

УДК 601.4:577.21:582.542.11:633.111+581.134+575.113+575.222.7

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ *Wx* У ГІБРИДАХ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ДОПОМОГОЮ МУЛЬТИПЛЕКСНИХ ПОЛІМЕРАЗНИХ ЛАНЦЮГОВИХ РЕАКЦІЙ

Б.В. МОРГУН<sup>1,2</sup>, О.В. СТЕПАНЕНКО<sup>1,3</sup>, А.І. СТЕПАНЕНКО<sup>1</sup>, О.І. РИБАЛКА<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України

03143 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

e-mail: molgen@icbge.org.ua

<sup>2</sup>Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України

03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

<sup>3</sup>Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»

03056 Київ, просп. Перемоги, 37

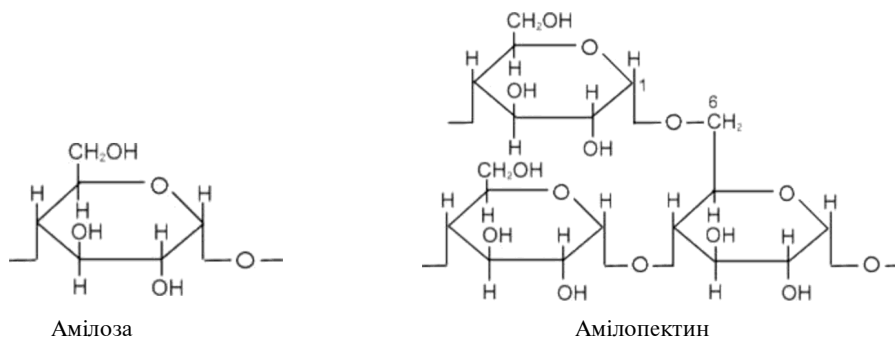
<sup>4</sup>Селекційно-генетичний інститут—Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення Національної академії аграрних наук України

65036 Одеса, Овідіопольська дорога, 3

Однією з важливих характеристик, що визначає властивості пшеничного борошна, є співвідношення амілози й амілопектину в крохмалі зернівки. В результаті дослідження розроблено молекулярні маркерні системи для визначення алелів генів *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1*, відповідальних за синтез амілози, на основі мультиплексних полімеразних ланцюгових реакцій (ПЛР). Проаналізовано статистично достатню вибірку зі 154 гібридних ліній для виявлення усіх комбінацій генів ваксі. Згідно з отриманими даними, 16 зразків виявилися гетерозиготними, решта 138 — гомозиготними. Серед досліджених зразків знайдено усі комбінації генів *Wx*.

**Ключові слова:** пшениця, гени ваксі (*Wx*), полімеразна ланцюгова реакція, молекулярні маркери, *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1*, крохмаль.

Основою поживної цінності зернових культур є крохмаль та білки, які запасуються у зернівці. Крохмаль становить близько 70 % основної запасуючої частини зернівки (ендосперму) хлібопекарських злаків. Гранули крохмалю складаються з двох полісахаридів, молекули яких побудовані з *D*-глюкопіранозних ланок: лінійної амілози (20—25 %) та розгалуженого амілопектину (70—75 %) [3, 7]:



Зміна співвідношення амілози й амілопектину в крохмальних гранулах значною мірою впливає на технологічні властивості пшеничного борошна.

Синтез амілопектину контролюється багатьма ферментами, в тому числі SBE (глюканрозгалужувальний фермент). В однодольних виявлено три ізоформи ферменту — SBEI, SBEIIa та SBEIIb. Гени SBE в усіх трьох геномах знаходяться в різних поєднаннях. Одночасний сайленсинг обох генів SBEIIa і SBEIIb (але не одного) приводить до підвищення вмісту амілози в зерні пшениці до 70 % [9]. Синтез амілопектину кодується багатьма генами: ферментами-синтетазами крохмалю SSI, SSII, SSIII; ферментами розгалуження ланцюга молекули крохмалю SBEI, SBEIIa, SBEIIb; ферментами дерозгалуження ланцюга молекули крохмалю DBE [2].

Головним ферментом біосинтезу амілози є асоційована з гранулами синтаза крохмалю GBSSI (granule bound starch synthase I) з молекулярною масою близько 60 кД, що має назву Wx-протеїн. У геномі м'якої пшениці три гомеологічні гени кодують ізоформи GBSSI ферменту: *Wx-A1*, *Wx-B1* і *Wx-D1*, які розміщені у плечах хромосом 7AS, 4AL і 7DS відповідно [5].

У кукурудзи, ячменю, рису, вівса, а потім і в пшениці було виявлено мутанти за генами *Wx*, в яких знижувався вміст або й повністю була відсутня амілоза [6].

У пшениці кожен із генів *Wx* має по кілька алелів: активний алель (a), що кодує синтез білка Wx, нуль-алель (b), за наявності якого блокується синтез Wx-протеїну, функціональні алелі з різною ферментативною активністю білка GBSSI. Пшеницю, в якій поєднані три неактивні нуль-алелі генів ваксі, що спричинює повне блокування синтезу ферменту GBSSI та амілози, називають ваксі (*Wx*). Сорти з кількома нуль-алелями з дещо зниженим синтезом амілози називають частково ваксі (partial Waxy) [10].

Зерно пшениці з одним або двома нуль-алелями *Wx*-генів має низку властивостей, важливих для виробництва локшини та бісквітів [15]. Так, для виготовлення локшини необхідний крохмаль з великим об'ємом набухання, високим піком в'язкості і швидкою клейстеризацією, тобто з показниками, характерними для сортів пшениці з одним або двома нуль-алелями *Wx*-генів і зниженим вмістом амілози. Зменшення кількості амілози позитивно впливає на хлібопекарські якості борошна: сприяє утворенню пишних і хрустких пшеничних пластівців для сніданків (крохмаль зерна пшениці дикого типу зумовлює ламкість і подрібнення продукту), позитивно корелює з подовженням терміну зберігання хлібобулочних виробів, оскільки саме наявністю амілози зумовлено черствіння хліба.

Зерно *Wx*-пшениці — перспективна сировина для отримання етанолу внаслідок низької температури клейстеризації крохмалю. Після розварювання зерна при 85 °С структура крохмалю істотно порушується, ланцюги його молекул стають легкодоступними для ензимів і відповідно знижується витрата енергії. *Wx*-пшениця порівняно зі звичайною пшеницею і кукурудзою має вищу ензиматичну оцінку, тобто потрібно менше часу для завершення процесу ферментації [16].

У світі отримано сорти пшениці ваксі, в яких повністю блокований синтез амілози. Нуль-алелі генів *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* нерівномірно

впливають на синтез амілози в зернівках. Найістотніше його гальмує нуль-алель гена *Wx-B1*.

Контроль поширення поліморфізму алельних варіантів генів ваксі пшениці за допомогою мультиплексних полімеразних ланцюгових реакцій має велику практичну значущість у маркер-опосередкованій селекції при створенні сортів пшениці з високими якісними показниками зерна, особливо на стадіях контролю гібридів 3—5-го покоління. Крім того, маркерні системи до генів *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* є цінним інструментом для генотипування й паспортизації отриманих сортів пшениці частково ваксі з огляду на незначне поширення нуль-алелів генів у сортовому різноманітті м'якої пшениці України.

Для практичної ідентифікації *Wx*-пшениці найдоцільніше використовувати молекулярно-генетичні методи аналізу, оскільки вони з високою точністю дають змогу визначати наявність як трьох нуль-алелів за досліджуваними генами, так і частково *Wx*-пшеницю.

Метою роботи була розробка кодомінантних молекулярних маркерних систем на основі мультиплексних ПЛР для визначення генів ваксі та аналіз статистично достатньої вибірки гібридів, для виявлення усіх можливих комбінацій генів *Wx*.

### Методика

Досліджували 154 гібриди  $F_3$  пшениці, отримані від схрещування сорту Куяльник з ярою ваксі лінією *Wx-12*, надані Селекційно-генетичним інститутом—Національним центром насіннезнавства та сортовивчення НААН України. Позитивним контролем на наявність нуль-алелів за всіма генами *Wx* слугував ваксі сорт пшениці Софійка.

Загальну рослинну ДНК виділяли ЦТАБ-методом [12] з модифікаціями із замороженої зеленої маси і розчиняли у ТЕ буфері (рН 8,0). ПЛР проводили у 20 мкл реакційної суміші з використанням специфічних праймерів (таблиця). У кожній реакції було 100—150 нг рос-

*Перелік праймерів, використаних у дослідженнях, та очікуваних продуктів ампліфікації*

Назва праймера	Послідовність, посилання, додаткові умови	Розмір амплікону, пн, алель	Ген
Wx-A1F	5'-CCCCAAAGCAAAGCAGGAAAC-3'	495+176, <i>Wx-A1a</i>	<i>Wx-A1</i>
Wx-A1R	5'-CGGCGTCGGGTCCATAGATC-3' [13] + + HindIII, 1 год, 37 °C	652, <i>Wx-A1b</i>	
BDFL	5'-CTGGCCTGCTACCTCAAGAGCAACT-3'	778, <i>Wx-B1a</i>	<i>Wx-B1</i>
BRC1	5'-GGTTGCGGTTGGGGTCGATGAC-3'	668, <i>Wx-B1b</i>	
BFC	5'-CGTAGTAAGGTGCAAAAAAGTGCCACG-3'	804, <i>Wx-B1e</i>	
BRC2	5'-ACAGCCTTATTGTACCAAGA CCCATGTGTG-3' [11, 12]		
Wx-D1F	5'-GCCGACGTGAAGAAGGTGGTG-3'	930, <i>Wx-D1a</i>	<i>Wx-D1</i>
Wx-D1R	5'-CCCCTTGGGTCAATTTGTTGTGT-3' [14]	342, <i>Wx-D1b</i>	
RTF	5'-AAGGGTTGCTCCTCTTCGCGATCTTG-3'	934	<i>TaTM20</i>
RTR	5'-GTACATGCCAGCACCGTATGGATTG-3' [8]		

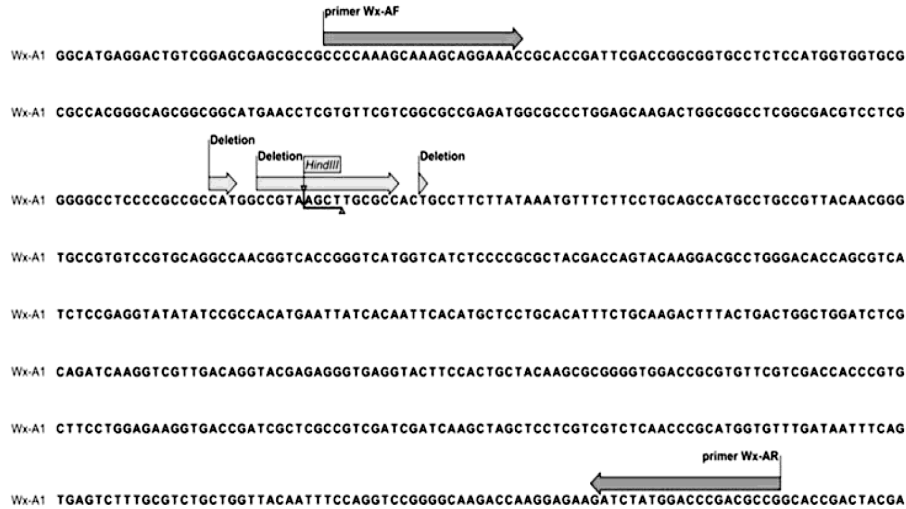


Рис. 1. Схема молекулярно-генетичної детекції поліморфізму гена *Wx-A1*

линної ДНК, для ампліфікації використовували 0,5 од. DreamTaq™ полімерази (Thermo Scientific). Реакцію проводили в ампліфікаторі Arktic Thermal Cycler (Thermo Scientific) за специфічними програмами.

Алельний стан гена *Wx-A1* визначали за допомогою ПЛР з праймерами, запропонованими авторами праць [13, 14] із наступним гідролізом продуктів ампліфікації ендонуклеазою рестрикції *HindIII*. Схему детекції поліморфізму гена *Wx-A1* наведено на рис. 1.

Умови реакції: початкова денатурація за 94 °С — 3 хв, 34 цикли — денатурація за 94 °С — 30 с, за температури відпалу праймерів 58 °С — 30 с, елонгація за 72 °С — 40 с, фінальна елонгація — 5 хв. За наявності алеля *Wx-A1b* (нуль-алель) очікувався амплікон 652 пн, *Wx-A1a* (дикий тип) — 495 та 176 пн. У разі гетерозиготного організму виявлялись амплікони усіх типів.

Алельний стан гена *Wx-B1* визначали за мультиплексною низхідною ПЛР з 4 праймерами, запропонованими авторами праці [11], та праймерами до референтного гена пшениці *TaTM20*, запропонованими авторами праці [8]. Схему визначення алельного стану гена *Wx-B1* наведено на рис. 2.

Умови реакції: початкова денатурація за 94 °С — 3 хв, 6 циклів — денатурація за 94 °С — 30 с, за температури, вищої за температуру відпа-

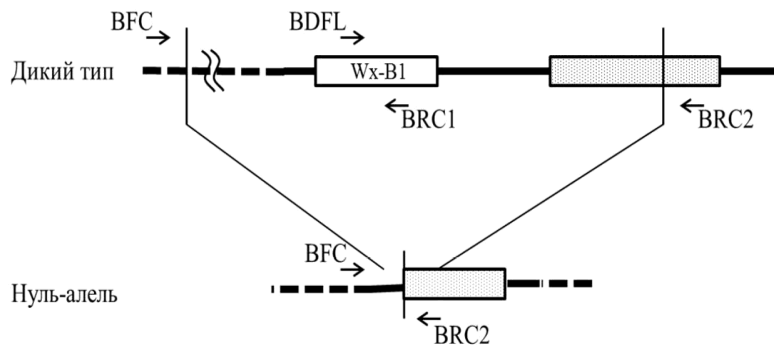


Рис. 2. Схема молекулярно-генетичної детекції поліморфізму гена *Wx-B1* [11]

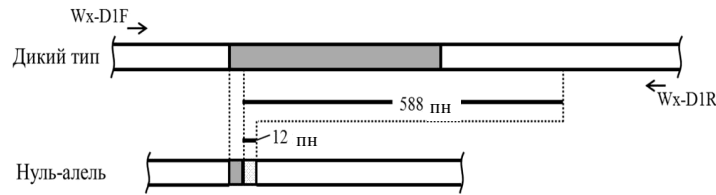


Рис. 3. Схема молекулярно-генетичної детекції поліморфізму гена *Wx-D1* [11, 14]. Сірим кольором позначено екзонні ділянки, білим — інтронні

лу праймерів  $69^{\circ}\text{C}$  — 1 хв, з кожним циклом температура знижувалась на  $1^{\circ}\text{C}$ , елонгація за  $72^{\circ}\text{C}$  — 2 хв та ще 24 цикли — денатурація за  $94^{\circ}\text{C}$  — 30 с, за температури відпалу праймерів  $62^{\circ}\text{C}$  — 1 хв, елонгація за  $72^{\circ}\text{C}$  — 2 хв та фінальна елонгація — 5 хв. За наявності алеля *Wx-B1a* (дикий тип) очікувався амплікон 778 пн, *Wx-B1b* (нуль-алель) — 668 пн. У разі гетерозиготного організму виявлялись амплікони обох типів. Для всіх зразків очікувався амплікон розміром 934 пн, що свідчить про наявність референтного гена пшениці *TaTM20*, потрібного для внутрішнього контролю якості перебігу ампліфікації.

Алельний стан гена *Wx-D1* ідентифікували за допомогою низхідної ПЛР з праймерами, запропонованими авторами праці [14]. Принцип визначення алельного стану гена *Wx-D1* схематично ілюструє рис. 3.

Умови реакції: початкова денатурація за  $94^{\circ}\text{C}$  — 3 хв, 7 циклів — денатурація за  $94^{\circ}\text{C}$  — 30 с, за температури, вищої за температуру відпалу праймерів  $67^{\circ}\text{C}$  — 30 с, з кожним циклом температура знижувалась на  $1^{\circ}\text{C}$ , елонгація за  $72^{\circ}\text{C}$  — 1 хв та ще 25 циклів — денатурація за  $94^{\circ}\text{C}$  — 30 с, за температури відпалу праймерів  $60^{\circ}\text{C}$  — 30 с, елонгація за  $72^{\circ}\text{C}$  — 1 хв, фінальна елонгація — 5 хв. За наявності алеля *Wx-D1a* (дикий тип) очікувався амплікон 930 пн, *Wx-D1b* (нуль-алель) — 342 пн. У разі гетерозиготного організму виявлялись амплікони обох типів.

Для інтенсифікації досліджень розроблено мультиплексну низхідну ПЛР для одночасного виявлення нуль-алелів генів *Wx-B1* та *Wx-D1* з праймерами, запропонованими авторами праць [11, 14].

Умови реакції: початкова денатурація 3 хв за  $94^{\circ}\text{C}$ , 6 циклів — 30 с за  $94^{\circ}\text{C}$ , 1 хв за температури, вищої за температуру відпалу праймерів —  $71^{\circ}\text{C}$ , з кожним циклом температура знижувалась на  $1^{\circ}\text{C}$ , 1 хв за  $72^{\circ}\text{C}$  та ще 25 циклів — 30 с за  $94^{\circ}\text{C}$ , 1 хв за температури відпалу праймерів  $64^{\circ}\text{C}$ , 1 хв за  $72^{\circ}\text{C}$ , фінальна елонгація — 5 хв.

Продукти ампліфікації розділяли методом горизонтального електрофорезу в 1,2 %-му агарозному гелі, натрійборатному буфері з 0,5 мг/мл бромистого етидію [4]. Електрофореграми документували системою для візуалізації результатів електрофорезу.

## Результати та обговорення

Скринінг рослинного матеріалу для визначення алельного стану гена *Wx-A1* проводили за допомогою CAPS-молекулярного маркера, запропонованого авторами праць [13, 14]. Оскільки після проведення ПЛР із цим молекулярним маркером розміри ампліконів у алеля дикого типу і нуль-алеля відрізнялись лише на 19 пн, то для ліпшої візуалізації після ампліфікації ПЛР-продукт гідролізували ендонуклеазою рестрикції *HindIII*. Ця система дає змогу визначати як гомозиготні, так і гетерозиготні рослини.

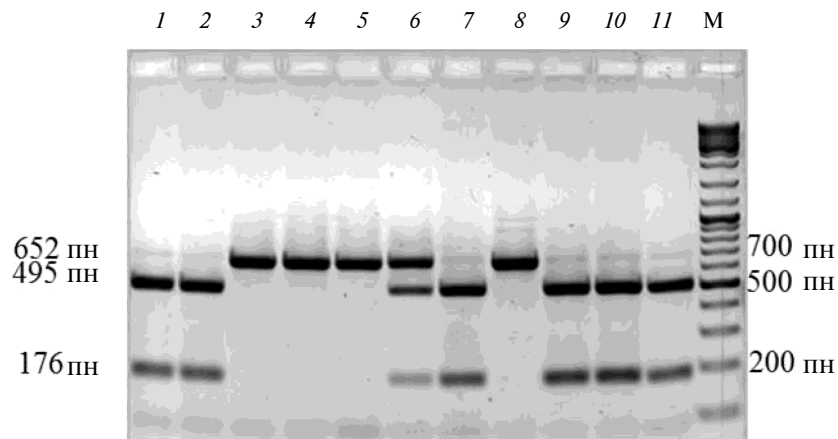


Рис. 4. Электрофореграма результатів полімеразної ланцюгової реакції на ген *Wx-A1*: 1–11 — дослідні зразки № 658–668. Тут і на рис. 5–10: М — маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific)

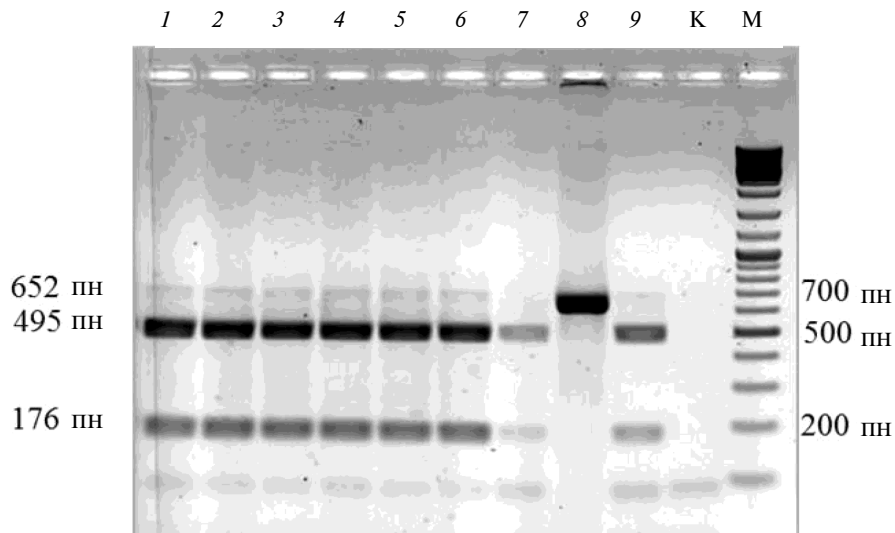


Рис. 5. Электрофореграма результатів полімеразної ланцюгової реакції на ген *Wx-A1*: 1–7 — дослідні зразки № 669–675; 8 — контрольний зразок із нуль-алелем *Wx-A1b* гена; 9 — контрольний зразок з алелем дикого типу (*Wx-A1a*); К — негативний контроль

Результати типової ампліфікації на ген *Wx-A1* наведено на рис. 4 та 5.

На доріжках 1, 2, 7, 9–11 (див. рис. 4) спостерігались амплікони 495 та 176 пн, що свідчить про наявність алеля дикого типу, на доріжках 3–5, 8 — амплікон 652 пн, що відповідає делеції 19 пн, характерної для нуль-алеля.

На доріжках 1–7 (див. рис. 5) виявлено амплікони 495 та 176 пн, що свідчить про наявність алеля дикого типу. Контролем наявності нуль-алеля був сорт Софійка (доріжка 8), алеля дикого типу — сорт Золотоколоса (доріжка 9), негативним контролем ПЛР реакції — реакційна суміш без ДНК.

Для визначення нуль-алеля гена *Wx-B1* та одночасного контролю якості виділеної ДНК й адекватності перебігу реакції брали дві пари

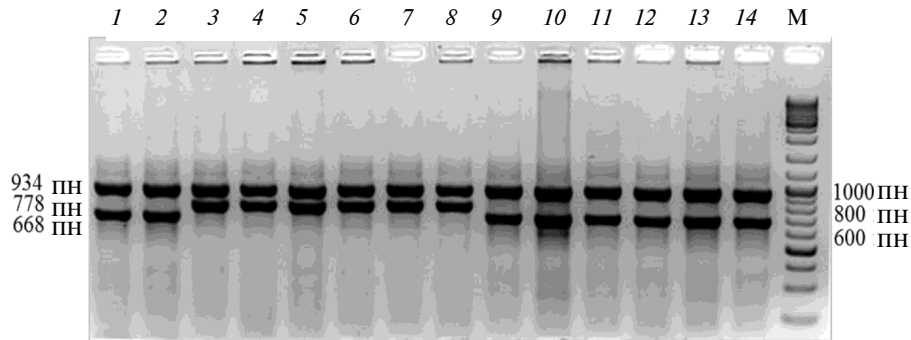


Рис. 6. Электрофореграма результатів полімеразної ланцюгової реакції на ген *Wx-B1*:  
1–14 – дослідні зразки № 765–778

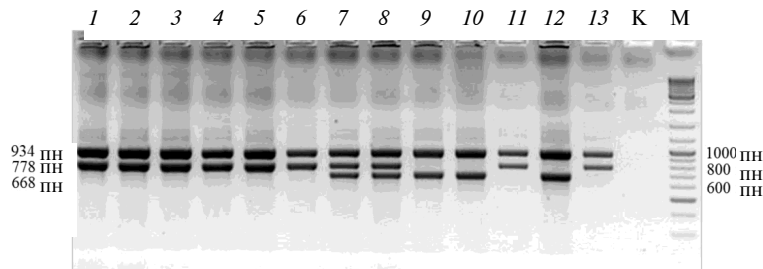


Рис. 7. Электрофореграма результатів полімеразної ланцюгової реакції на ген *Wx-B1*:  
1–11 – дослідні зразки № 779–789; 12 – контрольний зразок із нуль-алелем; 13 – контрольний зразок з алелем дикого типу; К – негативний контроль

праймерів на ген *Wx-B1*, запропоновані авторами праці [11], та праймери до референтного гена пшениці *TaTM20*, запропоновані авторами праці [8] (рис. 6, 7). Слід зазначити, що в дослідженні усі три системи молекулярних маркерів є кодомінантними.

На доріжках 1, 2, 9–14 (див. рис. 6) спостерігається амплікон 668 пн, який свідчить про наявність нуль-алеля, на доріжках 3–8 амплікон 778 пн свідчить про наявність алеля дикого типу. В усіх зразках виявлено амплікони 934 пн референтного гена, необхідні для внутрішнього контролю якості виділеної ДНК та перебігу реакції ампліфікації.

На доріжках 1–6, 11 (див. рис. 7) виявлено амплікон 778 пн (алель дикого типу), на доріжках 9, 10 – 668 пн (нуль-алель), у зразках 7, 8 – фрагменти обох типів однакової інтенсивності, що свідчить про гетерозиготний стан рослин по цьому гену. Контролем наявності нуль-алеля слугував сорт Софійка (доріжка 12), алеля дикого типу – сорт Золотоколоса (доріжка 13), негативним контролем ПЛР реакції – реакційна суміш без ДНК.

Нуль-алель гена *Wx-D1* виявляли за допомогою STS-маркерної системи, запропонованої авторами праці [14] (рис. 8, 9).

На доріжках 1, 2 (див. рис. 8) амплікон 342 пн свідчить про наявність нуль-алеля гена *Wx-D1*, на доріжках 5, 6, 9–11 амплікон 930 пн – про наявність алеля дикого типу. Зразки 3, 4, 7, 8 містили фрагменти обох типів, що характерно для гетерозиготних рослин.

Зразки 1–3 (див. рис. 9) містили амплікон 930 пн (алель дикого типу), 4–8 – 342 пн (нуль-алель). Контролем наявності нуль-алеля слугував сорт Софійка (доріжка 8), алеля дикого типу – сорт Золотоколоса (доріжка 9), негативним контролем ПЛР реакції – реакційна суміш без ДНК.

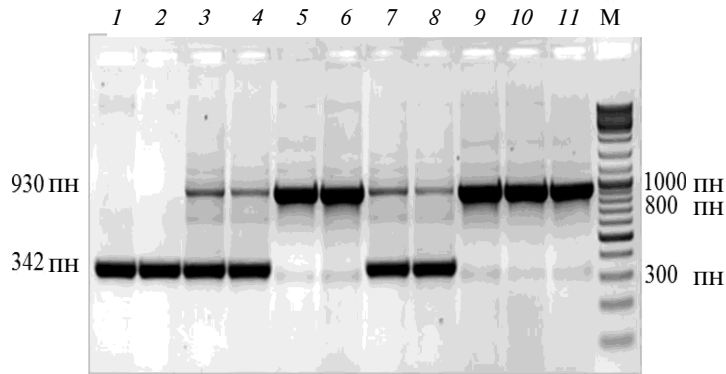


Рис. 8. Электрофореграма результатів полімеразної ланцюгової реакції на ген *Wx-D1*:  
1–11 — дослідні зразки № 676–686

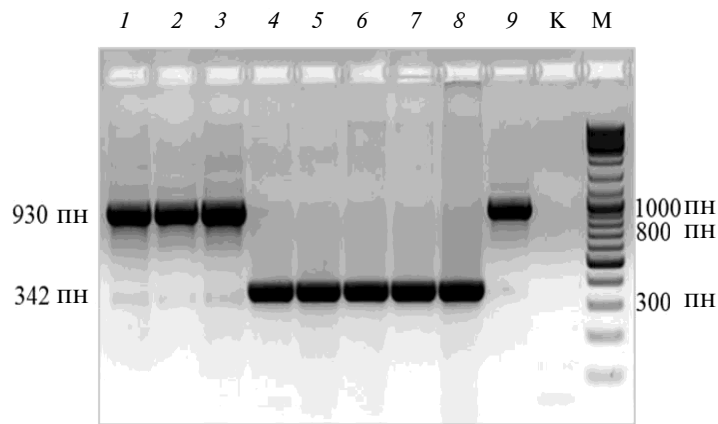


Рис. 9. Электрофореграма результатів полімеразної ланцюгової реакції на ген *Wx-D1*:  
1–7 — дослідні зразки № 687–693; 8 — контрольний зразок із нуль-алелем; 9 — контрольний зразок з алелем дикого типу; К — негативний контроль

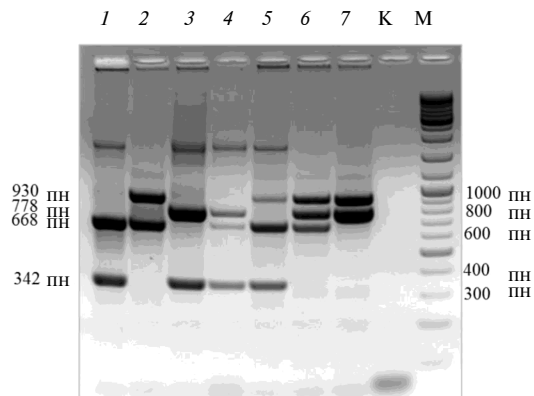


Рис. 10. Электрофореграма результатів мультиплексної низхідної полімеразної ланцюгової реакції на гени *Wx-B1* та *Wx-D1*:

1–7 — дослідні зразки; К — негативний контроль



Для пришвидшення аналізу великої кількості зразків маркерні системи для визначення нуль-алелів генів *Wx-B1* та *Wx-D1* були поєднані. Результати типової ампліфікації наведено на рис. 10.

Згідно з результатами електрофореграми, зразок 1 містив нуль-алелі генів *Wx-B1*, *Wx-D1*, зразок 2 — нуль-алель гена *Wx-B1* та алель дикого типу гена *Wx-D1*, зразок 3 — алель дикого типу гена *Wx-B1* та нуль-алель гена *Wx-D1*, зразок 4 — гетерозиготний за геном *Wx-B1* і містив нуль-алель гена *Wx-D1*, зразок 5 — нуль-алель гена *Wx-B1*, він гетерозиготний за геном *Wx-D1*, зразок 6 — гетерозиготний за геном *Wx-B1* і містив алель дикого типу гена *Wx-D1*, зразок 7 містив алелі дикого типу обох генів. Ці дані підтвердили результати окремих ПЛР на зазначені гени. Отже, запропонована комплексна система є дієвою для аналізу зразків пшениці на наявність нуль-алелів генів *Wx-B1*, *Wx-D1*.

За результатами аналізу 154 зразків 16 виявилися гетерозиготними, інші 138 — гомозиготними.

Гомозиготні зразки за генотипами розподілились так:

Сумарна кількість гомозиготних зразків для можливих восьми генотипів

Генотип	Кількість зразків
<i>Wx-A1a</i> , <i>Wx-B1a</i> , <i>Wx-D1a</i>	26
<i>Wx-A1b</i> , <i>Wx-B1b</i> , <i>Wx-D1b</i>	4
<i>Wx-A1b</i> , <i>Wx-B1a</i> , <i>Wx-D1a</i>	26
<i>Wx-A1a</i> , <i>Wx-B1b</i> , <i>Wx-D1a</i>	7
<i>Wx-A1a</i> , <i>Wx-B1a</i> , <i>Wx-D1b</i>	17
<i>Wx-A1b</i> , <i>Wx-B1b</i> , <i>Wx-D1a</i>	27
<i>Wx-A1b</i> , <i>Wx-B1a</i> , <i>Wx-D1b</i>	15
<i>Wx-A1a</i> , <i>Wx-B1b</i> , <i>Wx-D1b</i>	16

Примітка: *Wx-A1a*, *Wx-B1a*, *Wx-D1a* — алелі дикого типу, *Wx-A1b*, *Wx-B1b*, *Wx-D1b* — нуль-алелі.

За отриманими результатами розподілу досліджених зразків за комбінаціями алельного стану генів *Wx* можна провести біохімічний і технологічний аналізи різних форм генотипів частково ваксі.

Роботу профінансовано за проектом № П-2-12 Національної академії наук України.

1. Дивашук М.Г., Климушина М.В., Карлов Г.И. Молекулярно-генетическая характеристика аллеля *Wx-Ble* мягкой пшеницы и применимость ДНК маркеров для его идентификации // Генетика. — 2011. — 47, № 12. — С. 1611—1615.
2. Копусь М.М., Игнатъева Н.Г., Васюшкина Н.Е. и др. Генетический полиморфизм амилитических ферментов зерна пшеницы и генетика ферментов биосинтеза крахмала // Зерновое хоз-во России. — 2009. — № 4. — С. 23—27.
3. Ластухін Ю.О., Воронов С.А. Органічна хімія. — Львів: Центр Європи, 2001. — 864 с.
4. Brody J.R., Kern S.E. History and principles of conductive media for standart DNA electrophoresis // Anal. Biochem. — 2004. — 333. — P. 1—13.
5. Chao S., Sharp P., Worland A.J. et al. RELP-based genetic map of wheat homeologous group 7 chromosomes // Theor. Appl. Genet. — 1989. — 78. — P. 495—504.
6. Graybosh R.A. Waxy wheats: origin, properties and prospects // Trends Food Sci. Technol. — 1998. — 9. — P. 135—142.
7. James M., Denyer K., Myers A.M. Starch synthesis in the cereal endosperm // Curr. Opin. Plant Biol. — 2003. — 6. — P. 215—222.

8. Kim Y.-Y., Kim D.-Y., Shim D. et al. Expression of the novel wheat gene TM20 confers enhanced cadmium tolerance to bakers' yeast // Biol. Chem. — 2008. — **283** (23). — P. 15893—15902.
9. Regina A., Bird A., Topping D. et al. High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2006. — **103**. — P. 3546—3551.
10. Rodriguez-Quijano M., Nieto-Taladriz M.T., Carrillo J.M. Polymorphism of waxy protein in Iberian hexaploid wheats // Plant Breed. — 1998. — **117**. — P. 341—344.
11. 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. Breed. — 2009. — **23**. — P. 209—217.
12. Stewart C.N.Jr., Via L.E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications // BioTechniques. — 1993. — **14**(5). — P. 748—749.
13. Vanzetti L.S., Pfluger L.A., Rodriguez-Quijano M. et al. Genetic variability for waxy genes in Argentinean bread wheat germplasm // Electronic J. Biotechnol. — 2009. — **12**. — P. 1—9.
14. Vrinten P., Nakamura T., Yamamori M. Molecular characterization of waxy mutations in wheat // Mol. Gen. Genet. — 1999. — **261**. — P. 463—471.
15. Yasui T., Matsuki J., Sasaki T., Yamamori M. Amylose and lipid contents, amylopectin structure, and gelatinisation properties of waxy wheat starch // J. Cereal Sci. — 1996. — **24**. — P. 131—137.
16. Zhao X.C., Sharp P.J., Crosbie G. et al. A single genetic locus associated with starch granule properties in a cross between wheat cultivars of disparate noodle quality // Ibid. — 1998. — **27**. — P. 7—13.

Отримано 04.11.2014

#### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *Wx* В ГИБРИДАХ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПЛЕКСНЫХ ПОЛИМЕРАЗНЫХ ЦЕПНЫХ РЕАКЦИЙ

Б.В. Моргун<sup>1,2</sup>, Е.В. Степаненко<sup>1,3</sup>, А.И. Степаненко<sup>1</sup>, А.И. Рыбалка<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, Киев

<sup>2</sup>Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

<sup>3</sup>Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт»

<sup>4</sup>Селекционно-генетический институт—Национальный центр семеноведения и сортоизучения Национальной академии аграрных наук Украины, Одесса

Одной из важных характеристик, определяющих свойства пшеничной муки, является соотношение амилозы и амилопектина в крахмале зерновки. В результате исследования разработаны молекулярные маркерные системы для определения аллелей генов *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1*, ответственных за синтез амилозы, на основе мультиплексных полимеразных цепных реакций (ПЦР). Проанализирована статистически достаточная выборка из 154 гибридных линий для обнаружения всех комбинаций генов *Wx*. Согласно полученным данным, 16 образцов оказались гетерозиготными, остальные 138 — гомозиготными. Среди исследованных образцов найдены все комбинации генов *Wx*.

#### MOLECULAR-GENETIC IDENTIFICATION OF *Wx* GENES POLYMORPHISM IN WHEAT HYBRIDS BY MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTIONS

B.V. Morgun<sup>1,2</sup>, O.V. Stepanenko<sup>1,3</sup>, A.I. Stepanenko<sup>1</sup>, O.I. Rybalka<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine 148 Akademika Zabolotnoho St., Kyiv, 03143, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine 31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

<sup>3</sup>National Technical University of Ukraine «Kyiv Polytechnic Institute» 37 Peremogy Avenue, Kyiv, 03056, Ukraine

<sup>4</sup>Plant Breeding and Genetics Institute—National Center of Seed and Cultivars Investigation,  
National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine  
3 Ovidiopolska Road, Odesa, 65036, Ukraine

In starch grains the ratio of amylose to amylopectin is one of the important characteristics that determine the properties of wheat flour. In this study we developed molecular marker systems basing on multiplex polymerase chain reactions (PCR) to determine alleles of genes *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* responsible for amylose synthesis. Statistically adequate sample of 154 hybrid lines were analyzed for presence of all combinations of Wx genes. As a result 16 samples were heterozygous and other 138 samples were homozygous. All possible combinations of Wx genes were found among the analyzed hybrids.

*Key words:* wheat, waxy genes (*Wx*), polymerase chain reaction, molecular markers, *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1*, starch.