

Полиморфизм генов *Sdr*, регулирующих покой семян у *Triticum persicum* Vav. и *Triticum aethiopicum* Jakubz.

М.С. Баженов^{1, 2}✉, Е.Д. Гусева¹, В.С. Рубец¹

¹ Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

² Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

✉ e-mail: mikhabazhenov@gmail.com

Предуборочное прорастание зерна пшеницы, периодически наблюдаемое во многих регионах возделывания этой культуры, приводит к ухудшению его продовольственных и посевных качеств. Покой семян считается основным компонентом устойчивости к предуборочному прорастанию. Это физиологическое состояние регулируется множеством генов и сильно зависит от условий окружающей среды. Один из регуляторов покоя семян злаков – ген *Sdr4* (*Seed dormancy 4*), впервые изученный у риса. У мягкой пшеницы гомологи этого гена, *TaSdr-A1* и *TaSdr-B1*, также участвуют в регуляции покоя семян. Поиск ценных аллелей генов у местных сортов и эндемичных форм считается перспективным направлением исследований, нацеленных на повышение устойчивости сельскохозяйственных культур к неблагоприятным факторам окружающей среды. В настоящем исследовании гены *Sdr* были секвенированы у нескольких образцов двух тетраплоидных видов пшеницы, имеющих ограниченные ареалы возделывания, – пшеницы карталинской (*Triticum persicum* Vav.) и пшеницы эфиопской (*Triticum aethiopicum* Jakubz.). В результате у этих видов были найдены те же варианты аллелей генов *Sdr-A1* и *Sdr-B1*, которые ранее были обнаружены у пшеницы мягкой. При этом у пшеницы карталинской встречается только аллель *Sdr-A1a*, а у пшеницы эфиопской – аллель *Sdr-A1b*. При анализе гибридов F₂, полученных от скрещивания данных тетраплоидных видов, аллель *Sdr-A1b* был связан с меньшим индексом прорастания зерна, чем аллель *Sdr-A1a*, что не согласуется с результатами предшествующих ассоциативных исследований. В промоторе гена *Sdr-B1* у изучаемых образцов были обнаружены ранее неизвестные полиморфизмы. В 3'-конце гена *TraesCS2B02G215200*, расположенного на комплементарной цепи ДНК близко к 3'-концу гена *Sdr-B1*, обнаружена делеция 16 нуклеотидов. Обсуждается возможное влияние найденных полиморфизмов на экспрессию генов *Sdr*.

Ключевые слова: предуборочное прорастание; тетраплоидные пшеницы; маркеры; межвидовая гибридизация; секвенирование.

Для цитирования: Баженов М.С., Гусева Е.Д., Рубец В.С. Полиморфизм генов *Sdr*, регулирующих покой семян у *Triticum persicum* Vav. и *Triticum aethiopicum* Jakubz. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(8):964-971. DOI 10.18699/VJ19.573

Polymorphism of *Sdr* genes regulating seed dormancy in *Triticum persicum* Vav. and *Triticum aethiopicum* Jakubz.

M.S. Bazhenov^{1, 2}✉, E.D. Guseva¹, V.S. Rubets¹

¹ Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

² All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

✉ e-mail: mikhabazhenov@gmail.com

Preharvest sprouting of wheat grain, sporadically observed in many regions of cultivation of this crop, leads to deterioration of its food and sowing qualities. Seed dormancy is considered to be the main component of resistance to preharvest sprouting. This physiological state of seeds is regulated by many genes, and it depends heavily on environmental conditions. One of the regulators of seed dormancy in cereals is the *Sdr4* gene (*Seed dormancy 4*), which was first studied in rice. In common wheat, the homologues of this gene (*TaSdr-A1* and *TaSdr-B1*) are also involved in the regulation of seed dormancy. The search for valuable alleles in local varieties and endemic forms is a promising area of research aimed at increasing the resistance of crops to adverse environmental factors. In this study, *Sdr* genes were sequenced in several accessions of two tetraploid wheat species with limited cultivation areas: Persian wheat (*Triticum persicum* Vav.) and Ethiopian wheat (*Triticum aethiopicum* Jakubz.). As a result, the same *Sdr-A1* and *Sdr-B1* variants that had been found in common wheat were detected in these species. The Persian wheat accessions possessed only the *Sdr-A1a* allele, while Ethiopian ones, only *Sdr-A1b*. The analysis of F₂ hybrids obtained from crossing these tetraploid species showed that the *Sdr-A1b* allele was associated with a lower germination index of grain than *Sdr-A1a*. This result was inconsistent with earlier association studies. Previously unknown polymorphisms were found in the promoter of the *Sdr-B1* gene in the studied accessions. A deletion of 16 nucleotides was detected in the 3'-terminal region of the

TraesCS2B02G215200 gene, located on the complementary DNA chain close to the 3'-end of the *Sdr-B1* gene. Possible effects of the detected polymorphisms on the expression of *Sdr* genes are discussed.

Key words: preharvest sprouting; tetraploid wheats; markers; interspecific hybridization; sequencing.

For citation: Bazhenov M.S., Guseva E.D., Rubets V.S. Polymorphism of *Sdr* genes regulating seed dormancy in *Triticum persicum* Vav. and *Triticum aethiopicum* Jakubz. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(8):964-971. DOI 10.18699/VJ19.573 (in Russian)

Введение

Предуборочное прорастание пшеницы, приводящее к снижению урожайности и качества зерна, остается проблемой во многих регионах возделывания этой культуры по всему миру (Olaerts, Courtin, 2018).

Покой семян – основной компонент устойчивости к предуборочному прорастанию. Это особое физиологическое состояние семян, наблюдаемое после их созревания и связанное с задержкой или полным отсутствием прорастания даже в условиях достаточной для этого влажности. Покой семян контролируется множеством генов и сильно зависит от условий окружающей среды. В настоящее время локусы количественных признаков (QTL), связанные с устойчивостью к предуборочному прорастанию, были картированы практически на всех хромосомах пшеницы. Наиболее значимые локусы располагаются на хромосомах 2В, 3А и 4А. В некоторых из этих QTL были выявлены гены-кандидаты, в том числе *TaMKK3*, *TaPHS1* (*TaMFT*), *TaVp1*, *Tamyb10*, *TaSdr* (Nakamura, 2018; Vetch et al., 2018).

Sdr4 (*Seed dormancy 4*) впервые был идентифицирован как ген-кандидат в одном из основных QTL устойчивости к предуборочному прорастанию у риса. Было выявлено, что его экспрессия снижается у мутантных форм по гену *OsVp1*. Показано, что *Sdr4* положительно регулирует гены, связанные с покоем семян (*OsDOG1-like*), и отрицательно – гены, активирующиеся при прорастании (*OsGA20ox-1*, *OsEXPB3*). Белок, кодируемый геном *Sdr4*, не имеет сходства с другими белками известной функции, но обладает сигналом ядерной локализации (Sugimoto et al., 2010). Биоинформатический анализ показал возможное наличие в его структуре суперспирали и доменов цинковых пальцев (Zhang et al., 2017). Предположительно, белок SDR4 играет роль специфического регулятора покоя семян, действующего как транскрипционный фактор под управлением более общего регулятора созревания семян – белка VP1 (Sugimoto et al., 2010).

У мягкой пшеницы были клонированы гомологи *OsSdr4* – гены *TaSdr-A1* и *TaSdr-B1*, локализованные на хромосомах 2А и 2В соответственно. В последовательностях этих генов обнаружены точечные мутации. Их связь с индексом прорастания продемонстрирована на обширной коллекции китайских сортов пшеницы и рекомбинантных инбредных линиях Yangxiaomai × Zhongyou 9507. Было также показано, что аллели генов *TaSdr*, придающие более высокую устойчивость к предуборочному прорастанию, часто встречаются у китайских и японских сортов и почти не обнаруживаются у российских сортов пшеницы (Zhang et al., 2014, 2017).

Одно из направлений поиска ценных аллелей генов, связанных с устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды, – изучение диких форм, а также местных сортов культуры. С целью расширения исполь-

зуемого в селекции аллельного разнообразия генов *Sdr*, что особенно актуально для России, мы решили изучить эти гены у двух локально возделываемых тетраплоидных видов – пшеницы карталинской (*Triticum persicum* Vav.) и пшеницы эфиопской (*Triticum aethiopicum* Jakubz.)¹. Пшеница карталинская – вид, выращиваемый на Кавказе, включая территории России (Дагестан), Грузии, Армении и северо-восточной Турции. Для него характерна низкая требовательность к теплу, устойчивость к грибным болезням и длительный период послеуборочного дозревания зерна. Однако этот вид пшеницы имеет низкую засухоустойчивость (Дорофеев и др., 1979). Пшеница эфиопская – голозерная тетраплоидная пшеница, встречающаяся в пределах горной Эфиопии и южной части Аравийского полуострова. Эфиопские тетраплоидные пшеницы обладают исключительным разнообразием форм. В то же время им присущи общие признаки, позволяющие выделить их в ранг отдельного вида (Дорофеев и др., 1979). Ввиду горного рельефа местности регионов происхождения пшеницы карталинской и пшеницы эфиопской климатические условия, в которых происходило их формирование, весьма разнообразны. Некоторые районы выращивания этих видов имеют влажный климат, осадки выпадают в том числе в период созревания зерна. Можно предположить, что отдельные формы пшеницы карталинской и пшеницы эфиопской могут нести в себе ценные аллели генов, положительно влияющие на устойчивость к предуборочному прорастанию зерна в колосе.

Материалы и методы

Материал пшеницы эфиопской, собранный в ходе совместной российско-эфиопской биологической экспедиции в 2012 г., был передан нам из Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (Бадаева и др., 2018). Образцы пшеницы карталинской предоставлены Всероссийским институтом растениеводства им. Н.И. Вавилова. Информация о стране происхождения всех образцов приведена в табл. 1. Выращивание проводилось в поле на делянках площадью 1 м² в течение 2016–2017 гг. Ежегодно осуществлялась оценка образцов по устойчивости к предуборочному прорастанию путем проращивания зерна, собранного в фазу полной спелости и определения индекса прорастания.

Для определения индекса прорастания выделенные из колоса вручную зерновки помещали в чашки Петри на два слоя фильтровальной бумаги, смоченной 8 мл дистиллированной воды. Проращивание осуществляли в термостате при постоянной температуре 24 °С, в темноте. Подсчет и удаление проросших зерен проводили ежедневно. Фильтровальную бумагу увлажняли по мере

¹ В статье используется система рода *Triticum* по В.Ф. Дорофееву (Дорофеев и др., 1979).

Таблица 1. Страна происхождения и ботанические разновидности образцов пшеницы карталинской и пшеницы эфиопской, использованных в исследовании

Номер образца ¹	Номер в каталоге ВИР	Номер образца, код точки сбора ²	Происхождение	Ботаническая разновидность ⁴
<i>T. persicum</i>				
1	к-13382	–	Грузия	<i>rubiginosum</i>
2	к-13989	–	Армения	<i>rubiginosum</i>
3	к-13768	–	»	<i>persicum</i>
4	к-1694	–	Грузия	<i>persicum</i>
5	к-26828	–	Россия ³	<i>persicum</i>
6	к-13938	–	»	<i>osseticum</i>
7	к-7106	–	Грузия	<i>persicum</i>
8	к-6429	–	»	<i>stramineum</i>
9	к-47794	–	Россия ³	<i>rubiginosum, stramineum</i>
10	к-49456	–	Канада ³	<i>stramineum</i>
<i>T. aethiopicum</i>				
11	–	7480, 28a	Эфиопия	<i>albviolaceum</i>
12	–	7610, 47a	»	<i>nigriviolaceum, pseudoschimperi</i>
13	–	7655, 506	»	<i>harraricum</i>
14	–	7634, 49a	»	<i>purpureum</i>
15	–	7567, 406	»	<i>rufescens</i>
16	–	7719, 586	»	<i>brownii</i>
17	–	7417, 21a	»	<i>nigrimarginatum</i>
18	–	7589, 426	»	<i>pseudorubescens</i>

¹ Номер образца в данном исследовании; ² в совместной российско-эфиопской биологической экспедиции в 2012 г.; ³ селекционный или исследовательский материал; ⁴ по (Дорофеев и др., 1979).

высыхания. Проращивание длилось семь дней. Зерновки, которые не проросли за этот срок, помещали в холодильник на три дня при температуре 4 °С для снятия покоя, после чего жизнеспособные семена подсчитывали. Опыт проводили в шестикратной повторности. В одну чашку Петри помещали зерно с одного колоса. Индекс прорастания подсчитывали по формуле:

$$GI = (7 \times n_1 + 6 \times n_2 + 5 \times n_3 + \dots + 1 \times n_7) / (7 \times N),$$

где $n_1, n_2 \dots n_7$ – числа проросших зерен в первый, второй и последующие дни до седьмого дня; N – общее число жизнеспособных зерен, заложенных для проращивания. Индекс прорастания варьировал в пределах от 0 до 1, при этом чем глубже покой семян, тем ниже значение этого индекса (Walker-Simmons, 1988).

В 2016 г. были проведены межвидовые скрещивания некоторых образцов пшеницы карталинской и пшеницы эфиопской, в том числе скрещивания *T. aethiopicum* № 15 × *T. persicum* № 5 и *T. aethiopicum* № 15 × *T. persicum* № 8. В 2017 г. в поле были высеяны гибриды F_1 , а зимой 2017–2018 гг. в теплице выращены гибриды F_2 . Для оценки индекса прорастания половину зерен, собранных с одного растения F_2 , проращивали в одной чашке Петри (однократная повторность).

Выделение ДНК проводили из высушенных листьев растений по методу P.J. Doyle (1991). Праймеры для амплификации генов *Sdr-A1* (SDR-AF, SDR-AR) и *Sdr-B1* (SDR-BF, SDR-BR), включая часть их промоторов, были

подобраны специфично для субгеномов А и В пшеницы на основе последовательностей генома пшеницы IWGSC RefSeq v1.0 (Alaux et al., 2018) с применением Primer BLAST (NCBI).

Последовательности всех праймеров, использованных в исследовании, приведены в табл. 2. ПЦР осуществляли на приборе SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems). Концентрация компонентов реакционной смеси составляла: 1 × буфер, поставляемый с полимеразой (включая 2.5 ммоль/л $MgCl_2$), 0.2 ммоль/л каждого dNTP, 10 % по объему диметилсульфоксида, по 1 мкмоль/л прямого и обратного праймеров, 0.05 ед./мкл *Taq*-полимеразы (ООО «Силекс»), 0.01 ед./мкл *Pfu*-полимеразы (ООО «Силекс») и 4 нг/мкл матричной ДНК. Добавление диметилсульфоксида в реакционную смесь связано с высоким содержанием гуанина и цитозина в амплифицируемых участках ДНК. Температурные условия ПЦР были следующими: 94 °С – 5 мин; 45 циклов 94 °С – 30 с, 57 °С – 45 с и 72 °С – 2 мин; конечная элонгация 72 °С – 5 мин. Перед секвенированием продукты ПЦР очищали с помощью набора Cleanup Mini («Евроген»).

Секвенирование осуществляли с помощью набора реактивов BrilliantDye Terminator v3.1 (Nimagen), амплификатора SimpliAmp (Applied Biosystems) и прибора 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Для проведения реакции применяли концевые праймеры, а также дополнительные праймеры SDR-2AF, SDR-2AR (для гена *Sdr-A1*) и SDR-3BF, SDR-3BR (для гена *Sdr-B1*) (Zhang

Таблица 2. ДНК-праймеры, использованные в исследовании

Название праймера	Последовательность 5'-3'	Назначение
SDR-AF	ACAACAGGATGATACAGGGGAC	Аmplификация целого гена, секвенирование
SDR-AR	AGGGAGTATAATATAATTTTGCCATCT	
SDR-BF	ACCCCTACGCATTTATACAGACT	
SDR-BR	CTGTCGTGCAATATGAGCTAGAA	
SDR-2AF*	CGTCGGCAGACATCGACTCC	Секвенирование
SDR-2AR*	GAAGCTCACTAGCTCAGAACACGC	
SDR-3BF*	CGTCAGCAGACTTCGACTCGC	
SDR-3BR*	CAAGAAGCTCACTATCTCAGAACACAA	
SDR-SNP-AF	ACCATCCACGTGCAATCCATC	Аmplификация фрагментов гена для маркеров
SDR-SNP-AR	CTTGGTTTCGCACGCAGCTC	
SDR-5BF*	CGCCTACGTGTCGGCCC	
SDR-SNP-BR	CACGGCCTGTTCTGCAGGTG	
SDR-B1-InDel-F	ATGTACAAAAGCCTAGCCACAGA	

* Праймеры из (Zhang et al., 2014). Прочие праймеры – оригинальные.

et al., 2014). Для выравнивания нуклеотидных последовательностей использовали программу GeneDoc v.2.7. Анализ нуклеотидной последовательности промотора гена выполняли с помощью онлайн-сервиса PlantCARE (Lescot et al., 2002).

Праймеры для создания новых маркеров подбирали с помощью Primer BLAST (NCBI). ПЦР проводили в объеме 25 мкл. Конечная концентрация компонентов смеси аналогична вышеприведенной, но без добавления *Pfu*-полимеразы. Для выявления однонуклеотидного полиморфизма в гене *Sdr-B1* в позиции (-11) использовали праймеры SDR-5BF и SDR-SNP-BR. Температурные условия ПЦР были следующими: 95 °C – 1 мин; 40 циклов 95 °C – 45 с, 65 °C – 45 с, 72 °C – 45 с; конечная элонгация 72 °C – 2 мин. Продукты ПЦР без предварительной очистки разрезали с помощью эндонуклеазы рестрикции *PspCI* («СибЭнзим»). В состав реакционной смеси входили буферный раствор, поставляемый с эндонуклеазой (буфер В, «СибЭнзим»), и бычий сывороточный альбумин (BSA) в рекомендуемых производителем концентрациях, а также 1 ед./мкл фермента. Объем реакционной смеси – 10 мкл. Реакция протекала при 37 °C в течение 2 ч.

Для идентификации делеции, расположенной рядом с геном *Sdr-B1* на расстоянии 449–464 пар оснований (п. о.) после стоп-кодона, использовали праймеры SDR-B1-InDel-F и SDR-BR. Температурные условия ПЦР были следующими: 95 °C – 2 мин; 35 циклов 95 °C – 30 с, 58 °C – 30 с, 72 °C – 30 с; конечная элонгация 72 °C – 2 мин.

Для обнаружения однонуклеотидного полиморфизма в гене *Sdr-A1* в позиции 643 применяли праймеры SDR-SNP-AF и SDR-SNP-AR. Температурные условия ПЦР: 95 °C – 1 мин; 10 циклов 95 °C – 45 с, 66 °C с последующим уменьшением температуры на 0.4 °C за цикл – 45 с, 72 °C – 45 с; 35 циклов 95 °C – 45 с, 62 °C – 45 с, 72 °C – 45 с; конечная элонгация 72 °C – 2 мин. Продукты ПЦР без предварительной очистки разрезали с помощью эндонуклеазы рестрикции *Ple19I* («СибЭнзим»). В состав реакционной смеси входили буферный раствор, поставляемый с эндонуклеазой (буфер Y, «СибЭнзим»), разбавленный

до рекомендуемой концентрации, а также 0.1 ед./мкл фермента. Объем реакционной смеси – 10 мкл. Реакцию проводили при 37 °C в течение 2 ч.

Электрофорез продуктов ПЦР и рестрикции осуществляли в 1.5 % агарозном геле с буфером TBE с добавлением бромистого этидия. Визуализацию результатов проводили с помощью системы гель-документирования GelDoc XR + Bio-Rad.

Статистический анализ данных выполняли с помощью пакета программ Statistica 6.0. Перед дисперсионным анализом значения индекса прорастания преобразовывали по формуле: $\arcsin(\sqrt{x})$. В табл. 1–3 и на рис. 1–4 даны обратно преобразованные средние значения. Для теста Манна–Уитни использовали исходные значения индекса прорастания.

Результаты

Испытуемые образцы пшеницы статистически значимо отличались друг от друга по индексу прорастания как в 2016, так и в 2017 г. (табл. 3). В среднем по годам наиболее низкий индекс прорастания имели образцы пшеницы карталинской № 2, 4, 8, 10 и образец пшеницы эфиопской № 15. Высоким индексом прорастания отличались образцы пшеницы эфиопской № 13, 16 и 18. В среднем пшеница карталинская показала меньший индекс прорастания, чем пшеница эфиопская ($p < 0.05$).

Образцы пшеницы эфиопской № 15 и 16, а также образцы пшеницы карталинской № 5 и 8 были выбраны для секвенирования генов *Sdr-A1* и *Sdr-B1* как наиболее контрастные по индексу прорастания. Полученные последовательности были депонированы в базу данных GenBank под номерами MK396766, MK396767, MK396768, MK396769.

Секвенирование гена *Sdr-A1* у перечисленных выше образцов показало, что они различаются между собой по тому же однонуклеотидному полиморфизму, который ранее был обнаружен у мягкой пшеницы (Zhang et al., 2017). У образцов пшеницы эфиопской № 15 и 16 в позиции 643 от старт-кодона в данном гене был найден нуклеотид А,

Таблица 3. Аллели генов *Sdr-A1*, *Sdr-B1* и индекс прорастания образцов пшеницы карталинской и пшеницы эфиопской

№ образца	Аллели генов		Маркер делеции, п. о.*	Индекс прорастания**		
	<i>Sdr-A1</i>	<i>Sdr-B1</i>		2016 г.	2017 г.	Средний
<i>T. persicum</i>						
1	<i>a</i>	<i>a</i>	230	0.45 ^{cd}	0.19 ^{bc}	0.31 ^{abc}
2	<i>a</i>	<i>a</i>	230	0.17 ^{ab}	0.12 ^{abc}	0.14 ^a
3	<i>a</i>	<i>b</i>	214	0.62 ^d	0.35 ^{cd}	0.48 ^{abcde}
4	<i>a</i>	<i>b</i>	214	0.18 ^{ab}	0.08 ^{ab}	0.13 ^a
5	<i>a</i>	<i>b</i>	214	0.63 ^{de}	0.57 ^{def}	0.60 ^{abcde}
6	<i>a</i>	<i>b</i>	214	0.38 ^c	0.36 ^{cd}	0.37 ^{abcd}
7	<i>a</i>	<i>b</i>	214	0.27 ^{abc}	0.21 ^{bc}	0.24 ^{ab}
8	<i>a</i>	<i>b</i>	214	0.13 ^a	0.10 ^{ab}	0.11 ^a
9	<i>a</i>	<i>a</i>	230	0.80 ^{ef}	0.19 ^{bc}	0.49 ^{abcde}
10	<i>a</i>	<i>b</i>	214	0.31 ^{bc}	0.03 ^a	0.14 ^a
<i>T. aethiopicum</i>						
11	<i>b</i>	<i>a</i>	230	0.60 ^d	0.68 ^{efg}	0.64 ^{abcde}
12	<i>b</i>	<i>a</i>	230	0.85 ^f	0.75 ^{efg}	0.80 ^{bcde}
13	<i>b</i>	<i>b</i>	230	1.00 ^g	0.83 ^{fgh}	0.96 ^e
14	<i>b</i>	<i>b</i>	230	0.44 ^{cd}	0.35 ^{cd}	0.39 ^{abcde}
15	<i>b</i>	<i>b</i>	214	0.16 ^{ab}	0.15 ^{abc}	0.15 ^a
16	<i>b</i>	<i>b</i>	230	0.90 ^f	0.97 ^h	0.94 ^{de}
17	<i>b</i>	<i>b</i>	230	0.45 ^{cd}	0.55 ^{de}	0.50 ^{abcde}
18	<i>b</i>	<i>b</i>	214	0.89 ^f	0.85 ^{gh}	0.87 ^{cde}
<i>p</i> – значение различий между образцами (F-тест)				< 0.001	< 0.001	< 0.001

* Маркер делеции, расположенной рядом с геном *Sdr-B1*; дан размер ПЦП-продукта (п. о.); ** значения индекса прорастания, отмеченные в каждом столбце одинаковыми буквами, не различаются значимо между собой по критерию Тьюки.

свойственный аллелю *Sdr-A1b*, а у образцов пшеницы карталинской № 5 и 8 – нуклеотид G, характерный для аллеля *Sdr-A1a*. В остальной последовательности гена *Sdr-A1* двух исследуемых видов пшеницы не различались и совпадали с референсной последовательностью генома мягкой пшеницы сорта Chinese Spring.

У прочих образцов пшеницы карталинской и пшеницы эфиопской аллели гена *Sdr-A1* были определены с помощью молекулярного маркера, разработанного ранее Y. Zhang с коллегами (2017), основанного на ПЦП и рестрикции. Обнаружено, что у всех исследованных образцов пшеницы карталинской встречается только аллель *Sdr-A1a*, а у всех образцов пшеницы эфиопской – только аллель *Sdr-A1b*.

Влияние аллелей гена *Sdr-A1* на покой семян было изучено в F₂ в двух гибридных комбинациях, полученных от межвидовых скрещиваний образцов пшеницы карталинской и пшеницы эфиопской. Молекулярный маркер, разработанный ранее Y. Zhang с коллегами (2017), предполагает амплификацию фрагмента ДНК размером 1294 п. о. Так как амплификация таких крупных фрагментов ДНК, особенно содержащих GC-богатые участки, с использованием *Taq*-полимеразы часто вызывает затруднения, нами повторно были подобраны праймеры для маркирования этого однонуклеотидного полиморфизма таким образом, чтобы минимизировать размер ПЦП-продукта. В результате были найдены специфичные для субгенома A прай-

меры SDR-SNP-AF и SDR-SNP-AR (см. табл. 2), дающие продукт ПЦП размером 499 п. о. Рестрикция ПЦП-продукта осуществлялась с помощью фермента *Ple19I*. При присутствии аллеля *Sdr-A1a* разрезание не происходит, а при наличии аллеля *Sdr-A1b* образуются фрагменты размером 387 и 112 п. о. (рис. 1, а). Испытание нового маркера на изучаемых образцах пшеницы карталинской и пшеницы эфиопской показало полное совпадение результатов анализа с данными, полученными на основе ранее разработанного маркера. Новые праймеры позволили значительно повысить надежность амплификации. С помощью нового маркера в гибридной комбинации *T. aethiopicum* № 15 × *T. persicum* № 5 было проанализировано 66 растений F₂. Из них 15 оказались гомозиготами по аллелю *Sdr-A1a*, 11 были гомозиготами по аллелю *Sdr-A1b*, а остальные 40 – гетерозиготами. Расщепление в F₂ соответствовало теоретически ожидаемому 1:2:1 ($\chi^2 = 4.125$; $p = 0.178$). В связи с тем, что в F₂ статистическое распределение индекса прорастания было далеко от нормального, мы использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни для оценки связи индекса с генотипами растений. При этом в расчетах использовали только гомозиготные формы. По результатам статистического теста ген *Sdr-A1* не оказал значимого влияния на индекс прорастания в F₂ *T. aethiopicum* № 15 × *T. persicum* № 5 ($p = 0.09$), но была тенденция к более низкому индексу у растений с аллелем *Sdr-A1b*.

В гибридной комбинации *T. aethiopicum* № 15 × *T. persicum* № 8 было проанализировано 83 растения F₂. Из них у 25 выявлен аллель *Sdr-A1a*, у 15 – аллель *Sdr-A1b*, а 43 были гетерозиготами. Расщепление в целом соответствовало менделевскому 1:2:1 ($\chi^2 = 2.98$; $p = 0.284$), однако, как и в описанной выше комбинации, доля гомозигот по аллелю *Sdr-A1b* была несколько ниже ожидаемой. В этой гибридной комбинации связь индекса прорастания с маркером гена *Sdr-A1* оказалась существенной ($p = 0.035$ по U-критерию Манна–Уитни). При этом растения с аллелем *Sdr-A1b* имели меньший индекс прорастания зерна, чем растения с аллелем *Sdr-A1a*. Объединение данных, полученных в двух популяциях F₂, в одну выборку подтвердило ту же тенденцию ($p = 0.012$ по U-критерию Манна–Уитни) (рис. 2).

Секвенирование гена *Sdr-B1* у образцов № 5 и 8 пшеницы карталинской и образцов № 15 и 16 пшеницы эфиопской показало, что эти образцы не отличаются друг от друга в кодирующей части данного гена. В промоторе гена у образца № 16 имеются две однонуклеотидные замены, в то время как у образцов № 5, 8 и 15 присутствует динуклеотидная инсерция СТ относительно референсной последовательности Chinese Spring (рис. 3, а). В то же время 5'-некодирующая область гена у всех четырех образцов пшеницы несет известный ранее вариант однонуклеотидного полиморфизма в позиции (–11) от старт-кодона, характерный для аллеля *Sdr-B1b* (Zhang et al., 2014).

Маркер для идентификации аллелей гена *Sdr-B1* был также оптимизирован нами путем подбора праймеров для получения более короткого продукта ПЦР (см. рис. 1, б). Аллели *Sdr-B1*, идентифицированные по однонуклеотидному полиморфизму в позиции (–11), не показали статистически значимой связи с индексом прорастания в изучаемой коллекции образцов двух видов пшеницы ($p = 0.9$ по критерию Фишера).

Рядом с 3'-концом гена *Sdr-B1* секвенированная нами последовательность частично захватывает 3'-нетранслируемую область лежащего близко на комплементарной цепи ДНК гена *TraesCS2B02G215200*, предположительно кодирующего субъединицу 18 кДа НАДН-убихинон-оксидоредуктазы. В 3'-нетранслируемой области гена *TraesCS2B02G215200* у образцов № 5, 8 и 15 присутствует 16-нуклеотидная делеция, которая отсутствует у образца № 16 и в референсной последовательности мягкой пшеницы Chinese Spring (см. рис. 3, б).

Ввиду того, что эта 16-нуклеотидная делеция может оказаться более простым в применении сцепленным маркером аллелей гена *Sdr-B1*, для ее идентификации нами были подобраны фланкирующие праймеры (SDR-B1-InDel-F и SDR-BR). Электрофорез продуктов ПЦР с указанными праймерами позволяет идентифицировать два варианта фрагментов размером 230 и 214 п. о. Присутствует также дополнительный фрагмент большего размера (примерно 266 п. о.), вероятно, получаемый с хромосомы 2A (рис. 4). В результате испытания маркера на образцах коллекции обнаружено, что у пшеницы карталинской наличие фрагмента размером 230 п. о. совпадает с присутствием аллеля *Sdr-B1a*, который в предыдущих исследованиях был связан с низким индексом прорастания. Среди образцов эфиопской пшеницы такая закономерность нарушается. В целом по двум видам пшеницы образцы с коротким маркерным фрагментом (214 п. о.) имели в среднем низкий (0.35), а с длинным фрагментом (230 п. о.) – более высокий индекс прорастания (0.57). Тем не менее статистически значимой связи между наличием этой делеции и индексом прорастания в испытываемой коллекции не было обнаружено ($p = 0.1$ по критерию Фишера для средних за два года испытания).

Обсуждение

Ранее исследователи отмечали, что пшеница карталинская обладает хорошей устойчивостью к предуборочному прорастанию (Дорофеев и др., 1979). Это подтвердили и наши результаты. В течение двух лет в среднем она показывала меньший индекс прорастания, чем пшеница эфиопская.

В предыдущих исследованиях аллели *Sdr-A1a* и *Sdr-B1a* были ассоциированы с устойчивостью, в то время как аллели *Sdr-A1b* и *Sdr-B1b* – с неустойчивостью к предуборочному прорастанию (Zhang, 2014, 2017). У всех образ-

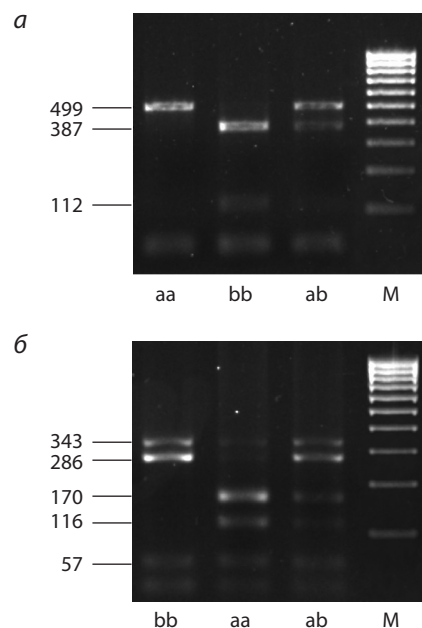


Рис. 1. Новые маркеры однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в генах *Sdr* пшеницы.

а – маркер SNP A643G гена *Sdr-A1*. Пример электрофореза продуктов ПЦР, полученных с использованием праймеров SDR-SNP-AF/SDR-SNP-AR и разрезанных эндонуклеазой *Ple19I*: aa – гомозигота по аллелю *Sdr-A1a*, bb – гомозигота по аллелю *Sdr-A1b*, ab – гетерозигота. Указаны размеры продуктов (п.о.); б – маркер SNP A(-11)G в 5'-нетранслируемой области гена *Sdr-B1*. Пример электрофореза продуктов ПЦР, полученных с использованием праймеров SDR-5BF и SDR-SNP-BR и разрезанных эндонуклеазой *PspCI*: bb – гомозигота по аллелю *Sdr-B1b*, aa – гомозигота по аллелю *Sdr-B1a*, ab – гетерозигота. Фрагмент 343 п. о. соответствует неразрезанному продукту ПЦР, который остается в результате низкой эффективности отрезания короткого фрагмента размером 57 п. о. M – маркер длин ДНК M-100 («Синтол»).

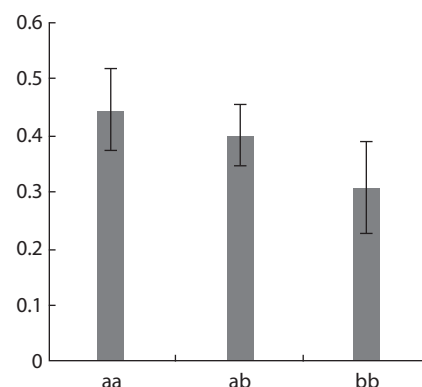


Рис. 2. Индекс прорастания зерен, собранных с растений F₂ с различным генотипом *Sdr-A1*: aa – гомозиготы по аллелю *Sdr-A1a*, bb – гомозиготы по аллелю *Sdr-A1b*, ab – гетерозиготы.

Средние рассчитаны по объединенным данным двух гибридных комбинаций № 15 × № 5 и № 15 × № 8. Показаны 95 % доверительные интервалы.

a

	-454		
T. carth_5	CTGCCAACGTCACCCACCCACGCCCATGAATGGAGCGGCAGCCAGCCAGTGACCGCG	240	
T. aeth_16	CTGCCAACGTCACCCACCCACGCCCATGAATGGAGCGGCAGCCAGCCAGTGACCGCG	240	
T. aest_CS	CTGCCAACGTCACCCACCCACGCCCATGAATGGAGCGGCAGCCAGCCAGTGACCGCG	240	
T. carth_5	GCGGGACGCGCCACGGGGGACGAGGCGACACGAAGCGAGCAGGCGGGTGCGGGCAACGC	300	
T. aeth_16	GCGGGACGCGCCACGGGGGACGAGGCGACACGAAGCGAGCAGGCGGGTGCGGGCAACGC	300	
T. aest_CS	GCGGGACGCGCCACGGGGGACGAGGCGACACGAAGCGAGCAGGCGGGTGCGGGCAACGC	300	
	-317		
T. carth_5	GATCGCGCCGCGCATGCAACGGGCCTCTCGCCCTCCCCGTGCCCGCCCGCCGTCCGGT	360	
T. aeth_16	GATCGCGCCGCGCATGCAACGGGCCTCTCGCCCTCCCCGTGCCCGCCCGCCGTCCGGT	358	
T. aest_CS	GATCGCGCCGCGCATGCAACGGGCCTCTCGCCCTCCCCGTGCCCGCCCGCCGTCCGGT	358	
T. carth_5	GCCTCCCCCACTCCGTACACGCCTGACGCCCTCTCACTGGACGCCACTGGAATCCAC	420	
T. aeth_16	GCCTCCCCCACTCCGTACACGCCTGACGCCCTCTCACTGGACGCCACTGGAATCCAC	418	
T. aest_CS	GCCTCCCCCACTCCGTACACGCCTGACGCCCTCTCACTGGACGCCACTGGAATCCAC	418	
	-226		
T. carth_5	AGTCCTCTCCCTCCAAAGCAGCGGCCCGCGACTCGCCTCCGCTACGTGTGCGCCCCG	480	
T. aeth_16	AGTCCTCTCCCTCCAAAGCAGCGGCCCGCGACTCGCCTCCGCTACGTGTGCGCCCCG	480	
T. aest_CS	AGTCCTCTCCCTCCAAAGCAGCGGCCCGCGACTCGCCTCCGCTACGTGTGCGCCCCG	478	
T. carth_5	TCCCGCCCGCTCGCCACGTACCCCGCGCTCGTTCCACGTGCCCTCCCTTGCAGCG	540	
T. aeth_16	TCCCGCCCGCTCGCCACGTACCCCGCGCTCGTTCCACGTGCCCTCCCTTGCAGCG	538	
T. aest_CS	TCCCGCCCGCTCGCCACGTACCCCGCGCTCGTTCCACGTGCCCTCCCTTGCAGCG	540	
	5' UTR		
T. carth_5	CATCCGATTGGCCGCCACGCCTTCTTAAGCCGGCAGGCACCGGGACCCAACGCCGTGC	600	
T. aeth_16	CATCCGATTGGCCGCCACGCCTTCTTAAGCCGGCAGGCACCGGGACCCAACGCCGTGC	598	
T. aest_CS	CATCCGATTGGCCGCCACGCCTTCTTAAGCCGGCAGGCACCGGGACCCAACGCCGTGC	598	
	-11 CSD (<i>Sdr-B1</i>)		
T. carth_5	ACTCCGTCCACCCCGTCAGCAGACTTCGACTCGCGCGTGCACGCAATGGCCATGGTGCA	660	
T. aeth_16	ACTCCGTCCACCCCGTCAGCAGACTTCGACTCGCGCGTGCACGCAATGGCCATGGTGCA	658	
T. aest_CS	ACTCCGTCCACCCCGTCAGCAGACTTCGACTCGCGCGTGCACGCAATGGCCATGGTGCA	658	

б

	3' UTR (<i>TraesCS2B02G215200</i>)		
T. carth_5	TAGCCAAGAAATTCGTGTGAAGGGGAATTTTACA-----AGCATTTTG	2084	
T. aeth_16	TAGCCAAGAAATTCGTGTGAAGGGGAATTTTACAAGGCTAATAACAAGCATTTTG	2098	
T. aest_CS	TAGCCAAGAAATTCGTGTGAAGGGGAATTTTACAAGGCTAATAACAAGCATTTTG	2098	

Рис. 3. Выравнивание нуклеотидных последовательностей, содержащих полиморфизмы, выявленные в окружении гена *Sdr-B1*.

a – промотор и 5'-конец гена *Sdr-B1* образцов пшеницы эфиопской № 16 и пшеницы карталинской № 5, выровненные против референсной последовательности хромосомы 2B пшеницы мягкой сорта Chinese Spring (CS). Числа над строками – расстояние от старт-кодона. UTR – нетранслируемая область; CSD – белок-кодирующая последовательность гена; **б** – выравнивание в области 16-нуклеотидной делеции в 3'-нетранслируемой области гена *TraesCS2B02G215200*, расположенного на комплементарной цепи ДНК рядом с геном *Sdr-B1* (*TraesCS2B02G215300*).

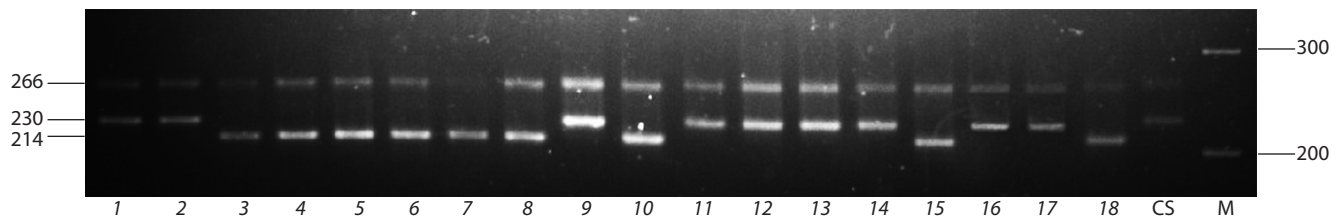


Рис. 4. Маркер делеции в некодирующей области рядом с геном *SDR-B1* у образцов *Triticum persicum* (1–10), *T. aethiopicum* (11–18) и *T. aestivum* сорта Chinese Spring (CS).

M – маркер длин ДНК М-100 («Синтол»). Размеры маркерных фрагментов – 230 и 214 п. о. Фрагмент 266 п. о. – побочный продукт с хромосомы 2A.

цов пшеницы карталинской нами был обнаружен аллель *Sdr-A1a*, а у всех образцов менее устойчивой пшеницы эфиопской – аллель *Sdr-A1b*. Исходя из этого, можно было бы предположить, что аллель *Sdr-A1a* вносит некий вклад в устойчивость к предуборочному прорастанию пшеницы карталинской.

Однако при анализе связи индекса прорастания с генотипами растений в F₂ получились результаты, противоречащие выдвинутому выше предположению, – растения с аллелем *Sdr-A1b* дали зерно с меньшим индексом прорастания, чем растения с аллелем *Sdr-A1a*. Гетерозиготные

растения показали промежуточное значение индекса прорастания между гомозиготами. Иное направление связи генотипов растений с индексом прорастания, наблюдаемое в этом случае, может быть вызвано несколькими причинами. Во-первых, возможно, что влияние аллелей гена *Sdr-A1* на покой семян значительно зависит от условий выращивания растений. Растения F₂ росли в теплице, в то время как исходные образцы пшеницы давали урожай в поле. Во-вторых, взаимодействие гена *Sdr-A1* с другими генами могло поменять эффекты аллелей на противоположные в данных гибридных комбинациях. В-третьих, ве-

роятно, что такая перемена связана с мутацией в какой-то тесно сцепленной регуляторной последовательности ДНК (энхансере или сайленсере), которая не была захвачена при секвенировании гена *Sdr-A1*.

Анализ промотора гена *Sdr-B1* с помощью онлайн-сервиса PlantCARE выявил, что в нем преобладают цис-регуляторные элементы, связанные с реакцией на свет, абсцизовую кислоту, метилжасмонат и аноксию, а также ответственные за экспрессию в меристеме. Наличие этих регуляторных элементов в промоторе гена *Sdr-B1* в некоторой степени объясняет известное усиление покоя семян пшеницы и родственных злаков в связи с действием света, абсцизово-кислоты и недостатка кислорода и ослабление покоя семян под действием метилжасмоната (Walker-Simmons, 1988; Hoang et al., 2014; Xu et al., 2016). Динуклеотидная инсерция СТ у образцов № 5, 8 и 15, вероятно, не влияет на структуру цис-действующих элементов. Вместе с тем однонуклеотидные замены у образца № 16 вызывают изменения двух регуляторных последовательностей. Замена G(-454)C обуславливает появление дополнительного элемента, ответственного за реакцию на метилжасмонат, и исчезновение G-box светочувствительного элемента, а замена A(-226)G – исчезновение GT-1 связывающего светочувствительного элемента. Все эти изменения в промоторе могут ослаблять, хотя незначительно, экспрессию гена *Sdr-B1* и, соответственно, быть одной из причин слабого покоя семян у образца № 16.

Заключение

Идентифицируемый с помощью CAPS-маркера однонуклеотидный полиморфизм A(-11)G в 5'-некодирующей области гена *Sdr-B1* не показал статистически значимой связи с индексом прорастания у изучаемых образцов пшеницы. Однако на том же материале нами была обнаружена слабая связь ($p = 0.1$) индекса прорастания с делецией в 3'-нетранслируемой области другого гена, лежащего близко на комплементарной цепи ДНК. Предположительно, эта делеция может влиять на экспрессию гена *Sdr-B1* через механизм РНК-интерференции, так как гены *TraesCS2B02G215200* и *Sdr-B1* (*TraesCS2B02G215300*) находятся на комплементарных друг другу цепях ДНК и разделены очень небольшим промежутком, примерно 200 п. о. В случае, если делеция 16 нуклеотидов рядом с геном *SDR-B1* фактически не оказывает влияния на его экспрессию, ее можно использовать как удобный вспомогательный маркер для определенных аллелей этого гена в некоторых гибридных комбинациях без проведения рестрикции.

Список литературы / References

Бадаева Е.Д., Шишкина А.А., Гончаров Н.П., Зуев Е.В., Лысенко Н.С., Митрофанова О.П., Драгович А.Ю., Кудрявцев А.М. Эволюция *Triticum aethiopicum* Jakubz. с позиции хромосом-

ного анализа. Генетика. 2018;54(6):613-628. DOI 10.7868/S0016675818060048.

[Badaeva E.D., Shishkina A.A., Dragovich A.Y., Kudriyavtsev A.M., Goncharov N.P., Zuev E.V., Lysenko N.S., Mitrofanova O.P. Evolution of *Triticum aethiopicum* Jakubz. from the position of chromosome analysis. Russ. J. Genet. 2018;54(6):629-642. DOI 10.1134/S1022795418060029.]

Дорофеев В.Ф., Филатенко А.А., Мигушова Э.Ф., Удачин Р.А., Якубцинер М.М. Культурная флора СССР. Т. 1. Пшеница. Л.: Колос, 1979.

[Dorofeev V.F., Filatenko A.A., Migushova E.F., Udachin R.A., Jakubtsiner M.M. Cultural Flora of the USSR. Vol. 1. Wheat. Leningrad: Kolos, 1979. (in Russian)]

Alaux M., Rogers J., Letellier T., Flores R., Alfama F., Pommier C., Mohellibi N., Durand S., Kimmel E., Michotey C., Guerche C., Loaec M., Laine M., Steinbach D., Choulet F., Rimbert H., Leroy P., Guilhot N., Salse J., Feuillet C. Linking the International Wheat Genome Sequencing Consortium bread wheat reference genome sequence to wheat genetic and phenomic data. Genome Biol. 2018; 19(1):111. DOI 10.1186/s13059-018-1491-4.

Doyle P.J. DNA Protocols for Plants. Molecular Techniques in Taxonomy. 1991;57(1):283-293. DOI 10.1007/978-3-642-83962-7.

Hoang H.H., Sechet J., Bailly C., Leymarie J., Corbinau F. Inhibition of germination of dormant barley (*Hordeum vulgare* L.) grains by blue light as related to oxygen and hormonal regulation. Plant Cell Environ. 2014;37(6):1393-1403. DOI 10.1111/pce.12239.

Lescot M., Dehais P., Thijs G., Marchal K., Moreau Y., Van de Peer Y., Rouze P., Rombauts S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. Nucleic Acids Res. 2002;30(1):325-327.

Nakamura S. Grain dormancy genes responsible for preventing pre-harvest sprouting in barley and wheat. Breed. Sci. 2018;68(3):295-304. DOI 10.1270/jsbbs.17138.

Olaerts H., Courtin C.M. Impact of preharvest sprouting on endogenous hydrolases and technological quality of wheat and bread: a review. Compr. Rev. Food Sci. Food Safety. 2018;17(3):698-713. DOI 10.1111/1541-4337.12347.

Sugimoto K., Takeuchi Y., Ebana K., Miyao A., Hirochika H., Hara N., Ishiyama K., Kobayashi M., Ban Y., Hattori T., Yano M. Molecular cloning of *Sdr4*, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010;107(13):5792-5797. DOI 10.1073/pnas.0911965107.

Vetch J.M., Stougaard R.N., Martin J.M., Giroux M. Allelic impacts of *TaPHS1*, *TaMCK3*, and *Vp1B3* on preharvest sprouting of northern great plains winter wheats. Crop Sci. 2018;59(1):140-150. DOI 10.2135/cropsci2018.05.0341.

Walker-Simmons M. Enhancement of ABA responsiveness in wheat embryos by high temperature. Plant Cell Environ. 1988;11(8):769-775. DOI 10.1111/j.1365-3040.1988.tb01161.x.

Xu Q., Truong T.T., Barrero J.M., Jacobsen J.V., Hocart C.H., Gubler F. A role for jasmonates in the release of dormancy by cold stratification in wheat. J. Exp. Bot. 2016;67(11):3497-3508. DOI 10.1093/jxb/erw172.

Zhang Y., Miao X., Xia X., He Z. Cloning of seed dormancy genes (*TaSdr*) associated with tolerance to pre-harvest sprouting in common wheat and development of a functional marker. Theor. Appl. Genet. 2014;127(4):855-866. DOI 10.1007/s00122-014-2262-6.

Zhang Y., Xia X., He Z. The seed dormancy allele *TaSdr-A1a* associated with pre-harvest sprouting tolerance is mainly present in Chinese wheat landraces. Theor. Appl. Genet. 2017;130(1):81-89. DOI 10.1007/s00122-016-2793-0.

ORCID ID

M. Bazhenov orcid.org/0000-0002-7301-1363
E. Guseva orcid.org/0000-0001-5157-0386
V. Rubets orcid.org/0000-0003-1233-8837

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-76-10054).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 18.01.2019. После доработки 19.06.2019. Принята к публикации 19.06.2019.