муку, полученную из *Wx*-пшениц, только в смеси с мукой хлебопекарских [12]. Хлеб, выпеченный с добавлением 20–30 % муки *Wx*-пшениц, имеет отличные хлебопекарные свойства и дольше сохраняет свежесть.

Крахмал *Wx*-пшениц значительно лучше выдерживает режим заморозки-разморозки, чем обычный крахмал. Данное свойство позволяет применять его для изготовления продуктов из замороженного и слоеного теста [15].

Крахмал, состоящий только из амилопектина, имеет температуру желатинизации ниже, чем нормальный крахмал, что перспективно для производства на его основе пищевых загустителей.

Перечисленные свойства свидетельствуют в пользу использования сортов мягкой пшеницы *Wx* с нуль-аллелями, а следовательно, с низким содержанием амилозы в крахмале (так называемых *Wx*-пшениц) в пищевой промышленности.

Одним из наиболее простых способов опре-

деления фенотипов с проявлением мутаций по *Wx*-генам является окрашивание эндосперма зерна с помощью KI-I<sub>2</sub> (0,4 % KI / 0,04 % I<sub>2</sub>). Разные по содержанию функциональных и нефункциональных генов генотипы мягкой пшеницы показывают отличные друг от друга результаты окрашивания [17]. Комбинация трех нуль-аллелей в генотипе при окрашивании KI-I<sub>2</sub> обуславливает красно-коричневый цвет. Генотипы с различными сочетаниями аллелей показывают варьирование окраски крахмальных гранул, от темно-пурпурного до черного цвета.

Для определения мутаций по *Wx*-генам можно использовать анализ качественных характеристик крахмала (свойства крахмального геля, водопоглощающая способность, тенденция ретроградации, колебание температуры желатинизации), которые изменяются в зависимости от соотношения амилоза/амилопектин [13].

Определить наличие или отсутствие функциональных аллелей *Wx*-локусов представляется возможным только с помощью молекулярно-генетического анализа, а также электрофореза с додецилсульфатом натрия (SDS). Применение ПЦР-анализа с аллель-специфичными праймерами является наиболее эффективным методом детекции аллельного состояния *Wx*-генов в генотипах пшеницы.

Проводимые исследования позволяют охарактеризовать генотипы сортов, используемых в селекционных программах по *Wx*-генам, и предоставляют возможность селекционерам проводить целенаправленный отбор исходного материала, а также вести контролируемую селекцию в программах, направленных на создание сортов мягкой пшеницы, которые обладают низким уровнем содержания амилозы в крахмале. В связи с повышением спроса на сорта пшеницы с определенными технологическими качествами зерна (мягкозерные, *Wx*-пшеницы) актуальной является своевременная объективная оценка крахмал-содержащего сырья по аллельному состоянию *Wx*-генов.

Целью нашего исследования являлось изучение аллельного состояния *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* генов 38 сортов озимой мягкой пшеницы, зарегистрированных в Государственном реестре сортов растений Украины 2006 года.

**Материалы и методы.** В работе исследовали ряд сортов озимой мягкой пшеницы различ-

ных центров создания (табл. 2) и контрастную по содержанию амилозы линию мягкой пшеницы *Wx*-15, которая несет три нефункциональных аллеля по *Wx*-генам. Линия получена от доктора R. Graybosh, University of Nebraska, Lincoln.

Выделение ДНК проводили согласно стандартной методике [12] из этиолированных проростков, гомогенизированных в лизирующем буфере: 0,1 М ЭДТА, 0,1 М трис-НСl рН 8,5, 0,1 М NaCl, 1 % SDS, 0,1 % Тритон X-100 до полной мацерации. Белки осаждали смесью хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1). ДНК растворяли до концентрации 20 нг/мкл для проведения ПЦР.

С целью идентификации аллельного состояния *Wx*-генов в сортах мягкой пшеницы с помощью ПЦР-анализа использовали пары праймеров, нуклеотидные последовательности которых приведены в табл. 3.

Продукты ПЦР-анализа фракционировали в 10 %-ном денатурирующем полиакриламидном геле размером 20 × 20 и толщиной 0,75 мм в 1×ТВЕ-буфере. Продукты амплификации

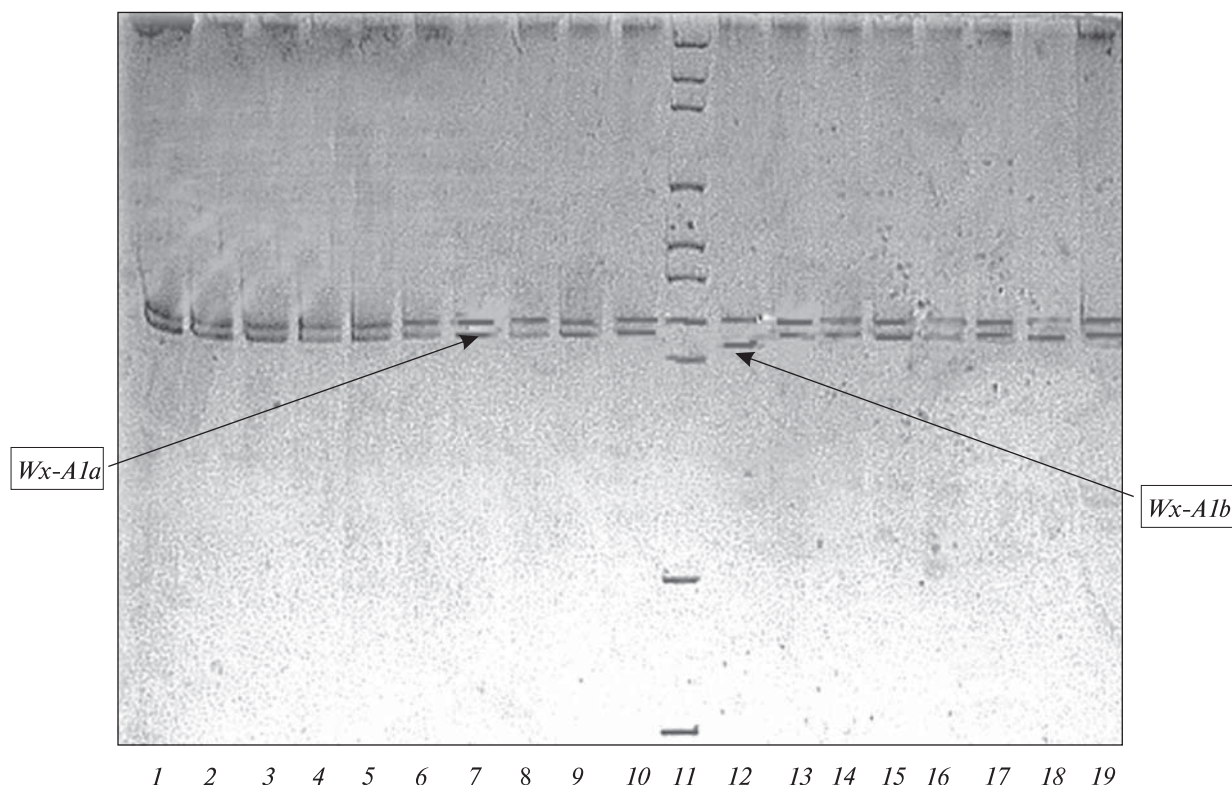
Таблица 1  
Классификация типов пшеницы с различным содержанием *Wx*-генов, согласно данным [17]

Тип	Гены			Содержание амилозы, %, в 100 мг муки
	<i>Wx</i> -A1	<i>Wx</i> -B1	<i>Wx</i> -D1	
1 (дикий тип)	+	+	+	28,7
2	–	+	+	28,5
3	+	–	+	27,1
4	+	+	–	28,0
5	+	–	–	19,8
6	–	+	–	25,8
7	–	–	+	22,9
8 ( <i>Wx</i> тип)	–	–	–	0,9

Таблица 2

Сорта *T. aestivum* L., используемые в работе

Сорт	Центр создания
Одесская 162, Лютесценс 7, Лея, Струмок, Виктория, Одесская 133, Тира, Украинка одесская, Фантазия, Альбатрос, Красуня, Альбидум 114, Куяльник, Писанка, Вымпел, Порада, Спутница	Селекционно-генетический институт
Ятрань 60	Институт физиологии и генетики растений НАН Украины
Мирич, Мироновская 33, Мироновская 27, Мирхард	Мироновский институт пшеницы им. В.Н. Ремесло УААН
Украинка полтавская, Диканька	Полтавская государственная аграрная академия
Белоснежка	Донецкий институт агропромышленного производства УААН
Краснодарская 99, Батько, Победа 50	Краснодарский НИИ сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко
Станичная, Донской сюрприз	Государственное научное учреждение Всероссийский НИИ зерновых культур им. И.Г. Калининко
Апогей луганский	ООО «Семена Луганщины»
Лебедь	Институт сахарной свеклы УААН
Ренан, Фарандоль	Агри Обтансион СА, Франция
Белоцерковская полукарликовая	Белоцерковская исследовательско-селекционная станция им. О.К. Коломиец
Свитанок 1	ЧССП «БОР»
Фаворитка	Институт физиологии и генетики растений НАН Украины, Мироновский институт пшеницы им. В.Н. Ремесло УААН
Херсонская остистая	Институт земледелия южного региона УААН



**Рис. 1.** Электрофоретическое разделение продуктов амплификации ДНК сортов мягкой пшеницы с парой праймеров AFC/AR2: 1–10 – Струмок; 11 – маркер молекулярной массы pGem; 12 – линия Wx-15; 13–16 – Альбатрос; 17–19 – Лея

после электрофоретического разделения в полиакриламидных гелях окрашивали  $\text{AgNO}_3$  согласно рекомендациям «Promega». Экстракцию крахмала из образцов муки проводили по методике, предложенной Oda [8]. Сухие препараты крахмала окрашивали раствором  $\text{KI-I}_2$  (0,4 %  $\text{KI}$  / 0,04 %  $\text{I}_2$ ) согласно методикам, предложенным в литературе [1, 9].

**Результаты исследований и их обсуждение.** ПЦР с направленными праймерами позволяет

получить аллельные характеристики *Wx*-генов в генотипах. Как показано выше, аллельный состав *Wx*-генов влияет на содержание амилозы в крахмале. В зависимости от комбинации в генотипах активных и неактивных аллелей, контролирующих синтез амилозы, наблюдается снижение или повышение содержания указанного компонента в крахмале.

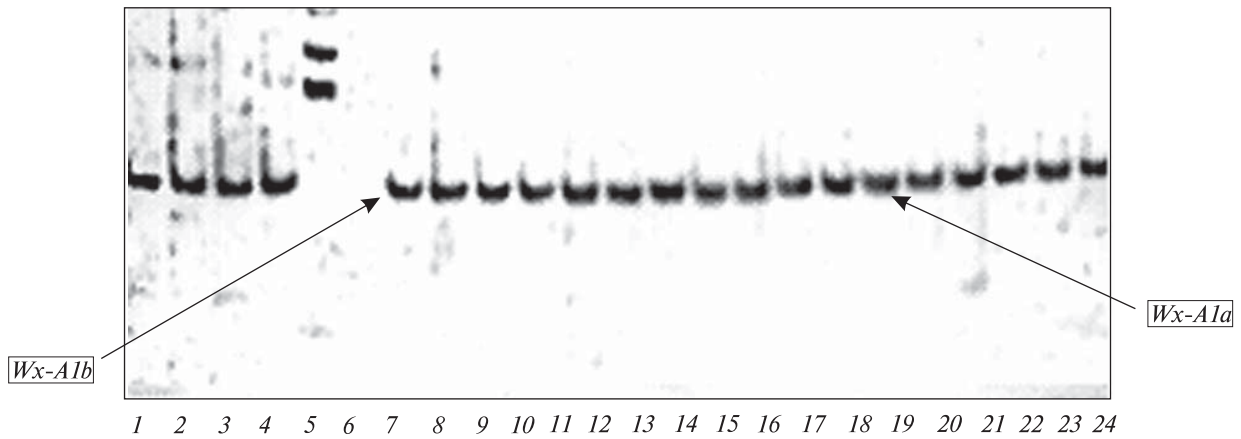
У исследованных сортов мягкой пшеницы с помощью пары праймеров к *Wx-D1* локусу

Таблица 3

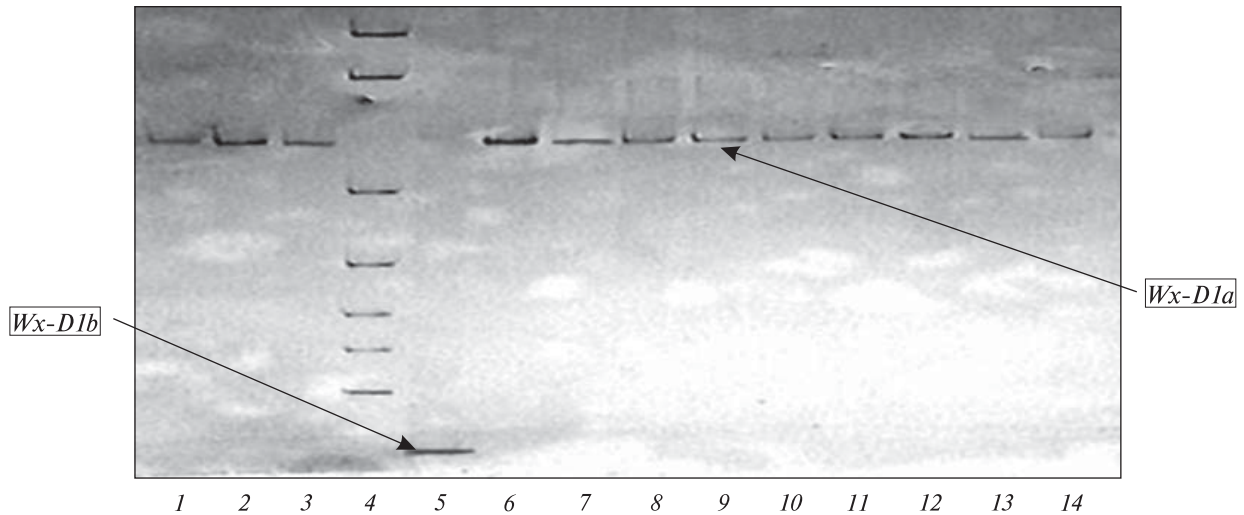
**Пары праймеров для детекции нефункциональных аллелей *Wx*-генов**

Праймер	Локус	Последовательность праймеров	Оптимальная температура отжига, °C	Литературный источник
AFC AR2	<i>Wx-A1</i> (7AS)	5'-TCGTGTTTCGTCGGCGCCGAGATGG-3' 5'-CCGCGCTTGTAGCAGTGGAAAGTACC-3'	65	[4]
Wx98F1 Wx98R1	<i>Wx-B1</i> (4AL)	5'-TCCTCCTCCTTCCTGCCAATTCC-3' 5'-TCACCACCTTCTTCACGTCG-3'	55	[11]
WxD1b1F WxD1b1R	<i>Wx-D1</i> (7DS)	5'-ACAGGATCTCTCCTGGAAG-3' 5'-GCAAGGAAAATAGTGAAGC-3'	55	[11]





**Рис. 2.** Электрофоретическое разделение продуктов амплификации ДНК сортов мягкой пшеницы с праймерами *Wx98*: 1–4 – Лея; 5 – маркер молекулярной массы *pGem*; 6 – линия *Wx-15*; 7–10 – Струмок; 11–14 – Мирхард; 15–19 – Белоснежка; 20–24 – Альбатрос



**Рис. 3.** Электрофоретическое разделение продуктов амплификации ДНК сортов мягкой пшеницы с парой праймеров *Wxd1b1*: 1–3 – Мирхард; 4 – маркер молекулярной массы *pGem*; 5 – линия *Wx-15*; 6–10 – Лея; 11–14 – Альбатрос

тестировали аллель *Wx-D1a*. По локусам *Wx-A1* и *Wx-B1* выявлены аллели *Wx-A1a* и *Wx-B1a* (рис. 1–3). Полученные результаты свидетельствуют о том, что данные сорта имеют нормальное содержание амилозы в крахмале (20–30 %) без тенденций к снижению.

По результатам окрашивания образцов крахмала исследуемые сорта распределились на несколько групп, которые отличаются по интенсивности окрашивания крахмальных гранул, размером, формой, соотношением гранул типа А (5–45 мкм) и Б (1–5 мкм).

Данные, полученные в результате наших исследований, указывают на существенные различия в окрашивании крахмальных гранул с нормальным содержанием амилозы (рис. 4, а) и линии *Wx-15* с блокированным синтезом этого компонента (рис. 4, б). Разницу в интенсивности окрашивания объясняет различная аффинность амилозы и амилопектина к соединениям йода. Способность амилозы связывать  $I_2$  составляет 19–19,9 мг  $I_2$  (100 мг)<sup>-1</sup> крахмала, что почти в 13 раз превышает таковой амилопектина 0,33–1,59 мг  $I_2$  (100 мг)<sup>-1</sup> [10].

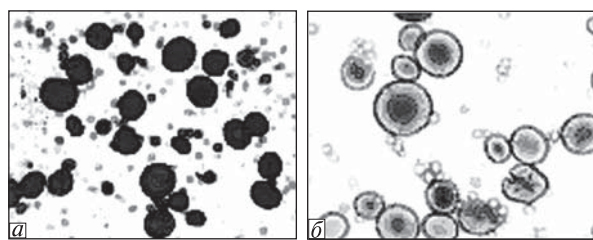


Рис. 4. Микрофотография гранул крахмала сорта Ренан (а) и линии Wx-15 (б), окрашенных раствором KI-I<sub>2</sub> ×400

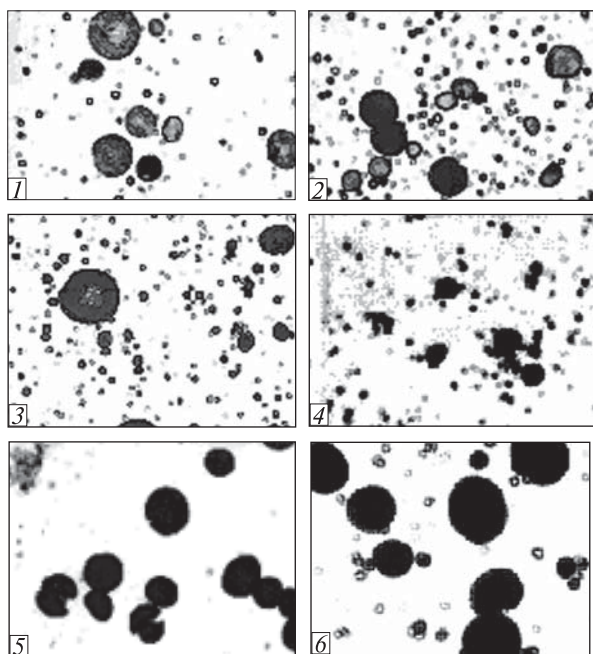


Рис. 5. Крахмальные гранулы сортов мягкой пшеницы, окрашенные раствором KI-I<sub>2</sub> (×400); сорта – представители описанных групп: 1 – Мирхард, 2 – Диканька, 3 – Донской сюрприз, 4 – Батько, 5 – Мироновская 33, 6 – Лебедь

Проведенные нами исследования позволили разделить сорта на шесть групп (рис. 5).

В первую группу вошли Белоснежка, Станичная, Победа 50, Мирхард, Украинка одесская, Ятрань 60, Белоцерковская полукарликовая, Одесская 133, Струмок, Мироновская 27, Леля, Херсонская остистая, Альбатрос. Крахмальные гранулы в большинстве препаратов первой группы сортов показали менее интенсивную окраску по сравнению с другими группами. Соотношение гранул типа А (средний размер 8–36 мкм, единичные 48–72 мкм) и гранул типа Б (2–4 мкм) равное. Превалирует

сферическая форма гранул, однако наблюдаются единичные объекты овальной и неправильной формы.

Вторую группу составили Украинка полтавская, Диканька, Писанка, Порада, Краснодарская 99, Тира, Красуня. Для этой группы сортов характерным является увеличение интенсивности окрашивания гранул. Гранулы типа А имеют размер 34–48 мкм (достаточно редко 52–66 мкм), гранулы типа Б – 2–4 мкм. Форма в большинстве случаев сферическая. В сортах Украинка полтавская и Порада преобладают гранулы типа Б.

Третья группа представлена сортами Донской сюрприз, Вымпел, Одесская 162, характерным отличием которых является появление единичных до 84 мкм сферических гранул (средний размер 8–32 мкм).

Для четвертой группы, представителями которой являются сорта Батько, Спутница, Свитанок 1, характерна интенсивная окраска (тип А 28–36 мкм, тип Б 2–4 мкм). Превалируют гранулы типа А. Форма сферическая.

В пятой группе, представленной сортами Фаворитка, Фантазия, Ренан, Мирич, Альбидум 114, Мироновская 33, крахмальные гранулы интенсивно окрашены (тип А 20–44 мкм, единичные 54–66 мкм, тип Б до 4 мкм). Превалирует сферическая и неправильная форма.

В шестую группу вошли Фарандоль, Лебедь, Виктория одесская, Апогей луганский, Лютесценс 7, Куяльник. Размер гранул типа А 20–38 мкм, единичные 60 мкм. Гранулы типа Б 2–4 мкм. По большей части сферической формы. Характерно интенсивное равномерное окрашивание.

Комплексная структурная организация крахмальных гранул фактически варьирует не только среди генотипов, но и в пределах одного генотипа, например, в сорте Альбатрос одесский наблюдается структурная гетерогенность крахмальных гранул.

Размер крахмальных гранул детерминирует повышение активной водопоглощающей способности. Повышенное содержание амилозы снижает этот показатель. Потому типичное для большинства исследованных сортов появление крупных (40–84 мкм) интенсивно окрашенных гранул свидетельствует о высоком содержании амилозы и несоответствии качественных по-

казателей их крахмала для производства группы пищевых продуктов из замороженного теста, таких как вареники, пельмени, круассаны и др.

**Выводы.** В пуле исследованных сортов мягкой пшеницы Украины не представлены сорта с мутациями по Wx-генам, что подтверждается нашими исследованиями. В связи с потребностями рынка пищевой промышленности в сырье для производства лапши, продуктов из замороженного теста повышенного качества в Селекционно-генетическом институте на основе генотипов отечественных сортов с привлечением Wx-форм зарубежной селекции ведется работа по получению форм *T. aestivum* L. с пониженным содержанием амилозы. Следующим этапом нашей работы является анализ селекционных популяций и отбор генотипов, несущих мутации по Wx-генам.

**SUMMARY.** Allele characteristics of Wx-genes have been detected by using PCR-analysis with allele specific primers for wheat varieties that are registered in the State Catalogue of Plant Varieties in 2006. The varieties with mutant Wx-genes were not identified among the modern winter wheat varieties. The variation of size and staining intensity by KI-I<sub>2</sub> of starch granules in the tested varieties has been detected.

**РЕЗЮМЕ.** Використання ПЛР-аналізу з алель-специфічними праймерами при тестуванні алельного стану Wx-генів у генотипах зареєстрованих в Державному реєстрі 2006 року сортів пшениці, дозволило виявити відсутність мутацій за вказаними генами у дослідженій групі сортів. Зазначено варіювання розміру та інтенсивності забарвлення крохмальних гранул при використанні KI-I<sub>2</sub> у даних сортів.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fujita N., Hasegawa H., Taira T. The isolation and characterization of a Wx mutant of diploid wheat (*Triticum monoccum* L.) // Plant Sci. – 2001. – **160**. – P. 595–602.
2. Rodriguez-Quijano M., Nieto-Taladriz M.T., Carrillo J.M. Polymorphism of waxy proteins in Iberian hexaploid wheat // Plant Breed. – 1998. – **117**. – P. 341–344.
3. Rodriguez-Quijano M., Nieto-Taladriz M.T., Carrillo J.M. Waxy proteins and amylose content in diploid *Triticeae* species with genomes A, S and D // Plant Breed. – 2004. – **123**. – P. 294–296.

4. Nakamura T., Yamamori M., Hoshino H., Hidaka S. Identification of three Wx proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Biochem. Genet. – 1993. – **31**. – P. 75–86.
5. McIntosh R.A., Hart G.E., Yamazaki Y., Devos K.M., Dubcovsky J., Rogers W.J., Appels A. Catalogue of Gene Symbols for Wheat // Proc. 10<sup>th</sup> Intern. Wheat Genetics Symp. – Paestum (Italy), 2003. – **4**.
6. Nakamura T., Vrinten P., Saito M., Konda M. Rapid classification of partial waxy wheats using PCR-based markers // Genome. – 2002. – **45**. – P. 1150–1156.
7. Graybosch R., Souza E., Berzonsky W. Functional properties of waxy flours: genotypic and environmental effects // Cereal Sci. – 2003. – **38**. – P. 69–76.
8. Oda M., Yasuda S., Okazaki Y., Yamauchi Y., Yokoyama Y. A method of flour quality assessment for Japanese noodles // Cereal Chem. – 1980. – **57**. – P. 253–254.
9. Bettge A.D., Giroux M.J., Morris C.F. Susceptibility of waxy starch granules to mechanical damage // Cereal Chem. – 2000. – **77**(6). – P. 750–753.
10. Schulman A.H., Tomooka S., Suzuki A., Hizukuri S. Structural analysis of starch (*Hordeum vulgare* L.) // Carbohydr. Res. – 1995. – **275**. – P. 361–369.
11. McLauchlan A., Ogonnaya F.C., Hollingsworth B. et al. Development of robust PCR-based DNA markers for each homoeo-allele of granule-bound starch synthase and application in wheat breeding programs // Aust. J. Agric. Res. – 2001. – **52**. – P. 1409–1416.
12. Kim W., Johnson J., Graybosch R., Gaines C. Physico-chemical properties and end-use quality of wheat starch as a function of waxy protein alleles // Cereal Sci. – 2003. – **37**. – P. 195–204.
13. Huber K.C., BeMiller J. Location of sites of reaction within starch granules // Cereal Chem. – 2000. – **78**(2). – P. 173–180.
14. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях : Науч. руководство / Под ред. Ю.М. Сиволапа. – Киев : Аграр. наука, 1998. – 156 с.
15. Черных В.Я., Ширишко М.А. Оценка качества крахмалосодержащего сырья на приборе амилотест АТ-(ЧП-ТА). 2006. [http:// ipark.ru](http://ipark.ru)
16. Рибалка О.І., Червоніс М.В., Топораши І.Г. Пшениця ваксі з унікальними властивостями крохмалю: можливі напрямки її використання // Зберігання та переробка зерна. – 2005. – **7** (73). – P. 24–28.
17. Yamamori M., Nakamura T., Endo T. Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat // Theor. Appl. Genet. – 1994. – **89**. – P. 179–184.

Поступила 10.10.06