

И.А. Жирнова, А.Б. Рысбекова, Э.Н. Дюсибаева, А.И. Сейтхожаев,
Г.Т. Есенбекова, А.Е. Жакенова, Н.Б. Малтай

Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, Нур-Султан, Казахстан
(E-mail: aiman_rb@mail.ru)

Оценка аллельного состояния *wx* генов коллекции проса (*Panicum miliaceum* L.) на основе молекулярно-генетических маркеров

В статье представлены результаты анализа по изучению полиморфизма вакси гена проса с помощью молекулярных маркеров для ускорения селекционного процесса по созданию казахстанских низкоамилозных сортов. Для изучения полиморфизма вакси гена использовали коллекцию проса из 88 образцов различного географического происхождения (Афганистан, Бельгия, Венгрия, КНР, Канада, Индия, Иран, Мексика, Пакистан, Российская Федерация, Соединенные Штаты Америки, Турция, Украина, Франция). Скрининг отечественной и мировой коллекции проса на аллельное состояние *waxy* гена проводили с помощью следующих молекулярных маркеров: FPSLVVC3 и Rstop3; FPSLVVC3 и ex7Srex; int7Sf и Rstop3; int5Sf и R11; M5 и R11; M12 и R12; int5Lf и R3. Для каждого праймера были подобраны оптимальные условия проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Из проведенных анализов полиморфизма вакси аллелей среди изученных праймеров эффективными оказались маркеры int5f/ R11 и int7Sf/Rstop3. Данные маркеры показали полиморфизм у большинства образцов, хотя оба маркера не выявили четких отличий между амилозными и глютинозными генотипами. По остальным маркерам ДНК профили ПЦР продуктов у всех генотипов показали мономорфность.

Ключевые слова: просо, коллекция, амилозный, глютинозный, вакси ген, ДНК, маркер, ПЦР, полиморфизм.

Введение

Просо посевное (*Panicum miliaceum* L.) является одной из важнейших крупяных культур в мире. Оно используется как источник получения ценного продукта — пшена (просяной крупы). Пшено обладает хорошими вкусовыми качествами и высокими пищевыми достоинствами. Пшено содержит 12–14,7 % белка — больше, чем рисовая, ячневая, кукурузная и сорговая крупы. В составе белка выявлены 19 аминокислот, в том числе и все незаменимые аминокислоты. По этому показателю пшено превосходит крупы из других культур, а также ржаной и пшеничный хлеб. По содержанию жира (3,5 %) оно уступает только овсяной крупе и кукурузе [1]. К просовидным злакам относят: просо обыкновенное (*Panicum miliaceum* L.), чумизу (*Setaria italica* subsp. *italica* H.Scholz), могар (*Setaria italica* subsp. *Mocharia* (Alef.) H.Scholz), пайзу (*Echinochloa frumentaceae* Link), африканское просо (*Pennisetum americanum* (L.) Schuman) и другие. Мировое производство зерна просовидных культур, по данным ФАО, составляет около 30 млн т, из них просо жемчужное (*Pennisetum*) — 52 %, просо итальянское, или чумиза, могар (*Setaria*) — 18 %, просо посевное (*Panicum miliaceum* L.) — 14 %. Среди просовидных культур наибольшее распространение в нашей стране занимает просо обыкновенное, имеющее продовольственное, кормовое и резервно-стратегическое значение [2].

Просо посевное возделывается в 30 странах мира, в том числе и в 18 странах Европы. Основными производителями проса посевного в настоящее время являются пять стран: РФ, Индия, Китай, США и Украина [3, 4]. В соседней России просо занимает наибольшие площади среди крупяных культур. Посевы его распространены в наиболее засушливых регионах России: на юго-востоке, в центрально-черноземной зоне, на Украине и в Казахстане, где сосредоточено более 30 % посевных площадей, причем в исконно прососеющих областях — Актюбинской, Павлодарской и Уральской. Почти вдвое увеличены площади под просом в Костанайской, Акмолинской и Восточно-Казахстанской областях. С освоением целинных земель в Казахстане площади посевов проса достигли 1,7 млн га [5], но на сегодняшний день площадь посевов снизилась до 48,4 тыс. га.

Развитие прососеяния — перспективное направление в решении ряда задач по обеспечению населения продовольствием. Основным и наиболее ценным продуктом просоводства является пшено, по вкусовым качествам и пищевым достоинствам занимающее одно из первых мест среди других круп.

В зерне проса содержится 81 % крахмала. Крахмальное зерно состоит из амилозы и амилопектина. Ключевым ферментом в синтезе амилозы является гранул-связанная синтаза крахмала (GBSSI), также известная как белок *Waxy* [6]. У кукурузы, ячменя, риса, овса и у пшеницы были

обнаружены мутанты по генам *Wx*, у которых наблюдалось снижение содержания или полное отсутствие амилозы [7]. Установлено, что у пшеницы каждый из генов *Wx* имеет несколько аллелей: активный аллель (*a*), кодирующий синтез белка *Waxy*; неактивный (*w* — нуль-аллель), при котором синтез функционального белка *Waxy* отсутствует; функциональные аллели с различной ферментативной активностью белка *Waxy* [8]. Fukunaga et al. (2002) в своих исследованиях показал наличие двух локусов гена *GBSSI* (*granule-bound starch syntase*) у проса *P. miliaceum*, который условно обозначил «*S*» — короткий и «*L*» — длинный гены [9]. Содержание амилозы у восковидного эндосперма проса составляет до 3,5 % и контролируется рецессивными аллелями *wx-1/wx-2*, а у невосковидного эндосперма — доминантными аллелями *Wx-1* и *Wx-2* [10]. Продукты восковидных (*wx*) сортов зерновых культур владеют высокими диетическими свойствами и служат источником производства амилопектинового крахмала для промышленности, поэтому в последнее время начались исследования по созданию *wx*-сортов многих культур, в частности пшеницы, риса, проса [11–14]. Восковидные (глиутинозные) формы проса были еще известны с XIX в. [15]. На современном рынке *waxy* типы проса из-за их повышенной клейкости и высокой обволакивающей способности имеют высокий спрос и характеризуются продовольственным достоинством.

Цель работы — изучение аллельного состояния генов *Wx* проса с помощью молекулярных маркеров для ускорения селекционного процесса по созданию казахстанских глиутинозных сортов проса.

Материалы и методы исследования

В исследованиях полиморфизма вакси гена использовали коллекцию проса из 88 образцов. Из них 45 были получены от Peginal Plant Introduction Station (мировая коллекция USDA), Iowa State University (США), 28 — образцы из ВИР (Санкт-Петербург, Россия), 15 — из казахстанских селекционных учреждений. В качестве глиутинозного стандарта использовали образец PI 436626 (*LungShu 18*) из коллекции USDA.

Экстракция ДНК из проростков проса. Для проведения молекулярно-генетического анализа ДНК выделяли из 5-дневных бесхлорофилльных проростков проса по модифицированному методом СТАВ [16]. Семена проращивали во влажной камере в стерильной чашке Петри, на увлажненной стерильной фильтровальной бумаге, в темноте, при температуре 25 °С. 2–3 шт. проростков положили в пробирку объемом 2 мл и добавили 400 мкл СТАВ 2 %-буфера, затем измельчали с помощью палочки-измельчителя. Добавили 10 мкл РНКазы и инкубировали 60 мин при 65 °С на водяной бане, периодически аккуратно взбалтывали. После добавили 400 мкл смеси хлороформа и изоамилового спирта и центрифугировали 1 мин при максимальной скорости (13000 об/мин). Осторожно пипеткой отобрали верхнюю фазу, перенесли в новую пробирку и добавили 350 мкл холодного изопропанола и тщательно перемешивали. Центрифугировали 5 мин при максимальной скорости (13000 об/мин), сливали спирт и ДНК оставили в открытой пробирке для сушки. Высохшую ДНК растворили в дистиллированной воде и концентрацию определяли на нанодропе (Nano Drop 2000, Thermo Scientific).

Реакционная смесь ПЦР объемом 15 мкл содержала: 8 мкл 2×Green Master Mix (USA), 5,2 мкл ddH₂O, 10 μM 1 мкл каждого праймера (R, F) и 100–150 нг ДНК-матрицы. ДНК-амплификацию осуществляли в амплификаторе SimpliAmp™ ThermalCycler, (Thermo Fisher Scientific). В качестве маркера молекулярного веса использовали «100 bp Ladder» (BioLabs, New England). Во всех экспериментах все использованные праймеры синтезированы компанией «Applied Biosystems» (США). Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1 %-м агарозном (Molecular Biology Grade, Invitrogen) геле в трис-ацетатном буферном растворе (TAE: Трис-ацетат — 40 мМ, ЭДТА — 1 мМ, pH 8,0). Электрофорез проводили при напряжении 120 V в течение 1 ч. После электрофореза визуализацию результатов амплификации осуществляли с помощью гель-документирующей системы (Viber, 2010).

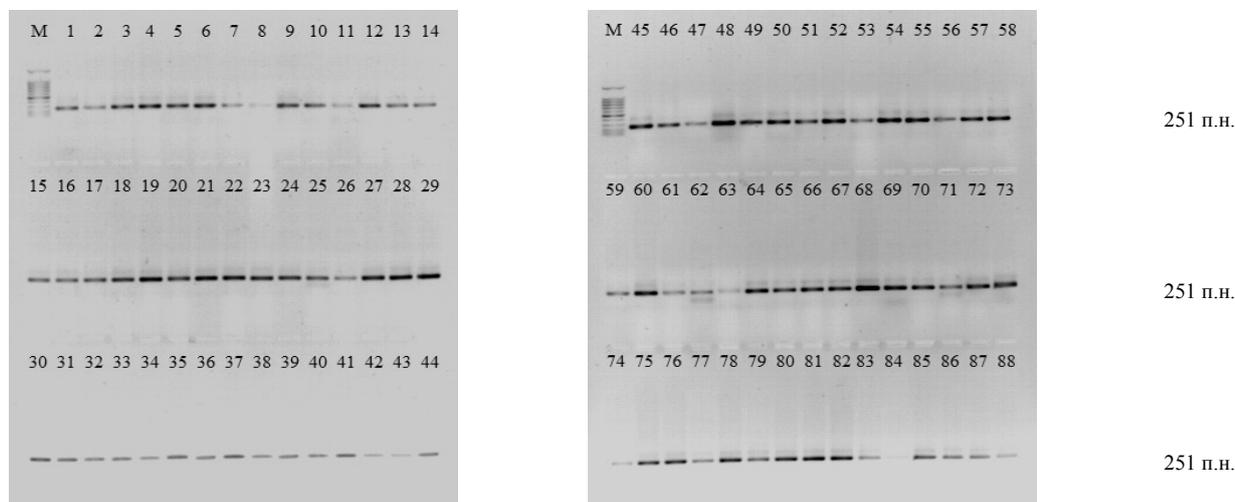
Результаты исследования и их обсуждение

Для оценки аллельного состояния *Wx* гена у коллекции проса использовали метод молекулярного маркирования. Для проведения ПЦР-анализа на начальном этапе были оптимизированы параметры ПЦР и электрофореза. Для выявления полиморфизма вакси гена были подобраны следующие праймеры: *FPSLVVC3* и *Rstop3*; *FPSLVVC3* и *ex7Srex*; *int7Sf* и *Rstop3*; *int5Sf* и *R11*; *M5* и *R11*; *M12* и *R12*; *int5Lf* и *R3*. Продукты ПЦР разделяли в 1 % агарозном геле. В качестве стандарта использованы глиутинозные образцы. Последовательность данных праймеров и оптимизированная программа условий проведения ПЦР указаны в таблице.

Сиквенс праймерных пар для проса

Праймеры	Последовательность праймеров (5'–3')	Условия ПЦР
FPSLVVC3 и Rstop3	F — TCCCTCCCTCGTCGTCTGCGC R — AGGGAGCGGCCACGTTCTCCTT [17]	98 °С — 30 с; 40 циклов: 98 °С — 10 с; 72 °С — 2 мин 30 с; 1 цикл: 72 °С — 10 мин
FPSLVVC3 и ex7Srext	F — TCGTTTGATGTTCTAGACGCC R — GGGGCAACSTTTGCATTCTTGTAGATG [17]	98 °С — 30 с; 40 циклов: 98 °С — 10 с; 71 °С — 30 с; 72 °С — 1 мин; 1 цикл: 72 °С — 10 мин
int7Sf и Rstop3	F — TCCCTCCCTCGTCGTCTGCGC R — AGGGAGCGGCCACGTTCTCCTT [17]	98 °С — 30 с; 40 циклов: 98 °С — 10 с; 64 °С — 30 с; 72 °С — 1 мин; 1 цикл: 72 °С — 10 мин
int5Sf и R11	F — TGCATTTAAACAAGGGGCGAGTACTG R — CAGGCACACTGCTCCCAATG [17]	98 °С — 30 с; 40 циклов: 98 °С — 20 с; 64 °С — 30 с; 72 °С — 30 с; 1 цикл: 72 °С — 10 мин
M5и R11	F — GGACGTCAGCGAGTGGGACC R — CAGGCACACTGCTCCCAATG [17, 18]	94 °С — 2 мин; 30 циклов: 94 °С — 30 с; 58 °С — 30 с; 72 °С — 1 мин 30 с; 1 цикл: 72 °С — 7 мин
M12 и R12	F — CGTGACCATCTCTTCCTGTA R — CGACGACGAACTCTCAACAC [17]	94 °С — 2 мин; 30 циклов: 94 °С — 30 с; 58 °С — 30 с; 72 °С — 1 мин 30 с; 1 цикл: 72 °С — 7 мин
int5Lf и R3	F — ATGTTGAATGAATGCTCC R — TGGTAGTTGCTCTTGAGGTA [17, 18]	94 °С — 2 мин; 35 циклов: 94 °С — 45 с; 54 °С — 30 с; 72 °С — 150 с; 1 цикл: 72 °С — 7 мин

Длинный «L» locus гена GBSSI, контролирующий синтез крахмала у проса, охватывает 3,6 кб и содержит 14 экзонов [10]. Праймер Int5Lf/R3 в L локусе охватывает область между 5 и 7 интроном. При использовании маркера Int5Lf/R3 у всех образцов проса амплифицировались фрагменты размером 251 п.н. (рис. 1).

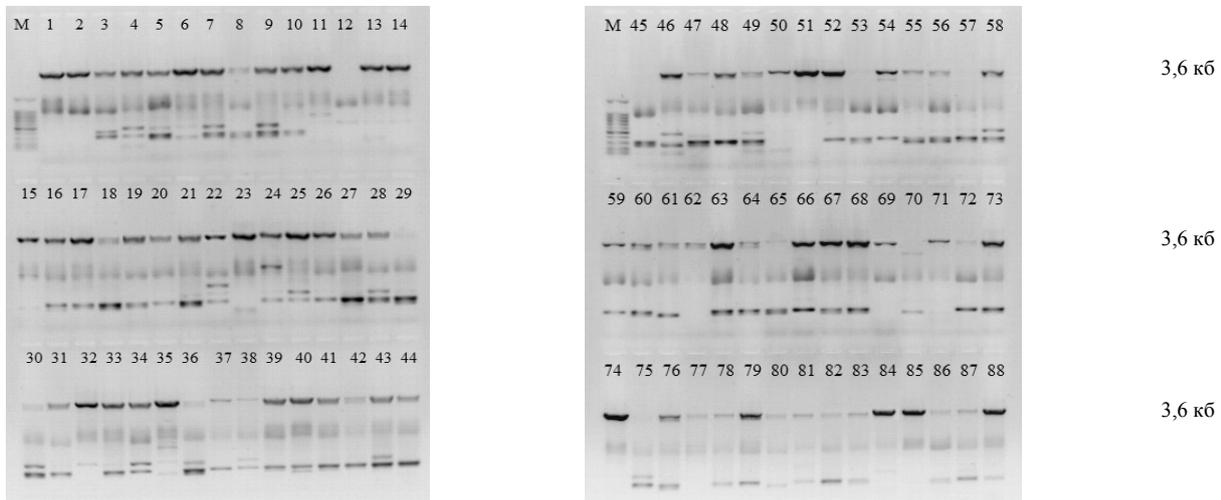


M — маркер; 1 — Ames 11641; 2 — PI 170587; 3 — PI 170589; 4 — PI 170591; 5 — PI 173002; 6 — PI 173750; 7 — PI 173752; 8 — PI 177481; 9 — PI 180450; 10 — PI 204598; 11 — PI 207501; 12 — PI 211059; 13 — PI 219931; 14 — PI 220670; 15 — PI 222201; 16 — PI 223793; 17 — PI 251389; 18 — PI 253955; 19 — PI 255736; 20 — PI 260053; 21 — PI 268411; 22 — PI 269953; 23 — PI 269960; 24 — PI 289322; 25 — PI 289324; 26 — PI 289329; 27 — PI 296376; 28 — PI 346933; 29 — PI 222811; 30 — PI 346937; 31 — PI 346941; 32 — PI 346942; 33 — PI 365844; 34 — PI 365847; 35 — PI 367684; 36 — PI 463090; 37 — PI 463243; 38 — PI 463244; 39 — PI 531404; 40 — PI 649373; 41 — PI 649374; 42 — PI 649375; 43 — PI 654403; 44 — K-9681; 45 — K-10112; 46 — K-9989; 47 — K-9645; 48 — K-10213; 49 — K-10204; 50 — K-10222; 51 — K-10286; 52 — K-10299; 53 — K-1066; 54 — K-803; 55 — K-3742; 56 — K-148; 57 — K-8873; 58 — K-1142; 59 — K-9910; 60 — K-9703; 61 — K-9658; 62 — K-9800; 63 — K-9837; 64 — K-1437; 65 — K3742; 66 — K-9580; 67 — Актюбинское кормовое; 68 — Памяти Берсиева; 69 — Яркое 3; 70 — Яркое 5; 71 — Яркое 6; 72 — Яркое 7; 73 — Омское 11; 74 — Кормовое 89; 75 — Павлодарское; 76 — Кокшетауское 66; 77 — Золотистое кормовое; 78 — Барнаульское кормовое; 79 — Саратовское 6; 80 — Уральское 109; 81 — Шортандинское 7; 82 — Саратовское 3; 83 — K-2377; 84 — K-1685; 85 — PI 346940; 86 — PI 346946; 87 — PI 436626; 88 — K-1 Mazha Yan

Рисунок 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с праймерами Int5Lf/R3

Среди изученных образцов коллекции проса данный маркер не выявил полиморфизма, ДНК-фрагменты всех сортов и образцов, а также у стандарт глютинозного сорта были идентичные по размеру. Это выражено на электрофореграмме наличием ПЦР фрагментов, расположенных на одинаковых позициях, размером 251 п.н.

Праймер FLVVC/Rstop3 полностью амплифицирует участок L гена, начиная со 2-го до 14-го экзона, размером ПЦР продукта 3,6 кб (рис. 2).



M — маркер; 1 — PI 346946; 2 — Ames 11641; 3 — PI 170587; 4 — PI 170589; 5 — PI 170591; 6 — PI 173002; 7 — PI 173750; 8 — PI 173752; 9 — PI 177481; 10 — PI 180450; 11 — PI 204598; 12 — PI 207501; 13 — PI 211059; 14 — PI 219931; 15 — PI 220670; 16 — PI 222201; 17 — PI 223793; 18 — PI 251389; 19 — PI 253955; 20 — PI 255736; 21 — PI 260053; 22 — PI 268411; 23 — PI 269953; 24 — PI 269960; 25 — PI 289322; 26 — PI 289324; 27 — PI 289329; 28 — PI 296376; 29 — PI 346933; 30 — PI 222811; 31 — PI 346937; 32 — PI 346941; 33 — PI 346942; 34 — PI 365844; 35 — PI 365847; 36 — PI 367684; 37 — PI 463090; 38 — PI 463243; 39 — PI 463244; 40 — PI 531404; 41 — PI 649373; 42 — PI 649374; 43 — PI 649375; 44 — PI 654403; 45 — K-9681; 46 — K-10112; 47 — K-9989; 48 — K-9645; 49 — K-10213; 50 — K-10204; 51 — K-10222; 52 — K-10286; 53 — K-10299; 54 — K-1066; 55 — K-803; 56 — K-3742; 57 — K-148; 58 — K-8873; 59 — K-1142; 60 — K-9910; 61 — K-9703; 62 — K-9658; 63 — K-9800; 64 — K-9837; 65 — K3742; 66 — K-1437; 67 — K-9580; 68 — Актюбинское кормовое; 69 — Памяти Берсиева; 70 — Яркое 3; 71 — Яркое 5; 72 — Яркое 6; 73 — Яркое 7; 74 — Омское 11; 75 — Кормовое 89; 76 — Павлодарское; 77 — Кокшетауское 66; 78 — Золотистое кормовое; 79 — Барнаульское кормовое; 80 — Саратовское 6; 81 — Уральское 109; 82 — Шортландинское 7; 83 — Саратовское 3; 84 — K-2377; 85 — K-1685; 86 — PI 346940; 87 — PI 436626; 88 — Mazha Yan

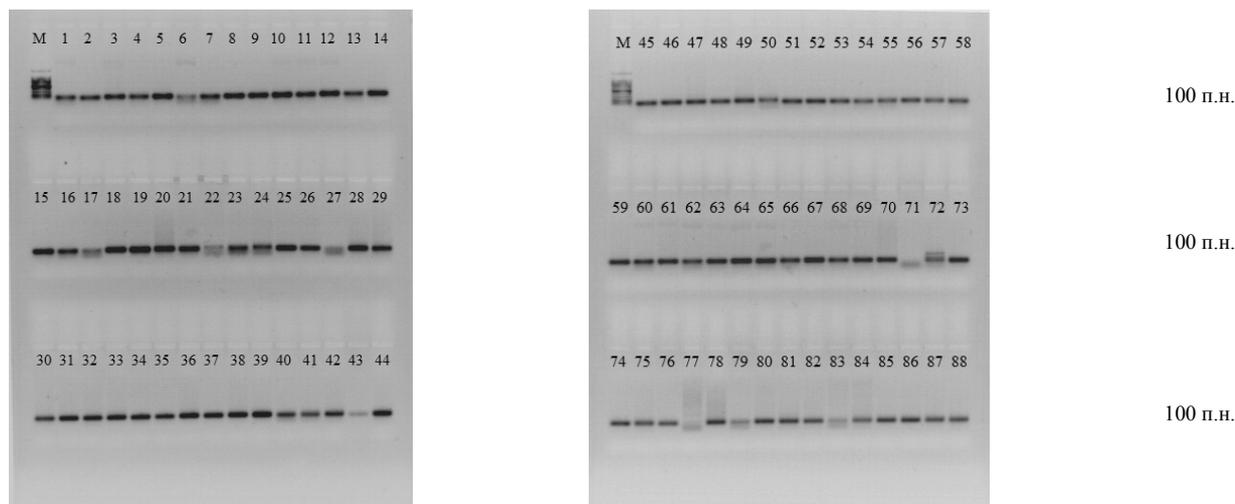
Рисунок 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с праймерами FLVVC/Rstop 3

Как видно из электрофореграммы, праймер FLVVC/Rstop3 не выявил отличий между амилозными и глютинозными образцами. При использовании данного праймера в ПЦР амплифицировался фрагмент длиной 3,6 кб. На электрофореграмме с ожидаемым ПЦР фрагментом также были четко отмечены неспецифические фрагменты ПЦР, размером около 300–400 п.н.

Праймер Int7Sf/Rstop3 охватывает участок S гена между 7 интроном и 14 экзоном. В десятом экзоне находится 15 пар делеции у вакси типов проса. При использовании данного молекулярного маркера у исследуемых образцов амплифицировались фрагменты размером около 100 п.н. На рисунке 3 представлены результаты электрофоретического анализа продуктов ПЦР по данным ДНК-маркерам у исследуемых образцов.

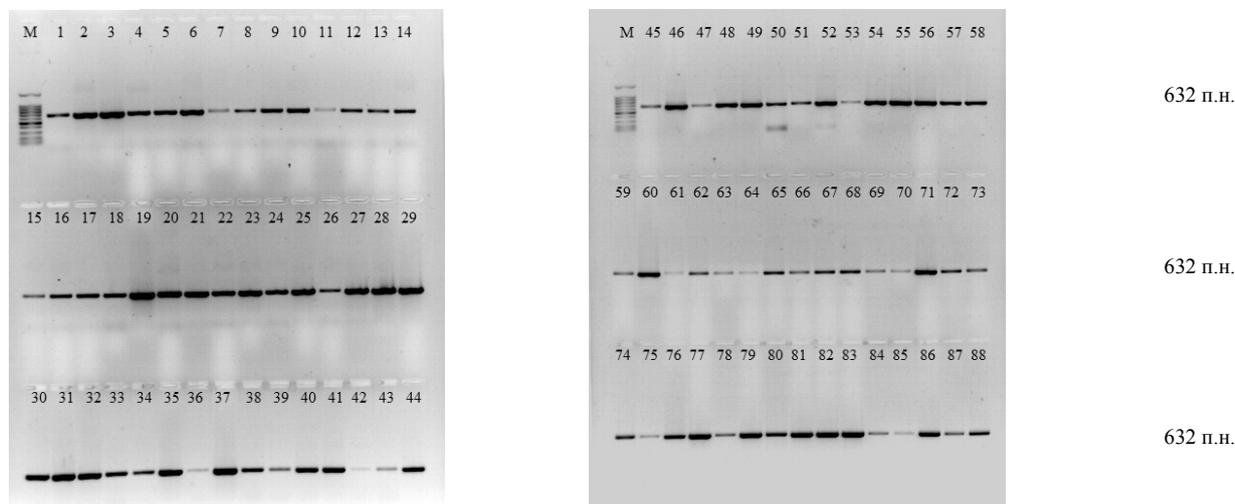
На электрофореграмме по данному маркеру четко выражен полиморфизм у некоторых образцов. Например, у образцов PI 22379322; PI 268411; PI 269953; PI 269960; PI 289329; PI 268411; PI 269953; PI 269960; PI 289329; Яркое 6; Барнаульское кормовое и Саратовское 3 отмечена гетерозиготность. При использовании данного молекулярного маркера у районированных сортов Яркое 5 и Кокшетауское 66 продукты амплификации отличались от остальных образцов, фрагменты ПЦР были размером около 90 п.н., а у остальных образцов — 100 п.н. Хотя данный маркер и показал полиморфизм между исследуемыми образцами, однако четких отличий между высоко- и низкоамилозными генотипами выявить не удалось.

Маркер M12/R12 амплифицирует ПЦР продукт размером 632 п.н. По результатам ПЦР анализа выявлено, что профили фрагментов ДНК у всех изученных генотипов оказались идентичными, и размер ампликона составил 632 п.н. (рис. 4).



M — маркер; 1 — PI 346946; 2 — Ames 11641; 3 — PI 170587; 4 — PI 170589; 5 — PI 170591; 6 — PI 173002; 7 — PI 173750; 8 — PI 173752; 9 — PI 177481; 10 — PI 180450; 11 — PI 204598; 12 — PI 207501; 13 — PI 211059; 14 — PI 219931; 15 — PI 220670; 16 — PI 222201; 17 — PI 223793; 18 — PI 251389; 19 — PI 253955; 20 — PI 255736; 21 — PI 260053; 22 — PI 268411; 23 — PI 269953; 24 — PI 269960; 25 — PI 289322; 26 — PI 289324; 27 — PI 289329; 28 — PI 296376; 29 — PI 346933; 30 — PI 222811; 31 — PI 346937; 32 — PI 346941; 33 — PI 346942; 34 — PI 365844; 35 — PI 365847; 36 — PI 367684; 37 — PI 463090; 38 — PI 463243; 39 — PI 463244; 40 — PI 531404; 41 — PI 649373; 42 — PI 649374; 43 — PI 649375; 44 — PI 654403; 45 — K-9681; 46 — K-10112; 47 — K-9989; 48 — K-9645; 49 — K-10213; 50 — K-10204; 51 — K-10222; 52 — K-10286; 53 — K-10299; 54 — K-1066; 55 — K-803; 56 — K-3742; 57 — K-148; 58 — K-8873; 59 — K-1142; 60 — K-9910; 61 — K-9703; 62 — K-9658; 63 — K-9800; 64 — K-9837; 65 — K3742; 66 — K-1437; 67 — K-9580; 68 — Актюбинское кормовое; 69 — Памяти Берсиева; 70 — Яркое 3; 71 — Яркое 5; 72 — Яркое 6; 73 — Яркое 7; 74 — Омское 11; 75 — Кормовое 89; 76 — Павлодарское; 77 — Кокшетауское 66; 78 — Золотистое кормовое; 79 — Барнаульское кормовое; 80 — Саратовское 6; 81 — Уральское 109; 82 — Шортандинское 7; 83 — Саратовское 3; 84 — K-2377; 85 — K-1685; 86 — PI 346940; 87 — PI 436626; 88 — MazhaYan

Рисунок 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с праймерами Int7Sf/Rstop 3

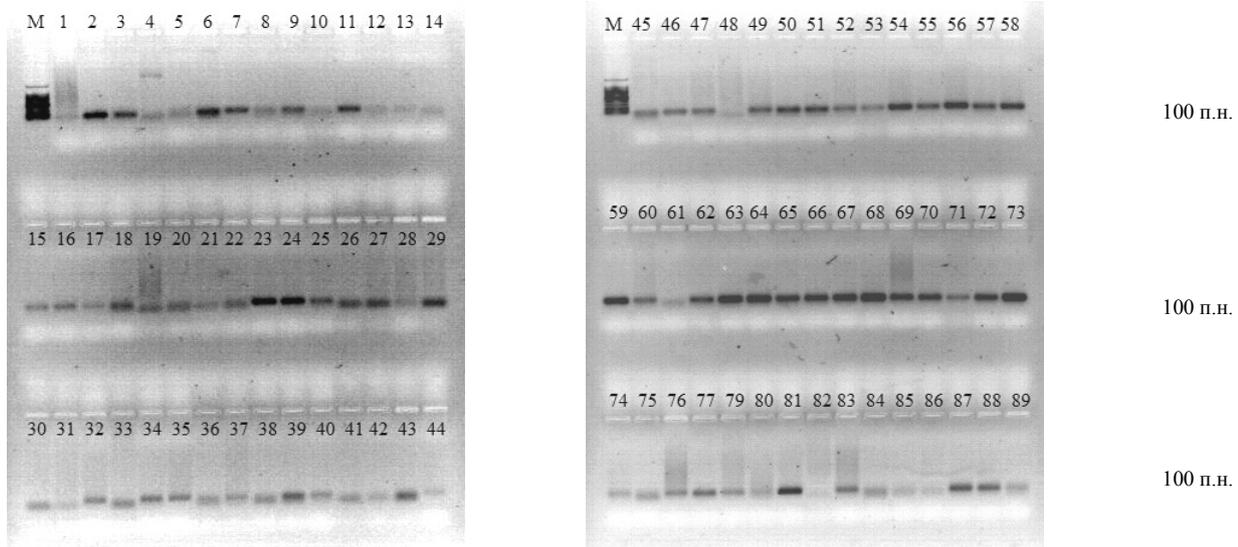


M — маркер; 1 — PI 346946; 2 — Ames 11641; 3 — PI 170587; 4 — PI 170589; 5 — PI 170591; 6 — PI 173002; 7 — PI 173750; 8 — PI 173752; 9 — PI 177481; 10 — PI 180450; 11 — PI 204598; 12 — PI 207501; 13 — PI 211059; 14 — PI 219931; 15 — PI 220670; 16 — PI 222201; 17 — PI 223793; 18 — PI 251389; 19 — PI 253955; 20 — PI 255736; 21 — PI 260053; 22 — PI 268411; 23 — PI 269953; 24 — PI 269960; 25 — PI 289322; 26 — PI 289324; 27 — PI 289329; 28 — PI 296376; 29 — PI 346933; 30 — PI 222811; 31 — PI 346937; 32 — PI 346941; 33 — PI 346942; 34 — PI 365844; 35 — PI 365847; 36 — PI 367684; 37 — PI 463090; 38 — PI 463243; 39 — PI 463244; 40 — PI 531404; 41 — PI 649373; 42 — PI 649374; 43 — PI 649375; 44 — PI 654403; 45 — K-9681; 46 — K-10112; 47 — K-9989; 48 — K-9645; 49 — K-10213; 50 — K-10204; 51 — K-10222; 52 — K-10286; 53 — K-10299; 54 — K-1066; 55 — K-803; 56 — K-3742; 57 — K-148; 58 — K-8873; 59 — K-1142; 60 — K-9910; 61 — K-9703; 62 — K-9658; 63 — K-9800; 64 — K-9837; 65 — K3742; 66 — K-1437; 67 — K-9580; 68 — Актюбинское кормовое; 69 — Памяти Берсиева; 70 — Яркое 3; 71 — Яркое 5; 72 — Яркое 6; 73 — Яркое 7; 74 — Омское 11; 75 — Кормовое 89; 76 — Павлодарское; 77 — Кокшетауское 66; 78 — Золотистое кормовое; 79 — Барнаульское кормовое; 80 — Саратовское 6; 81 — Уральское 109; 82 — Шортандинское 7; 83 — Саратовское 3; 84 — K-2377; 85 — K-1685; 86 — PI 346940; 87 — PI 436626; 88 — MazhaYan

Рисунок 4. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с праймерами M12/R12

Таким образом, по результатам ПЦР анализа M12/R12 маркер является мономорфным для всех образцов проса.

Маркер int5Sf/R11 кодирует участок S гена, который охватывает расстояние между нетранслируемым участком 5-го интрона и транслируемым участком 11-го экзона. При использовании маркера int5Sf/R11 большинство образцов показали полиморфизм (рис. 5).



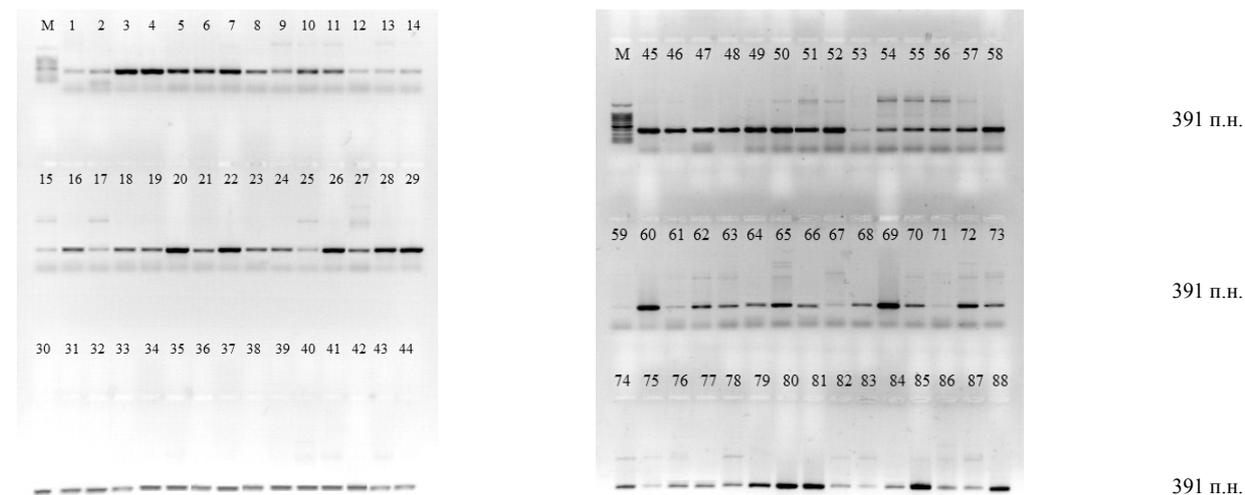
M — маркер; 1 — PI 346946; 2 — Ames 11641; 3 — PI 170587; 4 — PI 170589; 5 — PI 170591; 6 — PI 173002; 7 — PI 173750; 8 — PI 173752; 9 — PI 177481; 10 — PI 180450; 11 — PI 204598; 12 — PI 207501; 13 — PI 211059; 14 — PI 219931; 15 — PI 220670; 16 — PI 222201; 17 — PI 223793; 18 — PI 251389; 19 — PI 253955; 20 — PI 255736; 21 — PI 260053; 22 — PI 268411; 23 — PI 269953; 24 — PI 269960; 25 — PI 289322; 26 — PI 289324; 27 — PI 289329; 28 — PI 296376; 29 — PI 346933; 30 — PI 222811; 31 — PI 346937; 32 — PI 346941; 33 — PI 346942; 34 — PI 365844; 35 — PI 365847; 36 — PI 367684; 37 — PI 463090; 38 — PI 463243; 39 — PI 463244; 40 — PI 531404; 41 — PI 649373; 42 — PI 649374; 43 — PI 649375; 44 — PI 654403; 45 — K-9681; 46 — K-10112; 47 — K-9989; 48 — K-9645; 49 — K-10213; 50 — K-10204; 51 — K-10222; 52 — K-10286; 53 — K-10299; 54 — K-1066; 55 — K-803; 56 — K-3742; 57 — K-148; 58 — K-8873; 59 — K-1142; 60 — K-9910; 61 — K-9703; 62 — K-9658; 63 — K-9800; 64 — K-9837; 65 — K-3742; 66 — K-1437; 67 — K-9580; 68 — Актюбинское кормовое; 69 — Памяти Берсиева; 70 — Яркое 3; 71 — Яркое 5; 72 — Яркое 6; 73 — Яркое 7; 74 — Омское 11; 75 — Кормовое 89; 76 — Павлодарское; 77 — Кокшетауское 66; 78 — Золотистое кормовое; 79 — Барнаулское кормовое; 80 — Саратовское 6; 81 — Уральское 109; 82 — Шортандинское 7; 83 — Саратовское 3; 84 — K-2377; 85 — K-1685; 86 — PI 346940; 87 — PI 436626; 88 — Mazha Yan

Рисунок 5. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с праймерами int5Sf/R11

Из рисунка видно, что у образцов: PI 170589; PI 253955; PI 255736; PI 260053; PI 289324; PI 289329; PI 296376; PI 346933; PI 222811; PI 346937; PI 346942; PI 367684; PI 649373; PI 649374; PI 649375; K-9645; K-9703; K-2377; K-1685 и PI 346940 размер ПЦР фрагмента ниже 100 п.н., чем у остальных генотипов.

Маркер M5R11 фланкирует участок S гена между 9 и 11 экзонами. При использовании данного маркера ожидаемый размер ПЦР продукта у коллекции проса составил 391 п.н. (рис. 6).

Профили ПЦР продуктов у всех сортов и образцов оказались идентичными. Праймер M5R11 не обнаружил полиморфизма между амилозными и глютинозными генотипами, что говорит о наличии у них доминантной аллели вакси гена в гомозиготном состоянии. Восковой признак контролируется геном Wx, который кодирует фермент GBSSI, регулирующий синтез амилозы. Исследования Graybosch и Baltensperger [10] показали, что у восковидных генотипов содержание амилозы в крахмале эндосперма составляет до 3,5 %, и данный признак контролируется рецессивными аллелями wx-1/wx-2. Полученные нами результаты не выявили четких отличий между амилозными и глютинозными образцами коллекции проса, это можно объяснить тем, что среди изученных образцов содержание амилозы было выше 5 %.



1 — маркер; 2 — К3742; 3 — PI649372; 4 — Ames 11641; 5 — Ames 28191; 6 — PI 170587; 7 — PI 170589; 8 — PI 654404; 9 — PI 170591; 10 — PI 173002; 11 — PI 173750; 12 — PI 175798; 13 — PI 175798; 14 — PI 176654; 15 — PI 177481; 16 — PI 179391; 17 — PI 180450; 18 — PI 204598; 19 — PI 204598; 20 — PI 207501; 21 — PI 211059; 22 — PI 219931; 23 — PI 220670; 24 — PI 222201; 25 — PI 223793; 26 — PI 251389; 27 — PI 253955; 28 — PI 255736; 29 — PI 260053; 30 — PI 268411; 31 — PI 269953; 32 — PI 269960; 33 — PI 289322; 34 — PI 289324; 35 — PI 289329; 36 — PI 296376; 37 — PI 346933; 38 — PI 222811; 39 — PI 346937; 40 — PI 346941; 41 — PI 346942; 42 — PI 346944; 43 — PI 365844; 44 — PI 365847; 45 — Кормовое просо; 46 — PI 442533; 47 — PI 463090; 48 — PI 463243; 49 — PI 463244; 50 — PI 531404; 51 — PI 649373; 52 — PI 649374; 53 — PI 649375; 54 — PI 654403; 55 — К-9681; 56 — К-10112; 57 — К-9989; 58 — К-9645; 59 — К-10213; 60 — К-10204; 61 — К-10222; 62 — К-10299; 63 — К-1066; 64 — К-803; 65 — К-3742; 66 — К-148; 67 — К-5786; 68 — К-8873; 69 — К-1142; 70 — К-9910; 71 — К-9703; 72 — К- 9655; 73 — К- 9658; 74 — К-9800; 75 — К-9837; 76 — К-1437; 77 — К-9580; 78 — Актюбинское кормовое; 79 — Памяти Берсиева; 80 — Яркое 3; 81 — Яркое 5; 82 — Яркое 6; 83 — Яркое 7; 84 — Омское 11; 85 — Кормовое 89; 86 — Кокшетауское 66; 87 — Золотистое кормовое; 88 — Барнаульское кормовое

Рисунок 6. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с праймерами M5R11

Таким образом, из проведенных анализов полиморфизма вакси аллелей среди изученных FPSLVVC3/Rstop3; FPSLVVC3/ex7Srext; int7Sf/Rstop3; int5Sf/R11; M5/R11; M12/R12; int5Lf/R3 молекулярных маркеров эффективными оказались маркеры int5Sf/R11 и int7Sf/Rstop3. Данные маркеры показали полиморфизм у большинства образцов, хотя оба маркера не выявили четких отличий между амилозными и глютинозными генотипами. По остальным маркерам профили ПЦР продуктов у всех сортов и образцов оказались идентичными.

Работа выполнена в рамках проекта AP05131622 «Получение перспективных низкоамилозных образцов проса для селекции на основе биохимических и молекулярно-генетических методов» по подприоритету «Науки о жизни и здоровье» Бюджетной программы 055, финансируемой Государственным учреждением «Комитет науки Министерства образования и науки Республики Казахстан».

Список литературы

- 1 Перспективная ресурсосберегающая технология производства проса. — М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2010. — 52 с.
- 2 The World Sorghum and Millet Economies: Facts, Trends and Outlook [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.fao.org/docrep/W1808E/w1808e0c.htm>
- 3 Zotikov V.I. Area and Production of Proso Millet (*Panicum miliaceum* L.) in Russia / V.I. Zotikov, V.S. Sidorenko, S.V. Bobkov et al. // *Advances in Broomcorn Millet Research. Proceedings of the 1st International Symposium on Broomcorn Millet. Northwest A&F University (NWSUAF) (25–31 August 2012)*. — Yangling, Shaanxi, Peoples Republic of China. — P. 3–9.
- 4 Сидоренко В.С. Селекция новых сортов проса для кормопроизводства / В.С. Сидоренко, С.О. Гуринович // *Селекция и насаждение*. — 2015. — Вып. 108. — С. 69–76.
- 5 Цыганков И.Г. Просо в сухостепной зоне Западного Казахстана / И.Г. Цыганков, В.И. Цыганков, М.Ю. Цыганкова // *Сельскохозяйственные науки*. — 2004. — С. 91–95.
- 6 Shure M. Molecular identification and isolation of waxy locus in maize / M. Shure, S. Wessler, N. Fedoroff // *Cell*. — 1983. — Vol. 35. — P. 225–233.
- 7 Graybosh R.A. Waxy wheats: origin, proprieties and prospects // *Trends Food Sci. Technol.* — 1998. — Vol. 9. — P. 135–142.

- 8 Климушина М.В. Распределение аллелей генов *wx* в коллекции мягкой пшеницы Краснодарского НИИСХ им. П.П. Лукьяненко / М.В. Климушина, Н.И. Гладких, М.Г. Дивашук, Л.А. Беспалова, А.В. Васильев, Г.И. Карлов // Вавиловский журн. генетики и селекции. — 2012. — Т. 16, № 1. — С. 187–192.
- 9 Fukunaga K. Structural variation in the Waxy gene and differentiation in foxtail millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]: implications for multiple origins of the waxy phenotype / K. Fukunaga, M. Kawase, K. Kato. // Mol. Genet. Genomics. — 2002. — No. 268. — P. 214–222.
- 10 Graybosch R.A. Evaluation of the waxy endosperm trait in proso millet (*Panicum miliaceum*) / R.A. Graybosch, D.D. Baltensperger // Plant Breed. — 2009. — No. 128. — P. 70–73.
- 11 Трегубов Н.Н. Технология крахмала и крахмалопродуктов / Н.Н. Трегубов, Е.Я. Жарова, А.И. Жушман, Е.К. Сидорова. — М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. — 472 с.
- 12 Уварова И.И. Использование просяной муки в производстве печенья / И.И. Уварова, А.С. Прокопец // Пищевая технология. — 1994. — № 1–2. — С. 34–36.
- 13 Рыбак А.И. Новые генетические аспекты улучшения качества пшеницы / А.И. Рыбак, Н.А. Литвиненко // Вестн. аграрной науки. — 2009. — № 4. — С. 35–40.
- 14 Яшовский И.В. Селекция и семеноводство проса / И.В. Яшовский. — М.: Агропромиздат, 1987. — 256 с.
- 15 Nixon, R.M. Waxy cereals and red iodine starches / R.M. Nixon, B. Brimhall; In: J.A. Radley (ed.) Starch and its Derivatives (Fourth ed., pp. 247–281). — London: Chapman and Hall, UK, 1968.
- 16 Murray M.G. Rapid isolation of high molecular weight DNA / M.G. Murray, W.F. Thompson // Nucleic Acids Res. — 1980. — No. 8. — P. 4321–4325.
- 17 Umeda M. Diversification of the rice Waxy gene by insertion of mobile DNA elements into introns / M. Umeda, H. Ohtsubo, E. Ohtsubo // Jpn. J. Genet. — 1991. — No. 66. — P. 569–586.
- 18 Harriet V. Hunt. Molecular Basis of the Waxy Endosperm Starch Phenotype in Broomcorn Millet (*Panicum miliaceum* L.) / Harriet V. Hunt, Kay Denyer, Len C. Packman, Martin K. Jones, Christopher J. Howe // Mol. Biol. Evol. — 2010. — No. 27(7). — P. 1478–1494.

И.А. Жирнова, А.Б. Рысбекова, Э.Н. Дюсибаева, А.И. Сейтхожаев,
Г.Т. Есенбекова, А.Е. Жакенова, Н.Б. Малтай

Тары (*Panicum miliaceum* L.) коллекциясында *wx* генінің аллельдік жағдайына молекулалы-генетикалық маркерлер негізінде бағалау жүргізу

Мақалада тарының төмен амилозалы қазақстандық сұрыптарын шығару бойынша селекция процесін жеделдету мақсатында *wx* генінің полиморфизмін молекулалық маркерлер көмегімен зерттеу нәтижелері көрсетілген. *wx* генінің полиморфизмін зерттеу үшін тары коллекциясының шығу тегі әртүрлі экологиялы-географиялық аймақтардан (Ауғанстан, Бельгия, Венгрия, КХР, Канада, Үндістан, Иран, Мексика, Пәкістан, Ресей Федерациясы, Америка Құрама Штаттары, Түркия, Украина, Франция) алынған 88 үлгісі қолданылды. Отандық және шетелдік тары коллекция үлгілеріндегі *wx* генінің аллельдік жағдайына скрининг келесі молекулалық маркерлер көмегімен жүргізілді: FPSLVVC3 және Rstop3; FPSLVVC3 және ex7Srext; int7Sf және Rstop3; int5Sf және R11; M5 және R11; M12 және R12; int5Lf және R3. Алынған әрбір праймерге полимеразалық тізбектік реакция (ПТР) жүргізу жағдайы онтайландырылды. *wx* генінің полиморфизмін талдау нәтижесінде зерттеуде қолданылған праймерлердің ішінде int5Sf/R11 және int7Sf/Rstop3 маркерлері тиімді болды. Көрсетілген праймерлер көптеген үлгілерде полиморфизм байқатты, бірақ амилозды және глютинозды генотиптер арасынан айырмашылықтарды көрсетпеді. Басқа маркерлер бойынша ДНҚ профильдерінің ПТР өнімі мономорфты болды.

Кілт сөздер: тары, коллекция, амилозалы, глютинозды, *wx* гені, ДНҚ, маркер, ПТР, полиморфизм.

I.A. Zhirnova, A.B. Rysbekova, E.N. Dyusibaeva, A.I. Seitkhodzhaev, G.T. Esenbekova,
A.E. Zhakenova, N.B. Maltay

Evaluation of allelic state of *wx* genes of proso millet collection (*Panicum miliaceum* L.) on the basis of molecular-genetic markers

In this paper are presented the results of analysis on the study of the polymorphism of proso millet waxy gene using molecular markers to accelerate the breeding process for the creation of low-amylose kazakhstan varieties. For studying the polymorphism waxy gene in proso millet collection was used in 88 samples of different geographical origin (Afghanistan, Belgium, Hungary, China, Canada, India, Iran, Mexico, Pakistan, Russian Federation, United States of America, Turkey, Ukraine, France). Screening of the local and foreign collection of proso millet on the allelic state of the waxy gene was carried out using the following molecular markers: FPSLVVC3 and Rstop3; FPSLVVC3 and ex7Srext; int7Sf and Rstop3; int5Sf and R11; M5 and R11; M12 and

R12; int5Lf and R3. For each primer the optimal conditions for polymerase chain reaction (PCR) were selected. From the analysis of the polymorphism of the waxy alleles among the studied markers, the int5Sf / R11 and int7Sf / Rstop3 were proved to be effective. These markers showed polymorphism in most samples, although both markers did not reveal clear differences between amylose and glutinous genotypes. By other DNA markers the profiles of PCR products in all genotypes were showed monomorphism.

Keywords: proso millet, collection, amylose, glutinous, waxy gene, DNA, marker, PCR, polymorphism.

References

- 1 Perspektivnaia resursosberehaiushchaia tekhnolohiia proizvodstva prosa [Perspective resource-saving production technology of millet]. (2010). Moscow: FGNU «Rosinformahrotekh» [in Russian].
- 2 The World Sorghum and Millet Economies: Facts, Trends and Outlook. *fao.org* Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/W1808E/w1808e0c.htm>
- 3 Zotikov, V.I., Sidorenko, V.S., & Bobkov, S.V. et al. (2012). Area and Production of Proso Millet (*Panicum miliaceum* L.) in Russia. Advances in Broomcorn Millet Research. *Proceedings of the 1st International Symposium on Broomcorn Millet*. Northwest A&F University (NWSUAF). Yangling, Shaanxi, Peoples Republic of China, 3–9.
- 4 Sidorenko, V.S., & Gurinovich, S.O. (2015). Seleksiia novykh sortov prosa dlia kormoproizvodstva [Selection of new varieties of millet for fodder production]. *Seleksiia i nasinnitstvo — Selection and seed production*, 108, 69–76 [in Russian].
- 5 Tsygankov, I.G., Tsygankov, V.I., & Tsygankova, M.Yu. (2004). Proso v sukhostepnoi zone Zapadnoho Kazakhstana [Millet in the dry steppe zone of Western Kazakhstan]. *Selskokhoziaistvennye nauki — Agricultural sciences*, 91–95 [in Russian].
- 6 Shure, M., Wessler, S., & Fedoroff, N. (1983). Molecular identification and isolation of waxy locus in maize. *Cell*, 35, 225–233.
- 7 Graybosh, R.A. (1998). Waxy wheats: origin, proprieties and prospects. *Trends Food Sci. Technol.*, 9, 135–142.
- 8 Klimushina, M.V., Gladkikh, N.I., Divashuk, M.H., Bespalova, L.A., Vasilev, A.V., & Karlov, H.I. (2012). Raspredelenie allelei henov wx v kollektzii miahkoi pshenitsy Krasnodarskoho NIISKh im. P.P. Lukianenko [Distribution of alleles of wx genes in the collection of soft wheat of Krasnodar SRIAS name of P.P. Lukyanenko]. *Vavilovskii zhurnal hetetiki i selektsii — Vavilovsky Journal of Genetics and Selection*, 16, 1, 187–192 [in Russian].
- 9 Fukunaga, K., Kawase, M., & Kato, K. (2002). Structural variation in the Waxy gene and differentiation in foxtail millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]: implications for multiple origins of the waxy phenotype. *Mol. Genet. Genomics*, 268, 214–222.
- 10 Graybosch, R.A., & Baltensperger, D.D. (2009). Evaluation of the waxy end ospermtrait in proso millet (*Panicum miliaceum*). *Plant Breed*, 128, 70–73.
- 11 Tregubov, N.N., Zharova, E.Ya., Zhushman, A.I., & Sidorova, E.K. (1970). *Tekhnolohiia krakhmala i krakhmaloproduktov [Technology of starch and starch products]*. Moscow: Lehkaia i pishchevaia promyshlennost [in Russian].
- 12 Uvarova, I.I., & Prokopets, A.S. (1994). Ispolzovanie prosyanoi muki v proizvodstve pechenia [The use of millet flour in the production of cookies]. *Pishchevaia tekhnolohiia — Food technology*, 1–2, 34–36 [in Russian].
- 13 Rybak, A.I. & Litvinenko, N.A. (2009). Novye heteticheskie aspekty uluchsheniia kachestva pshenitsy [New genetic aspects of wheat quality improvement]. *Vestnik ahrarnoi nauki — Bulletin of agrarian science*, 4, 35–40 [in Russian].
- 14 Yashovskii, I.V. (1987). *Seleksiia i semenovodstvo prosa [Selection and seed production of millet]*. Moscow: Ahropromizdat [in Russian].
- 15 Hixon, R.M., & Brimhall, R. (1968). Waxy cereals and red iodine starches. J.A. Radley (ed.) *Starch and its Derivatives*. London: Chapman and Hall, UK, 247–281.
- 16 Murray, M.G., & Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 4321–4325.
- 17 Umeda, M., Ohtsubo, H., & Ohtsubo, E. (1991). Diversification of the rice Waxy gene by insertion of mobile DNA elements into introns. *Jpn. J. Genet.* 66, 569–586.
- 18 Harriet, V. Hunt, Kay Denyer, Len C. Packman, Martin K. Jones, & Christopher J. Howe. (2010). Molecular Basis of the Waxy Endosperm Starch Phenotype in Broomcorn Millet (*Panicum miliaceum* L.). *Mol. Biol. Evol.*, 27, 1478–1494.