

534785

УКРАЇНЬСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК

ПІВДЕННИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ЦЕНТР В РОСЛИННИЦТВІ

**Детекція *Wx* генів в селекції озимої м'якої пшениці
на низький вміст амілози в крохмалі**

Методичні рекомендації

Одеса 2008

УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК

ПІВДЕННИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ЦЕНТР В РОСЛИННИЦТВІ

ОБОВ'ЯЗКОВИЙ
ПРИМІРНИК

**Детекція *Wx* генів в селекції озимої м'якої пшениці
на низький вміст амілози в крохмалі**

Методичні рекомендації

Одеса 2008

*Друкується за рішенням вченої ради Південного біотехнологічного центру в
рослинистві УААН(протокол № 8 від 19.08.08 р.)*

Автори:

доктор біологічних наук,
професор, академік УААН **Сиволап Ю.М.,**
Петрова І.В.,
кандидат біологічних наук **Чеботар С.В.,**
кандидат біологічних наук **Рибалка О.І.**



Розроблено технологію детекції та контролю *Wx*-генів в генотипах озимої м'якої пшениці за допомогою ПЛР-аналізу.

Рекомендації можуть бути використані в генетико-селекційних дослідженнях, в селекції форм м'якої пшениці з низьким або нульовим вмістом амیلози.

ВСТУП

В країнах – провідних виробниках м'якої пшениці започатковано селекційні програми спрямовані на створення комерційних сортів з спеціальними технологічними якостями. Велика увага приділяється такому якісному показнику, як низький або нульовий вміст амілози у пшеничному крохмалі [3]. Ключовим ферментом синтезу амілози у крохмальних гранулах є фермент *GBSS1* (*granule-bound starch synthase=ADP glucose starch glycosyl transferase, EC2.4.1.21=GBSS1*), який ще називають *Wx* протеїном. *Wx* протеїни кодуються генами з відповідною назвою *Wx*. Ці гени ідентифіковані у пшениці Nakamura et al. [1]: *Wx-A1* (*7AS*), *Wx-B1* (*4AL*), *Wx-D1* (*7DS*). Локуси *Wx* протеїнів мають функціональні і нефункціональні (нуль) алелі. Наявність у комплексі трьох нефункціональних алелів призводить до повної елімінації вище зазначеного ферменту, а отже блокується синтез амілози.

Відомо, що низький вміст амілози в крохмалі визначає технологічні якості борошна, такі як водопоглинальна здатність, амілолітична активність, індекс Хагберга [3].

Відповідно виникла потреба у створенні простих та надійних методів добору генотипів з частково чи повністю блокованим синтезом амілози.

Найбільш простою методикою визначення *Wx* фенотипів є забарвлення зернівки розчином йоду. Але застосування даного методу можливо тільки на стадії дозрілого зерна і не дає змоги скоротити строки добору селекційного матеріалу.

Для інструментальної оцінки вмісту амілози зазвичай використовують спектрофотометрію у видимому та інфрачервоному діапазонах. Її застосування дає можливість проводити кількісний аналіз та оцінювати ефект впливу дози *Wx*-генів на вміст амілози у пшеничному крохмалі, що є важливим при використанні даного методу для генетичного аналізу [6].

Визначення наявності чи відсутності функціональних алелів *Wx*-локусів у рослин на ранніх етапах вегетації стає можливим за використання

молекулярно-генетичного аналізу. Використання ПЛР-аналізу з STS-маркерами є ефективним методом детекції алельного стану *Wx*-генів в генотипах пшениці [1, 2, 4].

Розробка технології діагностики та контролю *Wx*-генів дозволить вирішити наступні задачі: надасть можливість селекціонерам проводити добір вихідного матеріалу, а також вести контрольовану селекцію, спрямовану на створення сортів пшениці, які мають низький чи нульовий вміст амілози у крохмалі [5].

1. ОПИС МЕТОДУ

В основу методу поставлено задачу в способі встановлення генотипів – носіїв нуль-алелів за *Wx*-генами на ранніх етапах вегетації. Діагностика алельного стану *Wx*-генів генотипів озимої м'якої пшениці проводиться шляхом аналізу фрагментів ДНК за результатами ПЛР-аналізу з праймерами до *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* локусів.

2. ЕТАПИ АНАЛІЗУ

2.1. Виділення ДНК з рослинного матеріалу (паростків)

Фрагмент паростка розміром 1 см в пробірці типу „епендорф” (1,5 мл) гомогенізувати скляним товкачем до повної мацерації тканин та додати 0,5 мл лізуючого буферу. Буфер для виділення ДНК містить: 1,4 М NaCl, 20 mM Na₃EDTA, 100 mM тріс-НCl рН 8,0 при 25 °С, 2 % СТАВ. Лізат інкубувати 60 хв при 60 °С. Далі обробити лізат рівним об'ємом суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1 за об'ємом), перемішати на вортексі до утворення білої емульсії. Отриману суміш центрифугувати протягом 5 хв при 14000 об./хв на мікрофузі „Eppendorf 5415”. Після центрифугування відібрати водну фазу і перенести у чистий епендорф, додати рівний об'єм ізопропилового спирту та витримувати протягом 10 хв за кімнатної температури. Суміш перемішати, ДНК висадити центрифугуванням при 14000 об./хв протягом 4 хв на мікрофузі „Eppendorf 5415”. Осад промити двічі 70 % етанолом, підсушити при кімнатній температурі та розчинити у ТЕ-буфері (1 мкМ Na₃EDTA, 10 mM тріс-НCl рН 8,0).

2.2. Флюориметричне визначення концентрації ДНК

Концентрацію виділеної ДНК визначити на флюориметрі „ТКО 100 Dedicated mini Fluorometer” („Hoefler Scientific Instruments”, США) у 1×TNE буфері (3 М NaCl, 50 mM Na₂HPO₄) у присутності флюорисцентного барвника Hoechst 33258 згідно інструкції користувача обладнання.

2.3. Проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

Реакційна суміш для проведення ПЛР обсягом 20-25 мкл містить: 10×ПЛР буфер (3 М KCl, 2 М тріс-НCl pH 8,4 (25 °C), 10 % Tween-20), ДНК 40 нг, 1,5-2,0 mM MgCl₂, 10 pmol кожного праймера (прямого та зворотного) [1, 2], по 0,20 mM кожного dATP, dCTP, dTTP, dGTP та 1,0-1,5 од. ДНК-полімерази Taq. Поверх реакційної суміші нашарувати 25 мкл мінеральної олії „Bajol F”.

Режим ампліфікації наступний: перша денатурація – 94 °C – 1 хв 30 сек; наступні 35 циклів: денатурація 94 °C – 1 хв, реасоціація: 55 °C-65 °C, залежно від праймерів, – протягом 40 сек, елонгація при 72 °C – 1 хв; заключна елонгація: 72 °C – 2 хв.

Послідовності праймерів для детекції алелів *Wx* генів наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Характеристика праймерів для детекції нефункціональних алелів *Wx* генів

Назва праймерів	Локус	Послідовність праймерів (5' - 3')	Розмір алелів, п.н.	Температура віддалювання праймерів, °C
AFC AR2	<i>Wx-A1</i> (7AS)	TCGTGTTTCGTCGGCGCCGAGATGG CCGCGCTTGTAGCAGTGGAAAGTACC	370, 389	65
Wx98F1 Wx98R1	<i>Wx-B1</i> (4AL)	TCCTCCTCCTTCCTGCCAATTCC TCACCACCTTCTTCACGTCG	308, 308 (-)*	55
WxD1b1F WxD1b1R	<i>Wx-D1</i> (7DS)	ACAGGATCTCTCCTGGAAG GCAAGGAAAATAGTGAAGC	280, 775	55

* - відсутність фрагменту ампліфікації

2.4. Електрофоретичний розподіл продуктів ПЛР

Для ідентифікації аельного складу досліджуваних *Wx*-генів продукти ПЛР фракціонувати у 10 % денатуруючому (8 М сечовина) поліакриламідному гелі в 1×ТВЕ-буфері (89,0 мМ тріс, 89,0 мМ борна кислота, 2,0 мМ Na₃EDTA) за постійної напруги 550 В 2-3 години залежно від довжини фрагментів ампліфікації.

Для приготування одного гелю розміром 20×20 см товщиною 0,75 мм слід змішати 12,5 мл розчину 8 М сечовини, 12,5 мл розчину 30 % поліакриламідну з 8 М сечовиною, 2,5 мл 10×ТВЕ-буферу, 25 мкл ТЕМЕД, 50 мкл 10 % розчину амонію персульфату.

Гель залити у форми згідно керівництва користувача устаткування. Перед нанесенням продуктів ампліфікації провести префорез протягом 30 хв за постійної напруги 300 В і температури 60 °С.

Перед нанесенням на електрофорез від 5-15 мкл реакційної суміші змішати з рівним об'ємом денатуруючого буфера для нанесення (98 % формамід, 10 мМ EDTA рН 8,0, 0,2 % (w/v) бромфеноловий синій, 0,2 % (w/v) ксиленціанол) та денатурувати протягом 3 хв при 95 °С, швидко охолодити на крижаній бані. Потім проби нанести у лунки поліакриламідного гелю. Провести електрофорез. В якості стандарту молекулярної ваги використовувати стандарти рGem („Promega”, США), (розміри фрагментів: 2645, 1605, 1198, 676, 517, 480, 396, 350, 222, 179, 126, 75, 65, 51, 36 п.н.), рBlu Script („Promega”, США), (розміри фрагментів: 710, 489, 404, 328, 242, 190, 157, 147, 110, 67 п.н.).

2.5. Візуалізація продуктів ампліфікації

Поліакриламідні гелі фарбувати сріблом відповідно методики: поліакриламідний гель покласти на 5-10 хв у 10 % етанол, потім перенести у 1% HNO₃ на 3 хв. Гель кілька разів промити дистильованою водою. Витримати протягом 20 хв у 0,012 М AgNO₃ у темряві. Двічі промити дистильованою водою. Залити гель відновлюючим розчином (0,28 М Na₂CO₃ (безводний),

0,019 % формалін), інкубувати, перемішуючи до появи забарвлення фрагментів ампліфікації. Потім промити кілька разів дистильованою водою і покласти у 10 % оцтову кислоту на 2 хв. На завершення добре промити H₂O. Гель зберігати між двома шарами прозорої поліетиленової плівки.

2.6. Документування результатів аналізу

Для документування результатів електрофорезу використовувати систему відеодокументування «Image Master VDS». Цифрове зображення забарвлених гелів за допомогою програмного забезпечення „Liscap” перенести на комп’ютер. Розміри ампліфікованих фрагментів визначити, використовуючи програму „Image Master 1D Elite”. Калібрування молекулярної ваги здійснювати з використанням стандартів молекулярної ваги (pGem, pBlu Script).

3. ОПРАЦЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Після електрофорезу на доріжках гелю мають чітко детектуватись: за *Wx-A1* локусом фрагмент ДНК вагою 389 п.н. (алель *Wx-A1a*) або нуль-алель (*Wx-A1b*) з молекулярною вагою 370 п.н.; за *Wx-B1* локусом амплікон розміром 308 п.н. (*Wx-B1a*) чи відсутність зазначеного фрагменту - нуль-алель; за *Wx-D1* локусом фрагмент ДНК з молекулярною вагою 280 п.н. (нуль-алель *Wx-D1b*) або алель *Wx-D1a* вагою 775 п.н. Отримані результати використовувати для добору індивідуальних рослин складом за *Wx*-генами. Приклади застосування, вище описаних, молекулярних маркерів для детекції генів *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* в генотипах м’якої пшениці наведено у фототаблиці додатку 1.

4. ВИСНОВКИ

4.1. Ідентифікація нефункціональних алелів *Wx*-генів в генотипах м’якої пшениці проводиться за допомогою ПЛР-аналізу з STS-праймерами до *Wx*-локусів.

4.2. Методика може бути використана в генетико-селекційних дослідженнях, а також при селекції форм м’якої пшениці з низьким або нульовим вмістом амілози.

Фототаблиця для опрацювання результатів аналізу

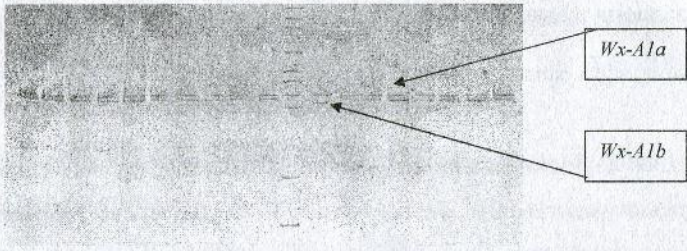


Рис. 1. Електрофореграма розподілення продуктів ампліфікації ДНК з парою праймерів AFC/AR2 до *Wx-A1* локусу: *Wx-A1b* (нуль-алель, розмір фрагменту 370 п.н.), *Wx-A1a* (розмір фрагменту 389 п.н.)

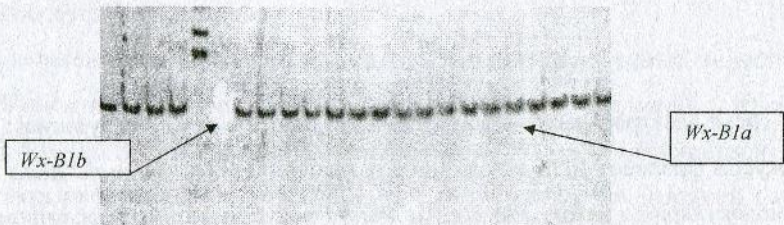


Рис. 2. Електрофореграма розподілення продуктів ампліфікації ДНК з парою праймерів Wx98 до *Wx-B1* локусу: *Wx-B1b* (нуль-алель, відсутність фрагменту ампліфікації), *Wx-B1a* (розмір фрагменту 308 п.н.)

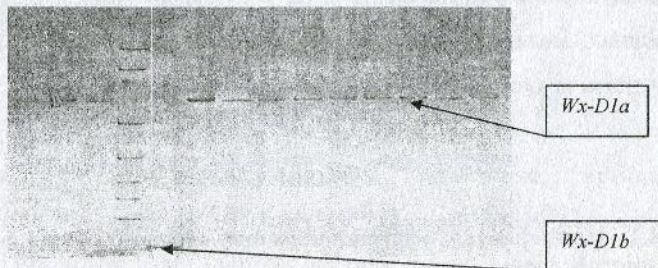


Рис. 3. Електрофореграма розподілення продуктів ампліфікації ДНК з парою праймерів WxD1b1 до *Wx-D1* локусу: *Wx-D1b* (нуль-алель, розмір фрагменту ампліфікації 280 п.н.), *Wx-D1a* (дикий тип, розмір фрагменту 775 п.н.)

Список літератури

1. Nakamura T., Vrinten P., Saito M., Konda M. Rapid classification of partial waxy wheats using PCR-based markers // *Genome*. 2002. – Vol. 45. – P. 1150-1156.
2. 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. – Vol. 52. – P. 1409-1416.
3. Рыбалка О.И., Червоніс М.В., Топораши І.Г. Пшениця ваксі з унікальними властивостями крохмалю : можливі напрямки її використання. // Зберігання та переробка зерна. – 2005. – Т. 7. – № 73. – С. 24-28.
4. Петрова И.В., Чеботарь С.В., Рыбалка А.И., Сиволап Ю.М. Идентификация Wx генотипов среди сортов озимой мягкой пшеницы // *Цитология и генетика*. – 2007. – Т. 41. № 6. – С. 11-17.
5. Петрова И.В., Чеботарь С.В., Рыбалка А.И., Сиволап Ю.М. Контроль Wx-генов в процессе селекции при создании форм мягкой пшеницы с нулевым и низким содержанием амилозы // *Зб. науч. тр. «Достижения и проблемы генетики, селекции и биотехнологии»*. – Алушта, 2007. – Т. 1. – С. 162-164.
6. Delwiche S.R., Graybosch R. Identification of Waxy wheat by near-infrared reflectance spectroscopy // *Cereal Science*. – 2002. – Vol. 35. – P. 29-38.

ДНСТГБ УААН
Інв. № 534785

ДЛЯ НОТАТОК

ДЛЯ НОТАТОК

Наукове-виробниче видання

ПІВДЕННИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ЦЕНТР В РОСЛИННИЦТВІ

**Детекція *Wx* генів в селекції озимої м'якої пшениці
на низький вміст амілози в крохмалі**

Методичні рекомендації

Автори: Сиволап Ю.М., Петрова І.В., Чеботар С.В., Рибалка О.І.

Підписано до друку з готового оригінал-макету 18.09.08.

Умов. друк. арк. 0,7. Формат 60x84 1/16.

Папір офсетний. Друк різнографічний.

Тираж 100 прим. Зам. № 517.

Друкарня ТОВ «Фірма «ІНТЕРПРІНТ»
65012, м. Одеса, вул. Пантелеймонівська, 15-А,
тел. 777-08-84, 777-04-64

2-00

ДНСТБ УААН



Kn0013378

